



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

**Transformación de *Jatropha curcas* y constructo
para el silenciamiento de *JcSAD1***

Tesis que presenta

Jorge Luis García Almada

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA
RENOVABLE**

Mérida, Yucatán, México

Diciembre, 2013



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

**Transformación de *Jatropha curcas* y constructo
para el silenciamiento de *JcSAD1***

Tesis que presenta

Jorge Luis García Almada

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán, México

Diciembre, 2013



DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, éstos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Mérida, Yucatán, México, diciembre de 2013.



Jorge Luis García Almada

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "**Transformación de *Jatropha curcas* y constructo para el silenciamiento de *JcSAD1***", fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias en Energía Renovable de este Centro.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Felipe", is written over a horizontal line.

Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán A C, y forma parte del proyecto titulado MEJORAMIENTO GENÉTICO DE *JATROPHA CURCAS* MEDIANTE TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS con apoyo de la BIORED bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola .

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, por aceptarme en su equipo de trabajo y por su apoyo en todo momento de mi estancia en CICY, así como a su técnica Rosa María Galaz Ávalos. De igual manera agradezco a compañeros y amigos de CICY que me brindaron su apoyo durante mi maestría. Un agradecimiento especial a mi comité tutorial, así como a los revisores de mi documento de tesis,

Agradezco al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY) por aceptarme como estudiante, en especial a mi comité de evaluadores en el proceso de selección para la maestría en ciencias en energía renovable. Agradezco a todas las personas encargadas de las instalaciones que utilice durante mi estancia en CICY, a los M.C. y Dres. que participaron impartiendo clases y seminarios. CONACYT por la beca de maestría (número de beca 327180).

Y quedo especialmente agradecido a Yucatán y su gente, porque hicieron de mi estancia en estas tierras una experiencia muy gratificante, ya que el cambio sociocultural y el ambiente académico de CICY fueron una muy buena combinación para contribuir a una formación integral.

Finalmente agradezco a mi familia por su apoyo incondicional en todas mis decisiones.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	vi
LISTADO DE TABLAS	viii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: ANTECEDENTES	4
1.1. ¿POR QUÉ USAR BIOCOMBUSTIBLES?	4
1.2. <i>JATROPHA CURCAS</i> COMO FUENTE DE ENERGÍA RENOVABLE	6
1.3. OPCIONES A MEJORAR EN <i>J. CURCAS</i>	7
JUSTIFICACIÓN.....	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
OBJETIVOS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	21
CAPÍTULO II: MATERIALES Y METODOS	23
2.1. INTRODUCCIÓN.	23
2.4. TRANSFORMACIÓN DE CALLOS DE <i>J. CURCAS</i>	29
2.5. VECTORES.	30
2.6. CEPAS.	33
2.7. CEBADORES Y ENDONUCLEASAS.	34
2.8. FRAGMENTO DE <i>JcSAD1</i>	35
2.9. CONSTRUCCIÓN PK-IHP- <i>JcSAD1</i>	38
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSION.....	43
3.1. CALLOS DE <i>J. CURCAS</i>	43

3.2 ANTIBIOGRAMA.....	44
3.3 TRANSFORMACIÓN DE CALLOS DE <i>J. CURCAS</i>	46
3.4. FRAGMENTO DE <i>JcSAD1</i>	47
3.3.2. CONSTRUCCIÓN PK-IHP- <i>JcSAD1AS</i>	52
CONCLUSIONES.....	57
PERSPECTIVAS.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	61

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.3.1. Ruta de biosíntesis de ácidos grasos en <i>J. curcas</i>	12
Figura 2.5. Mapas de los vectores utilizados.....	33
Figura 2.8.1 Diagrama de obtención del fragmento de <i>JcSAD1</i>	35
Figura 2.8.2 Mapa del vector pGEM-T- <i>JcSAD1</i>	35
Figura 2.9.1 Mapas de vectores de clonación.	39
Figura 2.9.2 Mapa del vector pK- <i>JcSAD1</i>	41
Figura 3.1. Callos de <i>J. curcas</i>	43
Figura 4.3.1 Antibiograma de callos de <i>J. curcas</i>	45
Figura 3.3 Prueba histoquímica de GUS a callos de <i>J. curcas</i>	47
Figura 3.4.1 Analisis del fragmento insertado en el vector pGEM- <i>JcSAD1</i>	48
Figura 3.4.2 Analisis filogenetico del fragmento <i>JcSAD1</i>	51
Figura 3.3.3 Constructo de silenciamiento “ihp- <i>JcSAD1</i> ”.	54

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.3.1 Resumen de trabajos reportados sobre transformación de <i>J. curcas</i>	13
Tabla 2.2.1 Composición del medio para germinación de embriones cigóticos de <i>J. curcas</i>	26
Tabla 2.2.2 Composición del medio para inducción de callos (IC) de <i>J. curcas</i>	27
Tabla 2.2.1 Composición de la solución sustrato X-Gluc.	29
Tabla 2.7 Cebadores y endonucleasas utilizados durante la construcción de <i>ihp-JcSAD1</i>	34
Tabla 2.8 Composición de soluciones para extracción de ADN plasmídico.	37
Tabla 2.9 Condiciones de PCR para amplificar los fragmentos <i>JcSAD1as</i> y <i>JcSAD1s</i>	38

RESUMEN

Tomando en cuenta las condiciones climáticas actuales, la creciente demanda energética y la disminución en los reservorios de combustibles fósiles, es indispensable encontrar alternativas energéticas que contribuyan al desarrollo sustentable de la sociedad.

Los ácidos grasos producidos en las semillas de *Jatropha curcas* son una buena opción para generar biodiesel, sin embargo, su relación de ácidos grasos saturados e insaturados limita la calidad del biodiesel producido. Una alternativa viable para producir biodiesel de mejor calidad a partir de *J. curcas*, es modificar la ruta de biosíntesis de ácidos grasos para disminuir la concentración de lípidos insaturados y aumentar la de saturados.

En este trabajo, se generó una secuencia de ADN para silenciar mediante ARN de interferencia, el gen *JcSAD1*, el cual, codifica para la enzima $\Delta 9$ -desaturasa. Esta enzima agrega la primer insaturación al ácido esteárico (18:0), para producir ácido oleico (18:1). La secuencia de *JcSAD1* utilizada para el silenciamiento, tiene una alta similitud con secuencias ortólogas de organismos de interés agroindustrial, por lo tanto, hay amplias posibilidades de que la construcción generada en este trabajo pueda ser utilizada en otras especies, con buenos resultados de silenciamiento de genes ortólogos.

También se estableció un protocolo de transformación para callos de *J. curcas* mediante *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando el vector pCAMBIA 1301 y se comprobó dicha transformación mediante la prueba histoquímica de GUS.

ABSTRACT

According with the actual environmental condition, energy demand and the decreasing fossil fuels availability, it is necessary to look at the alternative energy sources in order to contribute to the sustainable development.

Fatty acids produced in *Jatropha curcas* seeds are a good option to be converted into biodiesel; however, the relation between saturated and unsaturated fatty acids in the seeds is a limiting factor for the biodiesel quality. A feasible option to produce better quality of biodiesel from *J. curcas*, is modifying the fatty acid biosynthesis pathway to reduce the concentration of unsaturated lipids and to increase those saturated.

In this work, it was made a construct of DNA to silencing the *JcSAD1* gene by interference RNA (iRNA). The *SAD1* gene encodes the $\Delta 9$ -desaturase enzyme. This enzyme adds the first unsaturation in the stearic acid (18:0) to produce oleic acid (18:1). The *JcSAD1* sequence used in this work has high similitude with the orthologues genes from others important agro-industrial organisms. Hence, it is possible that the construction made in this work could be successful to silence orthologues genes.

On the other hand, a transformation methodology of *J. curcas* callus has been established, for what the pCAMBIA 1301 vector was used. The efficient transformation was detected by the histochemical GUS assay.

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de energía por el aumento poblacional y por el cambio en los hábitos de vida, hace que el apetito voraz por petróleo (como la principal fuente de energía para la sociedad actual) nos esté llevando a un cuello de botella tanto ecológico como energético.

Es por ello, que es necesario implementar estrategias que nos permitan solventar nuestras necesidades sin comprometer el suministro energético ni el equilibrio ecológico del planeta para las generaciones futuras —desarrollo sustentable—. En este sentido, surgen las fuentes de energía renovable como una posible alternativa que si bien no puede solucionar —en la actualidad— todos los problemas energéticos y ambientales, pueden ayudar a minimizar los efectos negativos que provoca el satisfacer la demanda energética.

A lo largo de la historia, el hombre ha desarrollado diversas tecnologías que permiten aprovechar la biomasa para obtener energía que pueda ser aprovechada para satisfacer las necesidades de las sociedades que han existido. Con el paso de tiempo, estas tecnologías han sido modificadas para incrementar su eficiencia. Ejemplo de estas tecnologías son los biocombustibles como bioetanol y biodiesel.

Una de las grandes ventajas de este tipo de biocombustibles es que poseen características físico-químicas que permiten hacer mezclas con los combustibles fósiles de mayor uso en la actualidad —gasolina y diesel—, esto facilita su utilización en motores diseñados para gasolina y diesel sin necesidad de efectuar muchas modificaciones. Una de las mejores alternativas como biocombustible, es el biodiesel, dado que su contenido energético es más alto que el del bioetanol,

puede satisfacer mejor las necesidades de potencia que se requieren en los vehículos de uso cotidiano [1].

En este sentido, *Jatropha curcas* surge como una posible fuente de materia prima para producir biodiesel, debido a su capacidad de crecer en condiciones poco propicias para la agricultura tradicional, su fácil propagación, amplia adaptación, bajo costo de semillas, corto periodo de gestación, así como semillas con un alto contenido de aceites propicios a ser convertidos en biodiesel [2-4].

Sin embargo, se sabe que a mayor cantidad de insaturaciones en los aceites se reduce el índice de cetanos del biodiesel obtenido a partir de dichos lípidos [5;6]. Teniendo en cuenta la alta proporción de aceites insaturados —principalmente oleico— producido en semillas de *J. curcas* [3], se plantea la posibilidad de modificar la ruta de biosíntesis de ácidos grasos para disminuir la producción de ácidos grasos insaturados, esperando que el biodiesel generado a partir de ellos tenga mejores valores de índice de cetanos.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

1.1. ¿POR QUÉ USAR BIOCOMBUSTIBLES?

Durante el año de 2008 el precio internacional del petróleo alcanzó valores tan altos que rosaron los niveles históricos, esta situación fue utilizada como argumento —aunado al agotamiento de las reservas de petróleo— para incentivar la llamada transición energética, que se refiere básicamente a la investigación y uso de fuentes alternas de energía, siendo los biocombustibles una de las opciones más apoyadas en la última década, especialmente bioetanol y biodiesel. Entre las ventajas que presentan estas opciones de energía renovable, podemos mencionar que son tecnologías en las cuales participa activamente el proceso de fotosíntesis —para producir biomasa—, lo cual ayuda a mantener en equilibrio el ciclo de carbono, esto es una gran ventaja ya que contribuye a disminuir las emisiones de CO₂ a la atmosfera [7-10]. Sin bien, la combustión de estos biocombustibles genera emisiones de CO₂, este es rápidamente retirado de la atmosfera por los mismos procesos biológicos —fotosíntesis— que sirven para generar más biocombustibles, de esta manera se logra una disminución neta en las emisiones de CO₂ a la atmosfera.

En la última década se ha visto un marcado incremento en la utilización de biocombustibles como bioetanol y biodiesel, siendo la Unión Europea el principal productor y consumidor de biodiesel, mientras que EUA y Brasil lo son para el caso de bioetanol [11]. Hasta el día de hoy, el etanol ha sido el biocombustible más utilizado, esto debido a un amplio conocimiento de sus características y a la disponibilidad de metodologías bien establecidas para su producción a niveles industriales, principalmente para la industria de alimentos y bebidas, sin embargo, es posible que el etanol no sea la mejor opción como biocombustible, debido a

ciertos problemas técnicos relacionados con los motores de combustión interna, un ejemplo de ello puede ser la alta solubilidad en agua, lo cual dificulta su purificación y puede generar problemas en los sistemas de combustión, así como el bajo contenido energético —comparado con los combustibles normales, como gasolina y diesel— [1].

Uno de los problemas que enfrentan las tecnologías de biocombustibles es el hecho de que al basarse en biomasa, es necesario producirla a niveles industriales, lo cual implica altos costos de inversión inicial, mantenimiento y cosecha, también son procesos largos que requieren mucha energía para su completa realización, esto hace que sea muy difícil satisfacer la demanda de combustibles a precios competitivos respecto a los combustibles fósiles tradicionales. Es importante que este tipo de cultivos no compitan por tierras que podrían ser utilizadas para generar alimentos de consumo humano, tampoco es recomendable talar bosques y/o selvas para establecer nuevos cultivos. Esto hace que el área superficial disponible para cultivos bioenergéticos sea solo una fracción mucho menor a la totalidad usada para agricultura [10].

Resulta claro que es necesario realizar cambios que permitan acercarnos más al desarrollo sustentable, de lo que lo hemos hecho hasta ahora. En este sentido los biocombustibles brindan la gran ventaja de que aparte de ayudar a producir energéticos, también ayudan a revertir algunos efectos negativos de la utilización de combustibles fósiles, como es la producción de CO₂.

1.2. *JATROPHA CURCAS* COMO FUENTE DE ENERGÍA RENOVABLE

Jatropha curcas es una planta perenne que pertenece a la familia de las Euforbiáceas, es diploide con 22 cromosomas [12] y se ha estimado el tamaño de su genoma en 416 Mb [13].

El origen de *J. curcas* es algo discutido, pero se cree que es nativa de México y que fue transportada a Asia y África por los portugueses, sin embargo es necesario hacer un estudio más detallado para confirmar esta idea, esto podría hacerse mediante técnicas moleculares como RAPD (Random Amplification Polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism), ISSR (inter simple sequence repeat) y SSRs (single sequence repeats) [14;15].

Entre las principales características de se destacan: la capacidad de crecer en condiciones “marginales”, es decir, en áreas poco propicias para la agricultura tradicional, es de fácil propagación, amplia adaptación, bajo costo de semillas, corto periodo de gestación. Otra característica importante de *J. curcas* es, que en sus semillas se encuentra un alto contenido de aceites propicios a ser convertidos en biodiesel, lo cual, le proporciona un alto potencial como cultivo bioenergético [2-4].

La mayoría de las variedades de *J. curcas* presentan toxicidad, por lo que los residuos obtenidos después de la extracción del aceite no pueden ser usados como alimento para el ganado, sin embargo, en México se han identificado variedades no tóxicas para el ganado, lo cual, le aporta un valor agregado a estas variedades como cultivos bioenergéticos, ya que estos residuos se podrían utilizar

para producir forraje y haría más rentable la producción en gran escala de *J. curcas* [16].

Existe un creciente interés en establecer cultivos de *J. curcas* tanto del sector privado como del gubernamental, un ejemplo de esto son las compañías D1 Oils plc, Viridas plc y Energem Resources Inc., las cuales, tienen plantaciones de *J. curcas* en India, Sur África, el Sureste Asiático, entre otros. A pesar del gran interés por los cultivos de *J. curca*, los datos de rendimiento para esta especie aun son algo limitados e inciertos, sin embargo, se espera que en los próximos años las plantaciones recientemente iniciadas puedan aportar datos que ayuden a tener información más confiable sobre sus rendimientos [3].

En un trabajo que se realizó en la India [17], utilizaron ácidos grasos libres colectados de plantas de distintas regiones de Maharashtra, con las cuales se procedió a generar biodiesel por medio de transesterificación, finalmente se logró observar que el biodiesel generado por este método fue de muy buena calidad para ser utilizado comercialmente como biodiesel, a diferencia de cuando se utilizan los ácidos grasos libres como mezcla de aceites, con el proceso de transesterificación se logra mejorar alguna de las propiedades de los aceites, incluida la viscosidad, que es una de las mayores limitantes para usar los aceites de *J. curcas* directamente en un motor de diesel.

1.3. OPCIONES A MEJORAR EN *J. CURCAS*

En un trabajo de revisión, realizado por Durrett et al. [5], se reportó un extenso análisis sobre los metil ésteres de ácidos grasos, obtenidos mediante la

esterificación de aceites de distintas plantas, y se resalta la relación inversa entre la cantidad de insaturaciones y el índice de cetanos (CN) —por sus siglas en inglés—. El índice de cetano, es un parámetro de calidad de combustibles para motores de diesel, se refiere al tiempo de retardo de la ignición (ID) —por sus siglas en inglés—, es decir, al tiempo que transcurre desde el momento en que el combustible entra en el cilindro de compresión hasta el momento en que hace ignición, a menor valor de ID, mayor valor de CN [6].

Uno de los parámetros más importantes a conocer en *J. curcas* es su contenido y composición de ácidos grasos, ya que estos, contribuyen de gran manera a muchas características de interés como: viscosidad, flujo en frío, punto de enturbiamiento y estabilidad oxidativa del aceite producido por la planta que, después será usado para producir biodiesel [3].

Se ha reportado que las semillas de *J. curcas* contienen entre 27 a 62% de aceite [3;18;19], donde el principal ácido graso es el oleico a diferencia de otras especies de *Jatropha*, en las cuales predomina el ácido linoleico [20], también se han reportado valores de 32% —masa seca— de contenido de aceite en semillas de *J. curcas* y de 24% para *J. gossypifolia* en muestras colectadas en Brasil [2].

En un estudio [3] realizado a semillas de *J. curcas* de 23 sitios de Madagascar para conocer su composición de ácidos grasos, mediante análisis de AFLP se observó que las variaciones genéticas de las diferentes semillas era muy pocas como para explicar la variación en la composición de ácidos grasos observada, por lo que se concluyó que las condiciones ambientales deben tener un papel muy importante como determinantes del contenido de ácidos grasos en *J. curcas*. En dicho estudio también se estimó el índice de cetano que se obtendría de cada

para las plantas de cada localidad, de acuerdo a su composición de ácidos grasos, y en todos los casos el valor estimado cumplió con los criterios mínimos establecidos por la Unión Europea (51) y EUA (47).

En este mismo estudio se obtuvieron valores de 33.8% a 51.7% de contenido de ácido oleico para muestras de semillas de *J. curcas* colectadas en Madagascar, mientras que de Oliveira et al. [2] reportó valores de 22.4% para semillas de la misma especie pero de muestras originarias de Brasil, así como porcentajes de instauraciones de 40% a 70%, los cuales son comparables a los reportados en soya y palma aceitera [21].

Para que la escala de cultivos de *J. curcas* aumente en el mundo, es necesario desarrollar nuevas variedades que produzcan la máxima cantidad y calidad de aceites, incrementar sus rendimientos de producción y que sea tolerantes a condiciones ambientales adversas, para lograr lo anterior, sería muy útil desarrollar metodologías que permitan la modificación genética de esta especie [3].

A diferencia de la mayoría de los cultivos de oleaginosas actuales, en el mercado no hay variedades de *J. curcas* agrónomicamente mejoradas. Algunas de las vías para obtener variedades mejoradas para implementarlas como cultivo bioenergético podrían ser por métodos tradicionales de cruces entre diferentes variedades, inducción de mutaciones, transgénesis y/o cisgénesis [14]. Estudios anteriores han revelado susceptibilidad de plántulas [22] y discos de cotiledones *J. curcas*, a ser transformados mediante *Agrobacterium tumefaciens*, con una eficiencia de transformación de 13% para discos de cotiledones [23].

Uno de los puntos importantes a estudiar y tratar de mejorar en *J. curcas* es su contenido y composición de ácidos grasos, esto podría hacerse mediante alteraciones en los niveles de producción de las enzimas que participan en las rutas de biosíntesis de ácidos grasos, este tipo de modificaciones se han reportado en plantas como *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus* [24;25].

Ejemplo de estos posibles blancos a modificar para incrementar los rendimientos de producción de aceites en *J. curcas* son el gen *GLABRA2*, del cual su disrupción permite incrementar el contenido de aceite en *Arabidopsis* [26] y la sobreexpresión de los factores de transcripción *GmDOF4* y *GmDOF1* también han mostrado tener efectos positivos en el incremento del contenido de aceites en *Arabidopsis* [27]. También se propone el silenciamiento del gen de las enzimas Δ -12 (*FAD2*) o Δ -9 (*SAD*) desaturasas para incrementar la acumulación de ácido oleico o esteárico respectivamente, como se ha hecho en otros cultivos de oleaginosas [14;28].

La transformación por *A. tumefaciens* es uno de los métodos más usados para transformar plantas y el caso de *J. curcas* no es diferente hasta la actualidad. Para transformar *J. curcas* se han utilizado principalmente las cepas LBA4404 [23] y EHA101 [29]. Aunque las eficiencias de transformación de cada cepa han sido notoriamente diferentes —aparentemente mayor eficiencia para LBA4404—, es difícil decir cual cepa es mejor para transformar ya que, puede haber muchos factores experimentales que afecten eficiencia de transformación.

La transformación de *J. curcas* con *A. tumefaciens* se puede hacer sobre diferentes tipos de explantes, se han reportado transformaciones de tejidos de

segmentos de hipocótilo de plántulas *in vitro* [29] y en discos de cotiledones [23] con buenos resultados.

La biobalística también es una posibilidad para obtener plantas transgénicas ya que se ha visto que *J. curcas* puede incorporar ADN plasmídico directamente por medio de biobalística [30]. En dicho trabajo se reportó una eficiente transformación de brotes apicales con el transgen *uidA*, así como su posterior expresión y actividad biológica.

Ya se han hecho varios trabajos sobre transformación de *Jatropha curcas*, en los cuales, se han utilizado diferentes explantes, vectores, y cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, como se resume en la Tabla 1.3.1.

En un estudio del transcriptoma de semillas de *J. curcas* en dos estadios de desarrollo de la planta [31], se analizaron los transcritos durante desarrollo de semillas y germinación de semillas. Con los resultados obtenidos y con ayuda de herramientas bioinformáticas se logró hacer una reconstrucción de las rutas metabólicas relacionadas con la biosíntesis y acumulación de ácidos grasos en semillas de *J. curcas*. Entre los resultados, destacan significativamente los elevados niveles de expresión de la enzima que cataliza la síntesis de ácido oleico y esteárico [Acil-tioesterasa A, (FatA)], lo cual concuerda con los altos niveles de estos ácidos grasos encontrados en semillas de *J. curcas*, sin embargo, también se han reportado altos valores de ácido linoleico (18:2) lo cual es apoyado por niveles de expresión medianamente elevados de FAD2 para llevar a la síntesis del 18:2, como se muestra en la Figura 1.3.1.

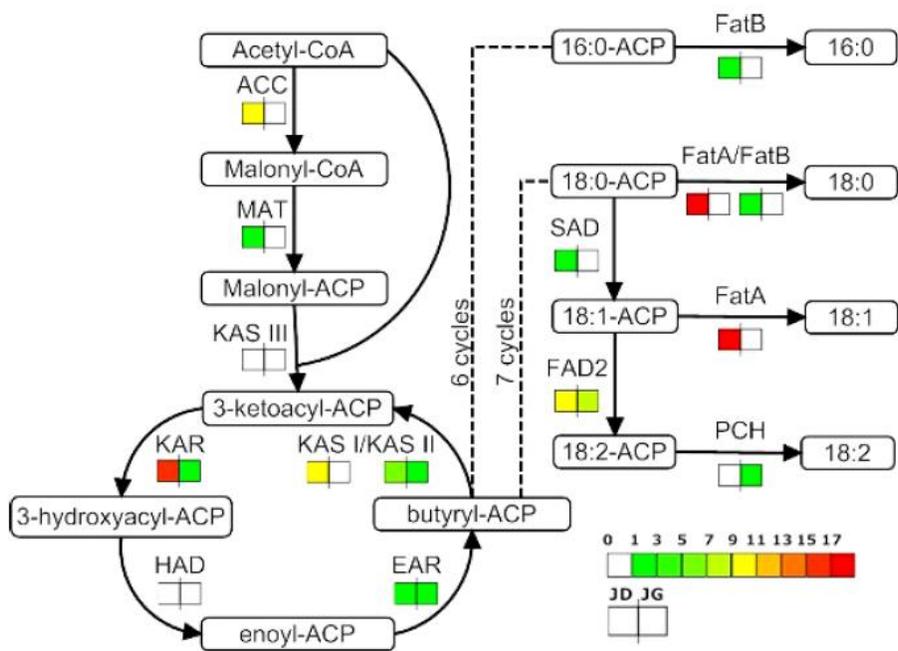


Figura 1.3.1. Ruta de biosíntesis de ácidos grasos en *J. curcas*.

La intensidad del color en las casillas debajo del nombre de cada gen, representa el número de ESTs de *J. curcas*, encontrados en los dos estadios analizados JD (desarrollo) y JG (germinación) [31]

Tabla 1.3.1 Resumen de trabajos reportados sobre transformación de *J. curcas*.

Método de transformación	Cepa	Explantante	Vector	Promotor	Marcador de selección	Gen blanco	Resultados	País	Referencia
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LBA4404	CJ	pBI121	CaMV35S	<i>nptII</i>	<i>uidA</i>	TGI	Japón	[32]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-----	Cotiledones	pCAMBIA1300	CaMV35S	<i>GFP</i>	<i>JcFAD2-1</i>	TGI, PR, RNAi, AS	Singapore	[33]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	EHA105	HC, H	pCAMBIA2301	CaMV35S	<i>nptII</i>	<i>uidA</i>	TE	India	[17]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LBA4404	HC	pCAMBIA1301	CaMV35S	<i>Bar</i>	<i>uidA</i>	SR	China	[34]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	EHA101, LBA4404	SH, SH	pIG121Hm	CaMV35S	<i>nptII</i>	<i>uidA</i>	TE	India	[29]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LBA4404	HC	pCAMBIA2301	CaMV35S	<i>nptII</i>	<i>uidA</i>	TGI	China	[35]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LBA4404 EHA105	HJ	pBI121	CaMV35S	<i>nptII</i>	<i>LIF</i>	TGI	China	[36]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LBA4404	SH, HC	pCAMBIA1301	CaMV35S	<i>Hpt</i>	<i>uidA</i>	TGI	India	[37]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LBA4404	CJ, HJ	pGWB11	CaMV35S	<i>nptII</i>	<i>AtPPAT, AtNF-YB1, GSMT, DMT</i>	TGI, PR	Japón	[38]
Biobalística	-----	BA	pBI426	CaMV35S	<i>nptII</i>	<i>uidA</i>	TGI, PR	India	[30]
Biobalística	-----	E	pCAMBIA1301	CaMV35S	<i>Hpt</i>	<i>SbNHX1</i>	TGI, PR	India	[39]

CJ, cotiledones juveniles; IGB, integración del gen blanco; RP, regeneración de planta; ARNi, ARN de interferencia; AS, antisentido; HC, hoja cotiledonar; H, hojas; E, embriones; ET, expresión transitoria; RB, regeneración de brotes; SH, segmentos de hoja; SH, segmentos de hipocótilo; HJ; hoja joven; BA, brotes apicales.

Por los resultados obtenidos por Costa et al. [31] y en trabajos anteriores [40;41], surge como opción de modificación genética, el silenciamiento del gen que codifica para la enzima Δ -9-desaturasa, también conocida como estearoil-ACP desaturasa, ya que una de las principales características deseadas en aceite de semillas de *J. curcas* es que tenga la menor cantidad posibles de insaturaciones, y esto se podría lograr interrumpiendo la ruta de biosíntesis de ácidos grasos.

En un estudio realizado en *Caenorhabditis elegans*, se descubrió que, cuando se inyectaban moléculas de ARN de doble cadena —sentido y antisentido—, específicas para un gen endógeno de *C. elegans*, se obtenía un efecto de silenciamiento de dicho gen, mucho mayor a cuando se inyectaba una molécula de ARN de cadena sencilla, ya fuera en sentido o antisentido [42].

En un trabajo realizado por Waterhouse et al. [43], se propone un mecanismo de acción de moléculas de ARNdc (ARN de doble cadena) formadas por el apareamiento de secuencias sentido y antisentido de un mismo transcrito, para silenciar genes endógenos o genes exógenos en plantas. Muchos trabajos se han enfocado en tratar de explicar el mecanismo de acción de los ARNi (ARN de interferencia). Posteriormente, Waterhouse et al. [44] propusieron un modelo mucho más complejo del mecanismo de acción de los ARNi y de sus posibles implicaciones biológicas.

Una estrategia de modificación genética en *J. curcas* es el silenciamiento génico por medio de virus, un ejemplo de ello es lo hecho por Ye et al. [45], donde utilizaron el Virus Sonajero de Tabaco (TRV) por sus siglas en inglés “Tobacco Rattle Virus”, para realizar silenciamiento génico virus-inducido (VIGS) por sus siglas en inglés “Virus-Induced Gene Silencing”, esta técnica permite la generación

de moléculas de ARNpi (ARN pequeños de interferencia), específicos para secuencias de ARNm de genes blanco a silenciar. Esto se logra construyendo vectores virales recombinantes con la secuencia parcial de algún gen de interés a silenciar.

Como esta técnica genera un fenotipo transitorio y reversible es posible utilizarla para silenciar genes de los cuales una deficiencia durante los procesos de embriogénesis podría ser letal [46].

La utilización de esta técnica por Ye et al. [45] para silenciar genes de la biosíntesis de ácidos grasos en *Jatropha*, mostró que el silenciamiento del gen *KASII* incrementaba la acumulación de ácido palmítico (16:0) respecto a las no infectadas con el vector (TRV: *KASII*). De igual manera, Ye et al. [45] construyeron un vector TRV con las secuencias de dos genes de la vía de biosíntesis de ácidos grasos en *Jatropha* (TRV: *KASII+FATB*), con lo cual esperaban una mayor acumulación de 16:0, sin embargo el efecto acumulativo de 16:0 fue menor que en el vector TRV: *KASII*, por lo cual estos autores suponen que el co-silenciamiento de *KASII+FATB* puede revertir el efecto de silenciamiento de *KASII* —solo— en la vía de biosíntesis de ácidos grasos en *Jatropha*.

En el mismo trabajo de Ye et al. [45], también se silenciaron los genes *FAD2-1* (Δ -12 desaturasa) *SAD1-L* (Δ -9 desaturasa), se obtuvieron valores incrementados en los niveles de acumulación de 16:0 y 18:0 para *SAD1-L* silenciado y mayores niveles de 18:1 para *FAD2-1* silenciado. Sin embargo, han sido desarrollados vectores que aprovechan otros mecanismos de silenciamiento por ARNi, como el vector pHANNIBAL [47].

En el trabajo de Wesley et al. [47], se reportó que las estructuras de ARNi tienen una mayor eficiencia de silenciamiento cuando los brazos de la horquilla miden de 100 a 850 pb e incluyen un intrón, también se comparó la eficiencia de silenciamiento entre un vector pHANNIBAL con una construcción de para ARNi de secuencia sentido y antisentido, contra vectores que solo contenía la secuencia en orientación sentido o antisentido, y se observó una gran eficiencia de silenciamiento en la construcción de ARNi de aproximadamente 95% en comparación de eficiencias de aprox. 10% para las construcciones con solo una secuencia sentido o antisentido del gen de interés a silenciar. El vector pKANNIBAL —a diferencia de pHANNIBAL, tiene un gen de resistencia para kanamicina en bacterias— fue desarrollado para generar una estructura de horquilla de ARN, compuesta por una secuencia de interés en orientación sentido, seguida por un intrón del gen *PDK* (piruvato ortofosfato dikinasa) y la misma secuencia de interés en orientación antisentido [47].

Con este mismo vector —pero con distintos intrones— se logró silenciar la producción de la enzima Δ -9 y Δ -12 desaturasa en plantas de algodón y *Arabidopsis*, con rendimientos de silenciamiento de aproximadamente 50% para los vectores que no contenían intrón y de 100% para los vectores que si contenían un intrón como parte de la horquilla de ARN [47]. De esta manera, estos vectores surgen como una buena opción para silenciar eficazmente genes específicos, como pueden ser, genes de rutas metabólicas.

La modificación de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos mediante el silenciamiento por ARN antisentido del gen *SAD* (Δ -9 desaturasa) ya se ha reportado en especies del género *Brassica* [25], donde se utilizó una secuencia antisentido del gen que codifica para la Δ -9- desaturasa, de este modo se logró

disminuir significativamente la producción de esta proteína en semillas de la progenie genéticamente modificada.

A pesar de la importancia que tiene incentivar la investigación y establecimiento de nuevas tecnologías para la producción y energías renovables es necesario ser conscientes del real potencial que tienen dichas tecnologías sobre su alcance en la contribución del desarrollo sustentable. Por ejemplo, en el caso del biodiesel, en el estado de Chiapas se estima que el área disponible para cultivo de *Jatropha curcas* es de un máximo de 230 mil hectáreas, mientras que la actual demanda de diesel en México es de aproximadamente 17.4 millones de toneladas métricas, esto requeriría de aproximadamente 23 millones de hectáreas plantadas con *J. curcas*, lo cual es equivalente a más del 90% de la superficie cultivable del país [10].

Otro punto a considerar respecto al cultivo de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) es la legislación vigente, en México, estamos regidos por la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados con su respectivo reglamento (Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados) en los cuales se establecen numerosos criterios que se deben cumplir para poder ser aprobados en alguna región o momento determinado, para el caso de *J. curcas* no es distinto, su aprobación para ser liberado como OGM de uso industrial deberá ser revisado por un grupo de especialistas que evaluarán la situación de cada caso particular, no es tan sencillo como decir que será aprobado en todos los casos o en todos los casos negado, ya que son muchos los criterios que se mencionan en dicha ley.

Una vez obtenidos los permisos para el establecimiento de cultivos bioenergéticos genéticamente modificados, es recomendable evitar el uso de fertilizantes químicos debido que estos representan el mayor consumo energético en la agricultura —desde su elaboración hasta su aplicación—, otra recomendación para este tipo de tecnologías es que sean enfocadas a satisfacer demandas locales y no globales, es decir, que el biocombustible generado por medio de este tipo de cultivos sea usado en los lugares cercanos a donde se estableció la plantación, de este modo se disminuyen los costos de transporte y se hace más favorable el balance energético [10].

JUSTIFICACIÓN

Dadas las condiciones actuales de demanda de fuentes de energía que favorezcan el desarrollo sustentable, se hace de vital importancia mejorar las tecnologías actuales de manera que nos permitan hacer más eficientes, rentables y sustentables las opciones de energías renovables. La generación de una construcción génica que permita modificar la relación de ácidos grasos saturados e insaturados en las semillas de *J. curcas* podría ayudarnos a mejorar la rentabilidad de su utilización cultivo bioenergético.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es necesario establecer metodologías que permitan la modificación genética de *J. curcas* para poder mejorar características de la planta que nos permitan obtener mejores resultados al utilizarla como productora de aceite para generar biodiesel a niveles industriales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer una metodología para transformación de callos de *J. curcas*, así como generar una construcción para el silenciamiento del gen *JcSAD1* que sirvan como base para posteriores trabajos de modificación genética.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer un protocolo para transformar callos de *J. curcas* mediante *Agrobacterium tumefaciens*,
- Generar la construcción para el silenciamiento de *JcSAD1*.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. INTRODUCCIÓN.

El callo de plantas se produce como consecuencia de la exposición a ciertos reguladores de crecimiento y en ciertas concentraciones inmediatamente después de un daño en el tejido vegetal [48] y puede ser obtenido de casi cualquier parte de la planta, sin embargo, la eficiencia en la producción de callo dependerá de muchos factores que van desde el genotipo de la planta utilizada hasta las condiciones ambientales en las que se cultive el explante [49;50].

Los callos se pueden mantener en medios semisólidos o líquidos, cuando se requiere un rápido crecimiento, suele ser más conveniente colocarlos en medio líquido y agitación constante [49].

En 1984 se reportó el primer trabajo de modificación genética de una planta [51], y desde entonces han desarrollado diferentes metodologías de transformación y selección de transformantes, así como tecnologías de modificación genética.

Para obtener plantas de *J. curcas* genéticamente modificadas para usarlas exitosamente como cultivo bioenergético, primero es necesario establecer mecanismos de selección de transformantes que nos permitan discriminar eficazmente entre los explantes modificados y los no modificados, esto se puede hacer con estudios farmacológicos usando antibióticos que sean tóxicos para los explantes silvestres y vectores que aporten resistencia a los mismos antibióticos. Para esto es importante evaluar los efectos de los antibióticos usados en el

proceso de selección sobre los explantes a transformar. Un ejemplo de esto se encuentra en el trabajo de Li et al. [34] donde se observó que concentraciones de 50 mg/L de kanamicina, 0.5 mg/L de fosfotricina o 5 mg/L de higromicina, inhiben la generación de brotes en los callos no transformados, mientras que 100 mg/L de kanamicina, 1 mg/L de fosfotricina o 7.5 mg/L de higromicina en el medio, mata los callos no transformados.

Otro ensayo para la confirmación de la exitosa transformación, es la prueba histoquímica GUS. En 1987 se publicó el primer trabajo de una planta transgénica que había incorporó el gen GUS (β -glucuronidasa) de *E. coli*, como un gen reportero de la transformación de células vegetales, de igual manera se demostró que la incorporación de esta secuencia no afecta la salud y fertilidad de las plantas transgénicas. Cuando se utiliza este sistema como gen reportero, es necesario que la planta silvestre —sin transformar— no de positiva a la tinción histoquímica GUS [52]. Para el caso de *J. curcas*, no se reportado un resultado positivo a esta prueba en plantas silvestres, lo cual permite su utilización sin riesgos de falsos positivos de transformación [17].

El sustrato más utilizado para detectar la actividad biológica de la β -glucuronidasa es el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronido o X-Gluc, el cual al ser procesado por la enzima genera dicloro-dibromoindigo (ClBr-indigo), que es insoluble y de color azul [53].

Si bien es cierto que ya hay varios trabajos donde se ha reportado la exitosa transformación de células de *J. curcas*, es necesario que en nuestro grupo de trabajo se pongan a prueba las metodologías reportadas, y sean optimizadas para el cultivar de *J. curcas* con el que nosotros estamos trabajando, porque si bien es

la misma especie el genotipo no lo es al 100% y eso implica la posibilidad de respuesta diferente a los mecanismos de selección, transformación e identificación mediante la prueba de GUS.

Como se comento anteriormente, desde 1984 se ha venido desarrollando distintas estrategias de modificación genética de plantas y un ejemplo de esto es el trabajo publicado en 2001 por Wesley et al. [47], donde se observó que una construcción de silenciamiento formada por la secuencia sentido de un gen X, fusionado un intrón de plantas y a la secuencia antisentido del mismo gen X produciría transcritos que podrían formar estructuras de bucles o “hairpin”, las cuales, tienen un potente y específico efecto de silenciamiento génico postranscripcional sobre transcritos con secuencias similares a la del gen X utilizado en la construcción.

Sabiendo que el gen *SAD1* codifica para un propeptido que migra hasta el plastidio, donde al ser introducido es cortado, dejando una enzima biológicamente activa, compuesta por aproximadamente 363 residuos aminoacídicos, conocida como Δ -9-desaturasa [40;54].

Debido a que la mayoría de las plantas carecen de otras desaturasas que se encarguen de procesar los ácidos grasos 18:0 de forma similar a la Δ -9-desaturasa, se piensa que esta enzima es la responsable de la relación de ácidos grasos saturados y los monoinsaturados [55].

De esta manera surge la idea de utilizar el vector pKANNIBAL [47] para armar un constructo de ADN, que permita silenciar el gen *JcSAD1* en plantas de *J. curcas* transformadas con dicha construcción. Todo esto con la intención de obtener

plantas que en sus semillas tengan una mayor cantidad de ácidos grasos saturados en comparación con las plantas silvestres, ya que el biodiesel producido a partir de ácidos grasos saturados tendrá mayores valores de índice de cetanos [5;6].

2.2. MATERIAL VEGETAL.

En el presente trabajo, se utilizaron callos previamente generados por la Ing. Celia Maricruz Ucan Uc, y callos generados en el transcurso de este trabajo, tomando como base lo establecido por Galaz-Avalos et al. [49]. Para la obtención de los callos se partió de plántulas obtenidas *in vitro* a partir de embriones cigóticos de un cultivar de *J. curcas* originario del estado de Chiapas, México, con el cual, se ha venido trabajando en el laboratorio 24 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, a cargo del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY).

Para la germinación de los embriones cigóticos —de semillas traídas del estado de Chiapas, México—, se utilizó un medio de cultivo a base de sales MS [56], adicionado con vitaminas B5 [57], como se muestra en la tabla 2.2.1.

Tabla 2.2.1 Composición del medio para germinación de embriones cigóticos de *J. curcas*.

Reactivo	g/L
Sales MS	4.3
Mioinositol	0.1
Glicina	0.002
Tiamina-HCL	0.0001

Acido nicotínico	0.0005
Piridoxina-HCL	0.0005
Agar	8
Sacarosa	30
PPM	2%
pH=5.8	

Una vez obtenidas las plántulas *in vitro*, se les cortó el hipocótilo en condiciones de esterilidad, y fueron transferidos a medio para inducción de callos (IC) (tabla 2.2.2), adicionado con los reguladores de crecimiento ácido indolacético (AIA) y benzil adenina (BA), así como PPM (Plant Preservative Mixture) para reducir las probabilidades de proliferación de agentes contaminantes. Los explantes se mantuvieron en foto-periodo 16:8 —luz:oscuridad— a 25°C, hasta que se generaron callos.

Tabla 2.2.2 Composición del medio para inducción de callos (IC) de *J. curcas*.

Reactivo	Cantidad
Sales MS	4.3 g/L
Mioinositol	0.1 g/L
Acido nicotínico	0.001 g/L
Tiamina-HCL	0.01 g/L
Piridoxina-HCL	0.001 g/L
Sacarosa	30 g/L
Agar	8 g/L
AIA	10 mM
BA	5 mM
PPM	2%
pH=5.8	

Una vez obtenido tejido de callo, fue removido y transferido al medio de mantenimiento de callos, que es igual al medio de inducción pero sin agar, es

decir, medio líquido, y se mantuvieron en este medio en foto periodo 16:8 a 25°C, con cambios de medio cada 15 días.

2.3. ANTIBIOGRAMA

Se evaluó el efecto que tienen los antibióticos kanamicina, higromicina y cefotaxima sobre los callos de *Jatropha curcas*, en base a lo elaborado por Palomo-Ríos et al. [58] y Li et al. [34].

Se realizó un antibiograma para cada antibiótico, en el caso de higromicina se utilizaron las concentraciones 2.5 mg/L, 5 mg/L y 10 mg/L, para kanamicina 25 mg/L, 50 mg/L y 100 mg/L, se decidió utilizar estas concentraciones de antibióticos en el medio IC debido a que las concentraciones 5 mg/L y 50 mg/L son las reportadas como dosis óptimas para la selección de transformantes mediante higromicina y kanamicina respectivamente [34;58]. Mientras que para cefotaxima solo se utilizó la concentración de 400 mg/L, debido a que la concentración reportada es de 200 mg/L [35].. [58] y Li et al. [34].

El ensayo se llevó a cabo colocando 5 callos de aproximadamente 0.5 cm de diámetro en cada caja Petri, para ello, el medio IC fue adicionado con agar y previo a ser vaciado en la caja Petri se le agrego el antibiótico, se realizaron 3 cajas Petri con cada antibiótico. Los callos se dejaron incubar por un mes a foto periodo 16/8 (luz/oscuridad). El tratamiento testigo fueron callos del mismo tamaño, incubados el mismo tiempo y a las mismas condiciones pero en medio de IC sólido sin antibióticos.

2.4. TRANSFORMACIÓN DE CALLOS DE *J. CURCAS*.

Para la estandarización del protocolo de transformación de callos de *J. curcas* se utilizó una cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 que contenía el vector de transformación de plantas “pCAMBIA 1301” (figura 3.2) donado por el Dr. José Juan Zúñiga (UBBMP-CICY). Durante el proceso, es necesario contar con células de *A. tumefaciens* en medio líquido a $OD_{600nm}=0.6$, las cuales, fueron cosechadas por centrifugación 3000 xg por 5 min, y después resuspendidas en la solución de infección (MS + vitaminas B5 + acetosiringona [200 μ M]), a pH=5.5)[29;59], una vez resuspendidas, se mantuvieron en oscuridad a 200 rpm a 28°C durante 2 h y una vez transcurrida la incubación, se agregaron los callos a la solución de infección y se incubaron por 72 h, las mismas condiciones.

Una vez transcurridas las 72 h, el proceso de transformación debió estar terminado, por lo tanto se procedió a realizar la prueba histoquímica de GUS, para esto, los callos con diámetro de 3-5 mm, se transfirieron a solución sustrato X-Gluc (suficiente para cubrir los callos a tratar) (tabla 5.2.2), y se dejaron 24 h en oscuridad a 37°C. Una vez transcurridas las 24 h, se procedió a desteñir los tejidos mediante dos lavados de 24 h c/u con metanol acetona (3:1).

Tabla 2.2.1 Composición de la solución sustrato X-Gluc.

Reactivo	Concentración
Fosfato de sodio pH 7	100 mM
EDTA pH 7	10 mM
Ferricianuro de potasio	0.5 mM
Ferrocianuro de potasio	0.5 mM
Triton X-100	1%

X-Gluc	2mM
pH=7	

El tratamiento testigo fueron callos sometido a la tinción de GUS y desteñido, a las mismas condiciones que los callos transformados con pCAMBIA 1301.

2.5. VECTORES.

Se utilizó el vector pGEM®-T Easy Vector (figura 2.5. A) para clonar los amplicones obtenidos con los cebadores par2, par1. El vector “pGEM®-T Easy Vector” contiene el gen *bla*, el cual, produce una proteína β -lactamasa, que le confiere resistencia contra ampicilina a las células de *E. coli* transformadas con este plásmido.

El vector pKANNIBAL (figura 2.5. B) (donado para propósitos de investigación académica por CSIRO Plant Industry) es un derivado del vector pART7 que a su vez se derivó del vector pGEM-9zf(-), contiene una secuencia “*KanR*”, que codifica para una enzima aminoglucósido fosfotransferasa, que le aporta resistencia contra kanamicina a las células de *E. coli* transformadas con este vector. También contiene la secuencia promotora del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S CaMV), así como el intrón 2 del gen específico de plantas *PDK* y la secuencia de la región terminadora del gen *OCS* (octopina sintasa).

El vector pKANNIBAL ha sido diseñado con sitios de reconocimiento para endonucleasas que permitan la ligación de una secuencia de ADN en orientación sentido o antisentido flanqueando el intrón de *PDK*. Esta característica le permite

formar una crear una secuencia que al ser expresada tome una estructura de bucle o “hairpin”.

Debido a estas características, se decidió utilizar el vector pKANNIBAL para generar la construcción para el silenciamiento del gen *SAD1* en *J. curcas*. Este vector también fue diseñado con sitios de reconocimiento para la enzima NotI, los cuales permiten escindir la construcción de silenciamiento para ser transferida a otro vector. En este caso se decidió subclonar la construcción de silenciamiento en el vector de clonación pBluescript KS(+) (figura 2.5.C).

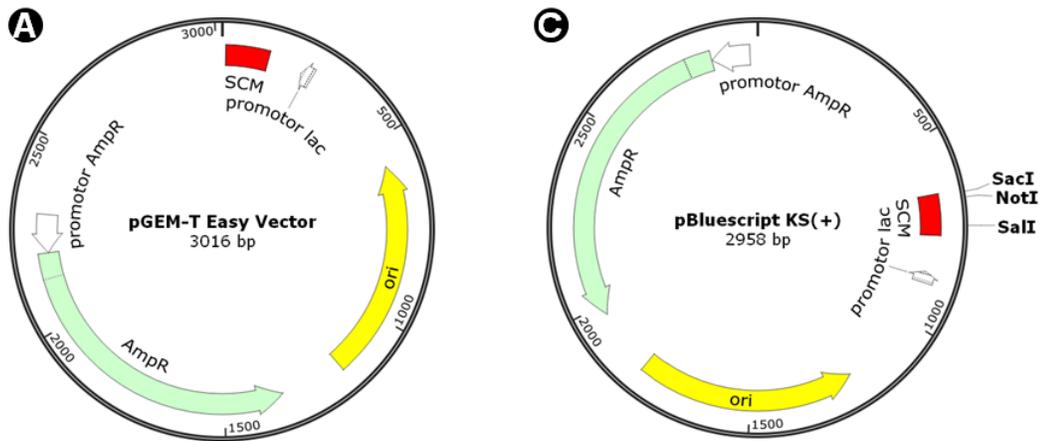
El vector de clonación pBluescript KS(+) contiene dentro de la región del “sitio de clonación múltiple” (SCM) un sitio de reconocimiento para la enzima NotI, esto nos permite ligar la construcción escindida de pKANNIBAL en pBluescript, la construcción quedaría flanqueada por sitios para las endonucleasas SacI y Sall, los cuales nos permitirían escindirla nuevamente para ser transferida al SCM del vector pCAMBIA1301 (figura 2.5.D), el cual, también cuenta con sitios de reconocimiento para esas enzimas dentro de la región de SCM.

El vector pCAMBIA1301 tiene una secuencia *GUSA*, que codifica para una proteína β -D-glucuronidasa esta secuencia codificante se encuentra interrumpida por un intrón, de modo que la actividad biológica de la β -D-glucuronidasa, solo puede estar presente si la transcripción de la secuencia *GUSA* se realizó dentro de las células vegetales.

La expresión de la secuencia *GUSA* está controlada por el promotor 35SCaMv, mientras que la secuencia *HygR* que codifica para una higromicina

fosfotransferasa, se encuentra bajo el control del promotor de 35SCaMv duplicado, esto con el fin de aportar resistencia a higromicina a las células vegetales transformadas con esta secuencia. Al igual que el vector pKANNIBAL, también contiene una secuencia *KanR* para resistencia a Kanamicina en células de *E. coli*.

Este vector también contiene las regiones de los bordes izquierdo y derecho del ADN de transferencia (ADN-T) del plásmido Ti, —originario del género *Agrobacterium*—, los bordes del ADN-T, permiten que la maquinaria celular de las bacterias del genero *Agrobacterium* puedan escindir la región flanqueada por esas secuencias —mitad superior del vector de figura 2.5 D—, la cual, posteriormente será exportada al interior de las células vegetales.



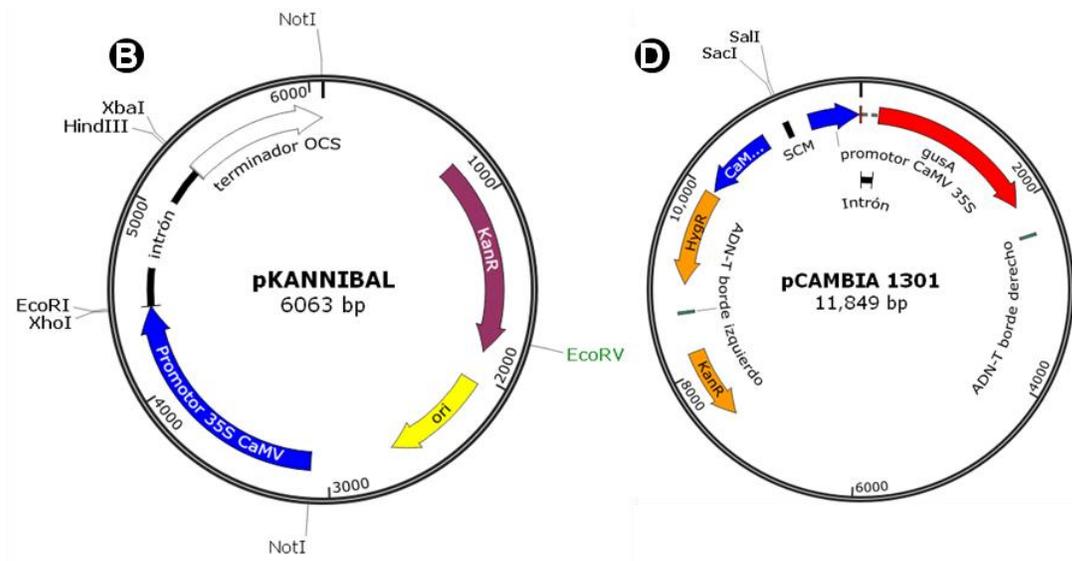


Figura 2.5. Mapas de los vectores utilizados.

A) Mapa del vector pGEM®-T Easy Vector, B) Mapa del vector pKANNIBAL, C) Mapa del vector pBluescript KS(+), D) Mapa del vector pCAMBIA1301.

2.6. CEPAS.

Se utilizó la cepa *E. coli* DH5α para clonar los vectores necesarios durante el proceso de construcción de la secuencia *ihp-JcSAD1*, así como los vectores necesarios para transformar las células vegetales, mientras que para la transformación de callos se utilizó *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404.

2.7 CEBADORES Y ENDONUCLEASAS.

A partir de los cebadores CC_F y CC_R diseñados por Cristy Catzin durante su trabajo de doctorado (en curso) —en el mismo equipo de trabajo— para aislar un fragmento del gen *JcSAD1*, se sintetizaron nuevos oligonucleótidos (tabla 2.7) a los cuales, se les agregaron secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción, estos sitios de corte permiten ligar los amplicones en pKANNIBAL en orientación sentido (amplicón obtenido con par_1) y antisentido (amplicón obtenido con par_2). Los cebadores fueron sintetizados por la compañía Sigma Aldrich®, mientras que las enzimas de restricción se adquirieron en la compañía New England BioLabs Inc.

Tabla 2.7 Cebadores y endonucleasas utilizados durante la construcción de ihp-*JcSAD1*.

Identificación del cebador	Secuencia cebadores (5'→3')	Endonucleasa
CC_F	AGTTCGGGATGAAACTGGTG	-----
CC_R	TCATGTCGCTTCTCATCTGC	-----
par1_F	GATCTCGAGTTCGGGATGAAACTGGTG	XhoI
par1_R	AAAGAATTCATGTCGCTTCTCATCTGC	EcoRI
par2_F	GATTCTAGAGTTCGGGATGAAACTGGTG	XbaI
par2_R	GATAAGCTTCATGTCGCTTCTCATCTGC	HindIII
par6_F	TCCCACTATCCTTCGCAAGACC	-----
par6_R1	ATCCAGACTGAATGCCACA	-----
par6_R2	TAGGTTTGACCGTTCTGCC	-----

2.8 FRAGMENTO DE *JcSAD1*.

A partir de semillas de *J. curcas*, Cristy Catzin logró aislar un fragmento de 341 pb del gen *JcSAD1* (figura 3.2.4.1) utilizando los cebadores CC_F y CC_R, el cual ligó en el vector pGEM®-T Easy, para obtener el vector pGEM-*JcSAD1* (figura 2.8.2), lo propagó y criopreservó en células de *E. coli* DH5 α .

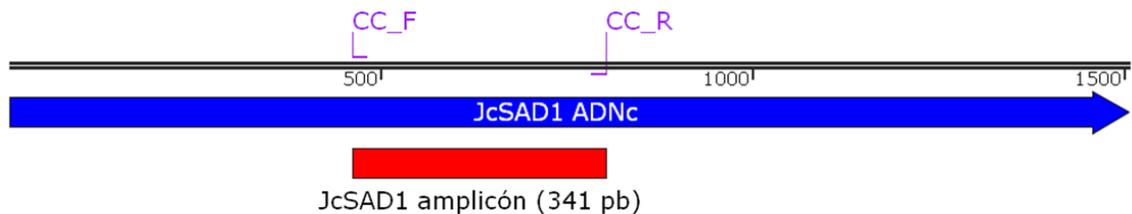


Figura 2.8.1 Diagrama de obtención del fragmento de *JcSAD1*.

Esquema de hibridación del par de cebadores CC_F y CC_R en el ADNc de *JcSAD1*, y el amplicón resultante de una PCR con esos oligonucleótidos.

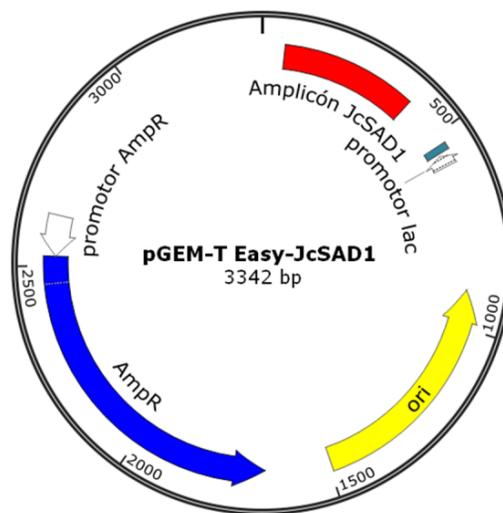


Figura 2.8.2 Mapa del vector pGEM-T-*JcSAD1*.

Para comprobar la integridad e identidad de la secuencia del fragmento *JcSAD1* por Cristy Catzyn y así, tener la certeza de que la secuencia con la que se trabajaría posteriormente era correspondiente al gen *SAD1* de *J. curcas*, la muestra (ADNp) de pGEM-*JcSDA1* se mandó a secuenciar a Clemson University Genomics Institute (CUGI).

La secuenciación se realizó utilizando los cebadores universales “M13 Forward” y “M13 Reverse”. La secuencia obtenida fue analizada con el programa bioinformático SnapGene® Viewer V. 2.1, así como con la herramienta bioinformática BLASTn.

Para la realización de este trabajo, se partió de las cepas de criopreservadas (-80°C) por Cristy Catzin, las cuales, contenían el vector pGEM-*JcSAD1*. De estas células se tomó una alícuota (50 µL) para inocular 10 mL de medio LB líquido + 100 mg/L de ampicilina. El cultivo se dejó crecer toda la noche, a 37°C en agitación constante a 200 rpm.

Después de aproximadamente 12 horas de incubación se dividieron los 10 mL de cultivo en dos volúmenes de 5 mL, con una de ellas se procedió a realizar el protocolo de criopreservación de las cepas de *E. coli* DH5α, el cual consistió en hacer 10 alícuotas de 500 µL del cultivo (en tubos de 1.5 mL) a los cuales, se les agregó el mismo volumen de glicerol —previamente esterilizado—, una vez agregado el glicerol se taparon y agitaron en vortex por 30 segundos, y se sumergieron en nitrógeno líquido por 1 min. Finalmente se pasaron del nitrógeno líquido al ultracongelador para mantenerlas indefinidamente a -80°C.

Con los 5 mL restantes del cultivo se procedió a realizar la extracción de ADN plasmídico (ADNp), protocolo modificado de [60]. Se transfirieron 1.5 mL de medio de cultivo bacteriano a un tubo nuevo estéril de 1.5 mL, se colectaron las bacterias por centrifugación, se decantó el sobrenadante y se repitió lo anterior para incrementar la cantidad de células en el tubo. La pastilla de células fue resuspendida en 150 μ L de solución I (tabla 3.2.4), posteriormente, se añadieron 300 μ L de solución II y se agitó la muestra por medio de inversión intensa durante 15 s, y se dejó en hielo durante 5 min, se agregaron 300 μ L de solución III y mezcló por inversión suave durante 10 s para posteriormente dejarla 10 min en hielo.

Una vez transcurridos los 10 min, la muestra fue centrifugada 10 min a 12 000 x g se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo estéril y se agregaron 700 μ L de isopropanol absoluto frio, se mezcló bruscamente y se dejó en hielo por 10 min. Posteriormente centrifugar a 12 000 x g por 10 min, se decantó el isopropanol y resuspendió la pastilla de ADNp en 1 mL de etanol frio al 70%, se centrifugó nuevamente a 12 000 x g 10 min, se decantó el etanol y colocó el tubo abierto en posición invertida sobre papel absorbente durante 20 min, finalmente se resuspendió el ADNp en 20 μ L H₂O bidestilada estéril.

Tabla 2.8 Composición de soluciones para extracción de ADN plasmídico.

Solución I:	Solución II:	Solución III (50 ml):
Glucosa 50 mM	NaOH 200 mM	5 M acetato de potasio (30 mL)
Tris-HCl 25 mM (PH=8)	SDS 1%	Acido acético glacial (5.75 mL)
EDTA 10 mM (PH=8)		

2.9 CONSTRUCCIÓN pK-ihp-*JcSAD1*.

Una vez extraído el ADNp (pGEM®-T-*JcSAD1*), se utilizó como muestra para una reacción de PCR con los cebadores par2_F y par2_R (tabla 3.2.3), para obtener el fragmento al que llamamos “*JcSAD1as*”, ya que el objetivo de esta secuencia era ser ligada en orientación antisentido en el vector pKANNIBAL, para generar el vector pK-*JcSAd1as* (figura 3.2.6). La reacción de PCR se realizó a las condiciones de la tabla 3.2.5.

Tabla 2.9 Condiciones de PCR para amplificar los fragmentos *JcSAD1as* y *JcSAD1s*.

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	
Desnaturalización inicial	94	180	
Desnaturalización	94	120	35 ciclos
Hibridación	55	30	
Extensión	68	45	
Extensión final	68	300	

Las mismas condiciones de PCR se utilizaron posteriormente con los cebadores par1_F y par1_R, para generar un fragmento al que llamamos “*JcSAD1s*”, el cual, será ligado en orientación sentido en el vector pK-*JcSAD1as*.

Los amplicones generados, “*JcSAD1s*” y “*JcSAD1as*”, se ligaron por separado en el vector de clonación pGEM®-T Easy Vector, para formar los vectores pGEM-*JcSAD1s* y pGEM-*JcSAD1as* (figura 2.9.1), con los cuales se transformó por choque térmico, células de *E. coli* DH5 α . Una vez transformadas, se cultivaron en medio LB semisólido + X-gal + ampicilina 100 mg/L, y se incubaron a 37°C durante

14 h. Las colonias blancas formadas, se picaron para inocular 2 mL medio LB líquido + ampicilina 100 mg/L y se incubaron a 37°C a 200 rpm durante 14 h. A los tubos que mostraron crecimiento se les realizó extracción de ADNp usando el kit “PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit” de Invitrogen™.

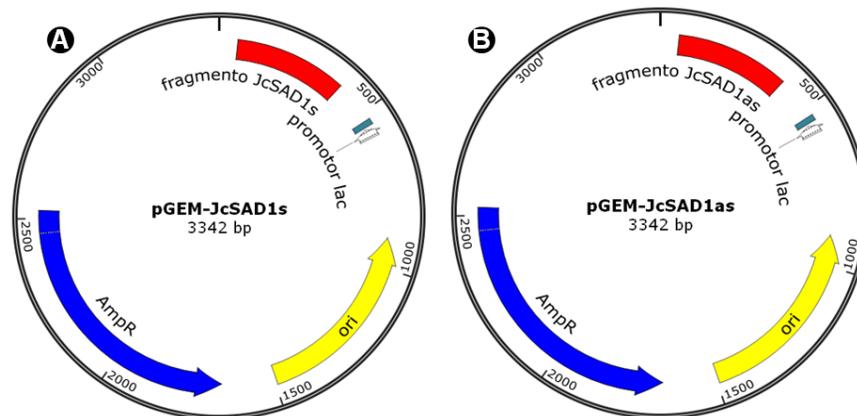


Figura 2.9.1 Mapas de vectores de clonación.

A) pGEM-*JcSAD1as*, B) pGEM-*JcSAD1as*.

Las muestras de ADNp de colonias distintas, fueron analizadas por PCR (condiciones de la tabla 3.2.5) con los cebadores correspondientes a cada inserto, y las positivas al PCR fueron digeridas con las endonucleasas correspondientes a los cebadores para producir el inserto contenido en cada muestra de ADNp.

Una vez identificadas colonias positivas a los vectores pGEM-*JcSAD1as* y pGEM-*JcSAD1s*, se procedió a realizar la construcción *ihp-JcSAD1*, para lo cual, primero se digirió el vector pGEM-*JcSAD1as* con las enzimas XbaI y HindIII, debido a que en los cebadores par2 se agregaron sitios de reconocimiento para dichas enzimas (tabla 2.7). Simultáneamente, se digirió el vector pKANNIBAL con las mismas enzimas.

Una vez terminado el tiempo de digestión, se procedió a cargar el total (20 μ L) del producto de digestión en un gel de agarosa al 0.8% y se realizó una electroforesis (80 voltios por 50 min). Las bandas que correspondían a la masa molecular del fragmento de interés (~350 pb, para el caso de la digestión del vector pGEM-*JcSAD1as*, y ~6 Kb para la digestión de pKANNIBAL), fueron cortadas del gel y purificadas con el kit “Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit” de Zymo Research Corporation.

Una vez purificadas las secuencias de interés, se procedió a mezclarlas de la siguiente manera: ~30 ng del vector pKANNIBAL + 150 ng del fragmento *JcSAD1as* + 2 μ L de 10X buffer de ligación, se incubó a 60°C por 20 min para inactivar cualquier resto de enzima de digestión y se agregó 0.5 μ L (1000 U) de T4 ligasa (New England BioLabs Inc.) y se ajustó con agua desionizada estéril a un volumen final de 20 μ L, se incubó 1 h a temperatura ambiente. Como producto de esta ligación se esperaba la formación del vector pK- *JcSAD1as*.

Terminada la ligación se procedió a transformar células competentes de *E. coli* DH5 α , se cultivaron en medio semisólido + Kanamicina (50 mg/L), durante toda la noche a 37°C, se picaron colonias para inocular medio líquido + kanamicina para posteriormente hacerles extracción de ADNp.

Con las muestras de ADNp identificadas como positivas a la formación del vector pK-*JcSAD1as* (figura 2.9.2), se procedió a hacer la digestión de dicho vector con las enzimas XhoI + EcoRI, y las mismas enzimas se utilizaron para digerir simultáneamente el vector pGEM-*JcSAD1s*.

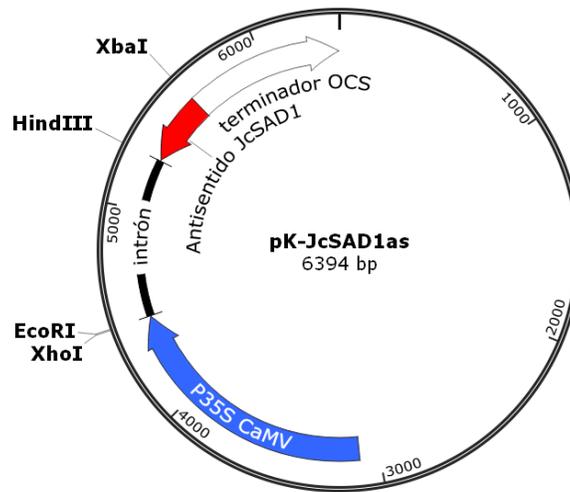


Figura 2.9.2 Mapa del vector pK-*JcSAD1*.

Terminadas las digestiones, los productos de ambas digestiones se corrieron en una electroforesis. Se cortaron y purificaron las bandas correspondientes a fragmentos de ~350 pb para el caso de la digestión de pGEM-*JcSAD1s* y de ~6 Kb para la muestra de digestión de pK-*JcSAD1as*.

Una vez purificados ambos fragmentos, se procedió a realizar la ligación de ambos, siguiendo el mismo protocolo de la ligación anterior. Posteriormente se transformaron células de *E. coli* DH5 α , para finalmente obtener muestras de ADNp susceptible a ser analizado con la intención de identificar la correcta formación del vector pK-ihp-*JcSAD1* (figura 3.3.3 C), dicho análisis se realizó mediante digestión enzimática con las endonucleasas XbaI y XhoI. Este mismo análisis se realizó *in silico* con el programa bioinformático GENTle V 1.9.4 para cotejar los resultados *in silico* e *in vitro* (figura 3.3.3 A y B).

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 CALLOS DE *J. CURCAS*.

Después de 1 mes de crecimiento en medio de germinación (tabla 2.2.1) y en condiciones de fotoperiodo 16:8 —horas luz:oscuridad— a 25°C, las plántulas obtenidas alcanzaron un tamaño que permitió usar el hipocótilo (~1.5 cm de longitud) para generar callos.

Los hipocótilos colocados en medio IC (tabla 2.2.2), formaron callos después de un mes, pero como nos importaba multiplicar los tejidos callosos, estos fueron transferidos a un medio para IC líquido, ya que en medio líquido con agitación constante se obtiene una mayor proliferación [49]. En este medio, los callos continuaron proliferando sin formar otras estructuras —como se aprecia en la figura 3.1.) —.

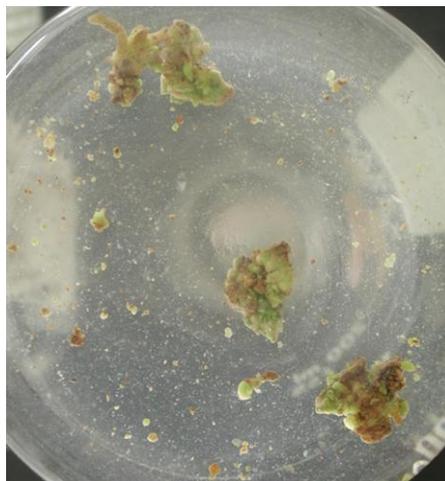
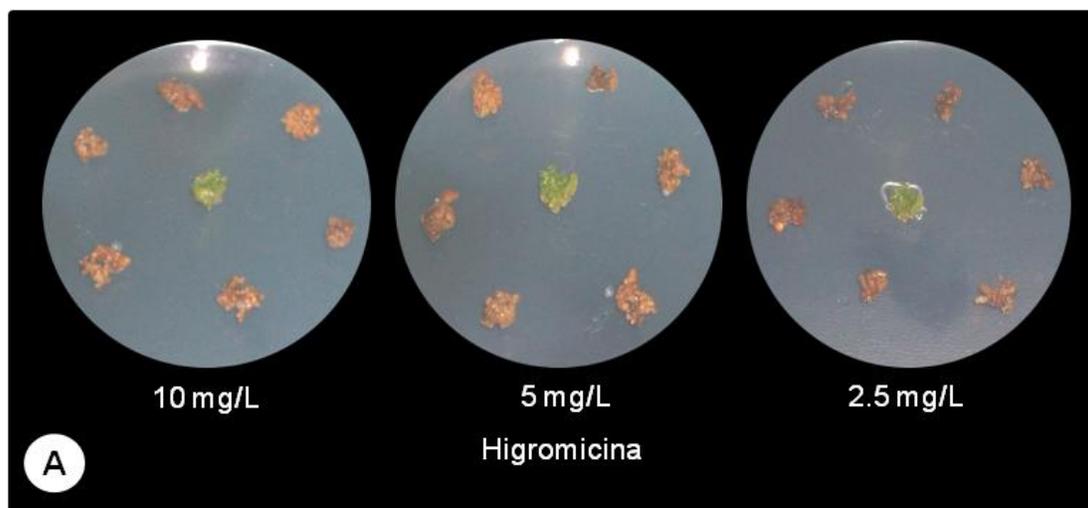


Figura 3.1. Callos de *J. curcas*.

3.2 ANTIBIOGRAMA.

Los resultados de los antibiogramas de callos de *J. curcas* contra los antibióticos higromicina (Figura 3.2 A) y Kanamicina (Figura 3.2 B) mostraron los callos de *J. curcas* son susceptibles a ambos antibióticos, debido al claro estado necrótico que mostraron después de un mes en presencia de dichos antibióticos, comparados con el tratamiento testigo. Sin embargo, los callos tratados con higromicina mostraron un estado de necrosis más evidente que los callos tratados con kanamicina, este patrón se mantuvo en todas las concentraciones utilizadas, no se realizaron estudios más detallados sobre esto, porque no se disponía de material suficiente, ni era parte fundamental del trabajo, era solo para corroborar que los callos de *J. curcas* generadas en nuestro laboratorio se comportaban de acuerdo a lo reportado en la bibliografía [34;35;58].



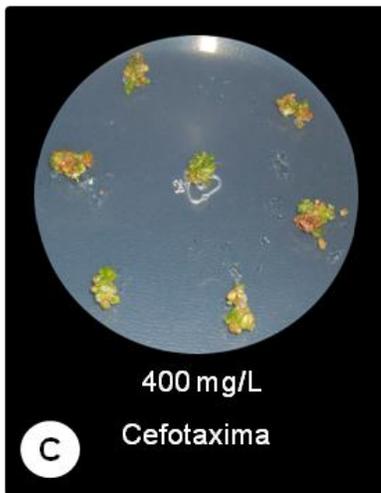
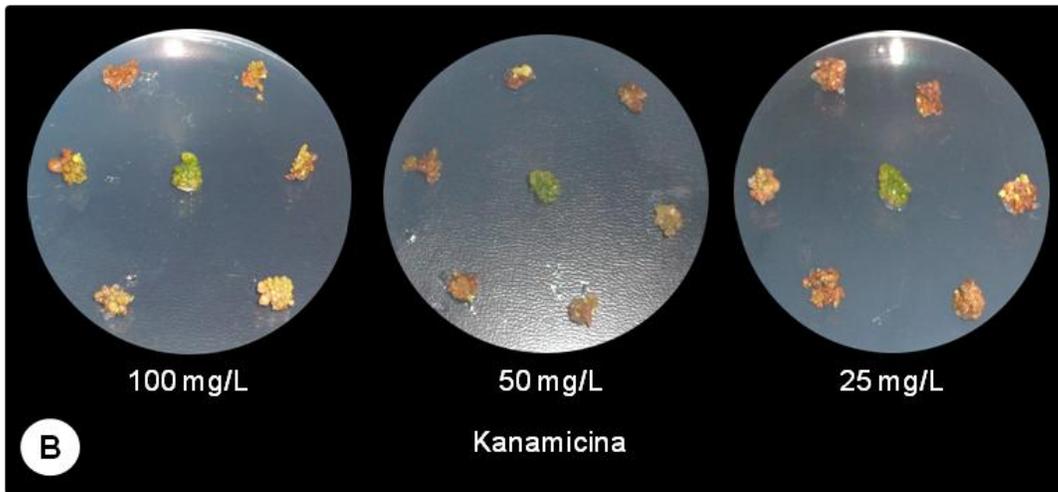


Figura 4.3.1 Antibiograma de callos de *J. curcas*. A) Callos de *J. curcas* vs higromicina, el callo del centro de cada imagen es el tratamiento testigo, B) Callos de *J. curcas* vs kanamicina, C) callos de *J. curcas* vs cefotaxima.

Este ensayo también sirvió para decidir con mayor certeza cuál era el mejor vector de transformación de plantas que se podía utilizar para nuestros explantes de callos, ya que disponía de dos vectores, uno que aportaba resistencia a kanamicina —pCAMBIA 2301— y otro para higromicina —pCAMBIA 1301—. En base a estos resultados obtenidos se decidió utilizar el vector pCAMBIA 1301.

Por otra parte, mediante el antibiograma contra cefotaxima (Figura 3.2 C), se comprobó que este antibiótico no presenta un efecto tóxico visible después de un mes de tratamiento sobre los callos de *J. curcas*, lo cual se corresponde a la bibliografía mencionada en la tabla 1.3.1. Este resultado confirma que es seguro utilizar cefotaxima eliminar *A. tumefaciens* después de la infección de nuestros explantes, ya que no perjudica a los callos tratados y se pueden seguir utilizando durante el posterior mantenimiento de los callos así como los procesos de regeneración.

3.3 TRANSFORMACIÓN DE CALLOS DE *J. CURCAS*.

Los callos transformados, sometidos a la prueba histoquímica GUS mostraron una clara coloración azul (figura 3.3. A) respecto del tratamiento testigo (figura 3.3. B), estos resultados se corresponden a lo reportado en los trabajos sobre transformación de *J. curcas* presentados en la tabla 1.3.1.

Una de las ventajas que presenta el vector pCAMBIA 1301 es, que debido a un intrón que interrumpe la secuencia GUSA (véase sección 2.5 VECTORES) la coloración no puede ser producida por células de *A. tumefaciens* presentes en el explante, por lo tanto, si el tratamiento testigo no presenta coloración azul —como es el caso— la color azul solo puede deberse a la actividad biológica de la proteína heteróloga β -glucoronidasa [53].

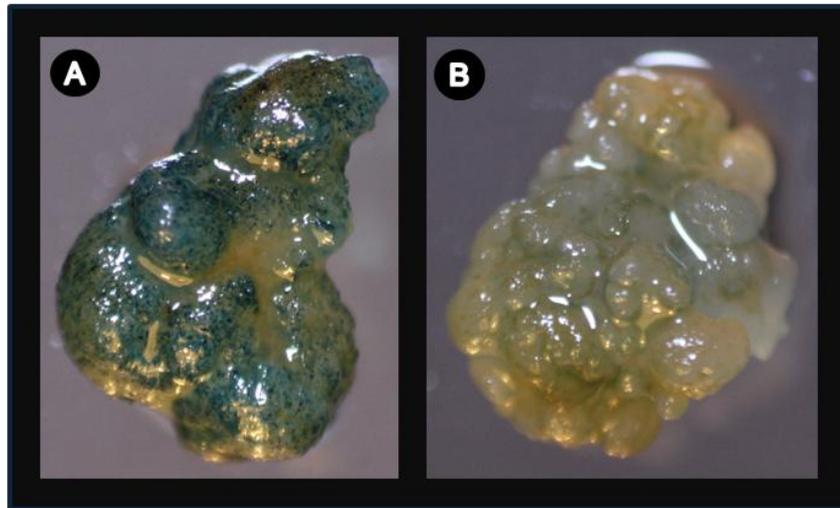


Figura 3.3 Prueba histoquímica de GUS a callos de *J. curcas*.

A) Callo de *J. curcas* positivo a la prueba histoquímica GUS, B) Tratamiento testigo, negativo a la prueba GUS.

Debido a lo anterior, cuando se trabaja con este tipo de vectores, no es necesario eliminar *Agrobacterium*, para realizar la tinción histoquímica GUS, esto solo se requiere cuando el tejido transformado será utilizado para fines distintos a la prueba histoquímica de GUS.

3.4. FRAGMENTO DE *JcSAD1*.

La región secuenciada del vector pGEM-*JcSAD1*, demostró que efectivamente contiene un inserto correspondiente al tamaño esperado, así como sitios de unión a los oligonucleótidos usados para generar el fragmento insertado (figura 3.4.1 A). Así mismo, se analizó la identidad del fragmento flanqueado por ese par de cebadores utilizando BLASTn, y se vio que tiene una perfecta homología con una región del ADNc de *SAD1* de *J. curcas* (gb|DQ084491.1|) (figura 3.4.1 B), basado

en estas evidencias se puede asegurar que el fragmento contenido en pGEM-*JcSAD1* corresponde a una región del gen *JcSAD1*.



B

Jatropha curcas stearyl-ACP desaturase mRNA, complete cds

Sequence ID: gi|68144099|gb|DQ084491.1 Length: 1506 Number of Matches: 1

Range 1: 463 to 801 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
627 bits(339)	3e-176	339/339(100%)	0/339(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGTTCGGGATGAAACTGGTGCTAGCCTTACTTCTTGGGCAATTTGGACAAGGGCATGGAC	60		
Sbjct 463	AGTTCGGGATGAAACTGGTGCTAGCCTTACTTCTTGGGCAATTTGGACAAGGGCATGGAC	522		
Query 61	TGCTGAAGAGAATAGACATGGCGACCTTCTCAATAAGTATCTCTATCTGTCTGGACGAGT	120		
Sbjct 523	TGCTGAAGAGAATAGACATGGCGACCTTCTCAATAAGTATCTCTATCTGTCTGGACGAGT	582		
Query 121	GGACATGAGGCAAATTGAGAAGACAATTCAATATTTGATTGGATCAGGAATGGATCCACG	180		
Sbjct 583	GGACATGAGGCAAATTGAGAAGACAATTCAATATTTGATTGGATCAGGAATGGATCCACG	642		
Query 181	GACTGAAAACAGTCCCTATCTTGGATTCACTACACATCATTCCAAGAAAGGGCAACGTT	240		
Sbjct 643	GACTGAAAACAGTCCCTATCTTGGATTCACTACACATCATTCCAAGAAAGGGCAACGTT	702		
Query 241	CATCTCGCATGGAAACACTGCCAGACTTGCCAAAGAACATGGAGACATAAAGTTGGCTCA	300		
Sbjct 703	CATCTCGCATGGAAACACTGCCAGACTTGCCAAAGAACATGGAGACATAAAGTTGGCTCA	762		
Query 301	AATATGTGGTACAATTGCTGCAGATGAGAAGCGACATGA 339			
Sbjct 763	AATATGTGGTACAATTGCTGCAGATGAGAAGCGACATGA 801			

Figura 3.4.1 Analisis del fragmento insertado en el vector pGEM-*JcSAD1*.

A) Esquema generado con SnapGene® Viewer V. 2.1 a partir de la secuenciación de pGEM-*JcSAD1*. B) Alineamiento resultado de BLASTn entre la el fragmento insertado en pGEM-*JcSAD1* y la secuencia reportada de *JcSAD1*.

Mediante BLASTn, se encontró que la secuencia del fragmento de *JcSAD1* comparte una alta homología con secuencias de plantas de conocida importancia industrial, siendo la secuencia del ARNm del gen *SAD* de *Cinnamomum longipaniculatum*, la que presenta mayor homología con el fragmento *JcSAD1* (figura 3.3.2 A), mientras que la secuencia del ARNm de *SAD* de *Lotus coniculatus* (figura 3.3.2 B) y una secuencia de ARNm de *Zea mays* (figura 3.3.2 C), son las que presentan menor similitud. Sin embargo, aun en estas secuencias, la similitud con el fragmento de *JcSAD1* podría permitir el silenciamiento por ARNi debido a que tienen regiones homologas mayores a 24 nucleótidos, las cuales pueden ser reconocidas por la maquinaria de silenciamiento por ARNi [47].



B

Lotus corniculatus var. japonicus acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase mRNA, complete cds
Sequence ID: [gi|67633222|gb|DQ020280.1](#) Length: 1325 Number of Matches: 1

Range 1: 541 to 880 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
268 bits(145)	2e-68	275/340(81%)	0/340(0%)	Plus/Plus
Query 2	G TTCGGGATGAAACTGGTGTAGCCTTACTTCTTGGGCAATTTGGACAAGGGCATGGACT	61		
Sbjct 541	G TTCGTGATGAAACAGGGGCCAGCCCTACTCCGTGGGGAATTTGGACAAGGGCATGGACT	600		
Query 62	G CTGAAGAGAATAGACATGGCGACCTTCTCAATAAGTATCTCTATCTGTCTGGACGAGTG	121		
Sbjct 601	G CTGAAGAAAATAGACAGGGTATCTGCTTAACAAATCTTTACTTGTGTGGACGTGTT	660		
Query 122	G AATGAGGCAAAATGAGAAGACAATTCAATATTTGATTGGATCAGGAATGGATCCACGG	181		
Sbjct 661	G AATGAGACAAAATGAGAAGACAATTCAATACCTGATTGGGTCTGGAAATGGATCCCTCGA	720		
Query 182	A CTGAAAACAGTCCCTATCTTGGATTTCATCTACACATCATTCCAAGAAAGGGCAACGTTT	241		
Sbjct 721	A CTGAGAACAGCCCTACCTTGGTTTCATCTACACTTCATTCAGAGAGGGCGACCTTT	780		
Query 242	A TCCTCGCATGGAAACACTGCCAGACTTGCCAAAGAACATGGAGACATAAAGTTGGCTCAA	301		
Sbjct 781	A TTTCCACGGAACACGGCCAGCATGCTAAGGAGCATGGTGATATAAAGCTGGCTCAG	840		
Query 302	A TATGTGGTACAATTGCTGCAGATGAGAAGCGACATGAGA	341		
Sbjct 841	A TCTGTGGTCTGATCGCCGCTGATGAGAAACGCCACGAGA	880		

C

Zea mays LOC100283843 (csu333), mRNA
Sequence ID: [gi|226499471|ref|NM_001156741.1](#) Length: 1696 Number of Matches: 1
[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 622 to 954 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
255 bits(138)	1e-64	269/334(81%)	2/334(0%)	Plus/Plus
Query 1	A GTTCGGGATGAAACTGGTGTAGCCTTACTTCTTGGGCAATTTGGACAAGGGCATGGAC	60		
Sbjct 622	A GTTCGGGATGAAACTGGTGCAGTCCAACACGTGGGCGGTTGGACAAGGGCATGGAC	681		
Query 61	T GCTGAAGAGAATAGACATGGCGACCTTCTCAATAAGTATCTCTATCTGTCTGGACGAGT	120		
Sbjct 682	A GCTGAAGAGAACAGACATGGTGCACCTCCTTAACAAGTACATGTACCTTACTGGACGGGT	741		
Query 121	G GCATGAGGCAAATGAGAAGACAATTCAATATTTGATTGGATCAGGAATGGATCCACG	180		
Sbjct 742	T GCATGAAACAAATGAGAAGACCATACAATATCTGATTGGTCCGGAAATGGATCCTGG	801		
Query 181	G ACTGAAAACAGTCCCTATCTT-GGATTCATCTACACATCATTCCAAGAAAGGGCAACGT	239		
Sbjct 802	A ACTGAGAACACCCCTA-CTTGGGTTCTCTACACATCATTCCAAGAAAGGGCAACGT	860		
Query 240	T CATCTCGCATGGAAACACTGCCAGACTTGCCAAAGAACATGGAGACATAAAGTTGGCTC	299		
Sbjct 861	T TGTGTGCGCATGGGAATACTGCAAGGCATGCCAAGGAGTATGGTGATCTCAAGCTGGCC	920		
Query 300	A AATATGTGGTACAATTGCTGCAGATGAGAAGCG	333		
Sbjct 921	A GATATGTGGCACGATAGCAGCCGATGAGAAGCG	954		

Figura 3.4.2 Analisis filogenetico del fragmento *JcSAD1*.

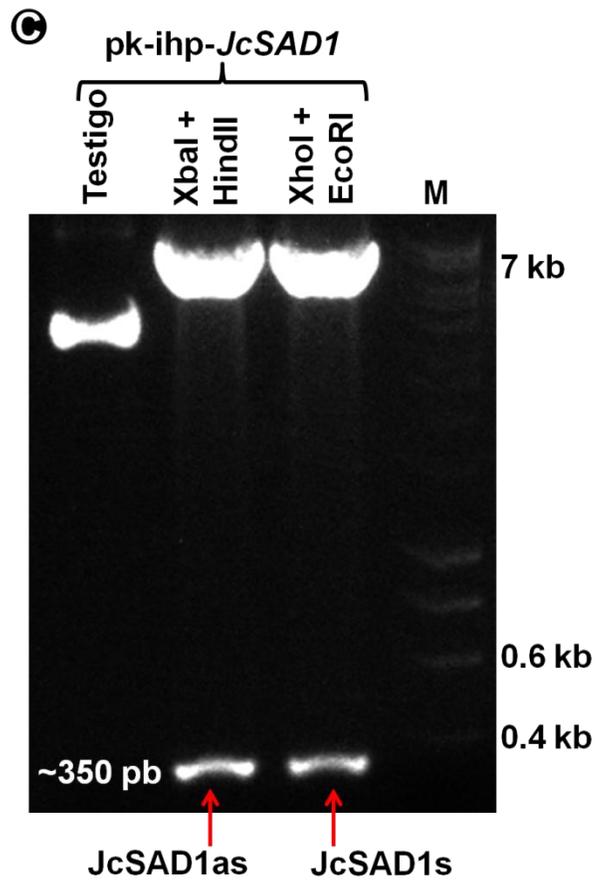
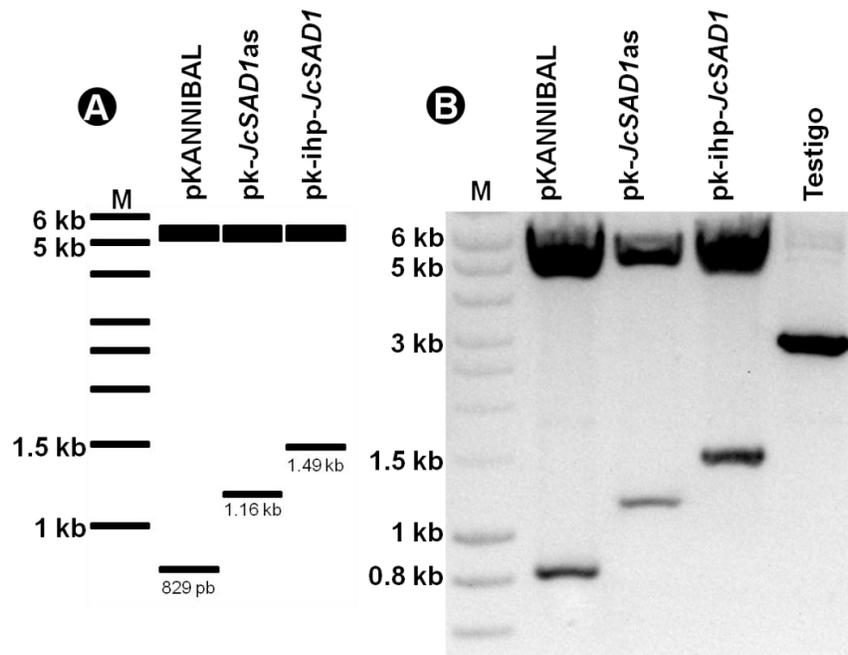
A) Árbol filogenético elaborado con el resultado de una búsqueda en Blastn para encontrar secuencias ortólogas al fragmento *JcSAD1*, B) los recuadros rojos son regiones de alta homología entre el fragmento de *JcSAD1* utilizado para la construcción de silenciamiento y la secuencia de *LcSAD*, C) los recuadros rojos

son regiones de alta homología entre el fragmento de *JcSAD1* utilizado para la construcción de silenciamiento y una secuencia de *Zea mays*.

3.3.2. CONSTRUCCIÓN pK-ihp-*JcSAD1as*.

Para comprobar la correcta formación de la construcción de ihp-*JcSAD1*, se digirió el ADNp de pK-ihp-*JcSAD1* con las enzimas XhoI y XbaI, esto se realizó tanto *in silico* como *in vitro*, (figura 3.3.3 A y B), y se decidió utilizar esta digestión porque era la que desde el principio hasta el final del proceso aportaría más información sobre la integridad del vector, pero sobre todo la integridad de la región donde se realizarían las ligaciones.

Sin embargo, también se realizaron las digestiones necesarias para liberar cada fragmento, sentido "*JcSAD1s*" y antisentido "*JcSAD1as*" del vector pK-ihp-*JcSAD1* con las enzimas correspondientes para cada fragmento (figura 3.3.3 C). Sin embargo, debido al tamaño del fragmento, para obtener bandas suficientemente intensas del fragmento liberado, era necesario utilizar una alta concentración del vector, lo cual requería utilizar muestra que podía ser necesaria para posteriores ensayos. Es por esto, que la liberación de los fragmentos de interés no era la mejor forma para saber si el fragmento se había insertado correctamente, sin embargo se realizaba como una segunda prueba. El resultado de ambos ensayos nos permite suponer con un alto grado de certeza la correcta secuencia de la construcción ihp-*JcSAD1* (figura 3.3.3 D).



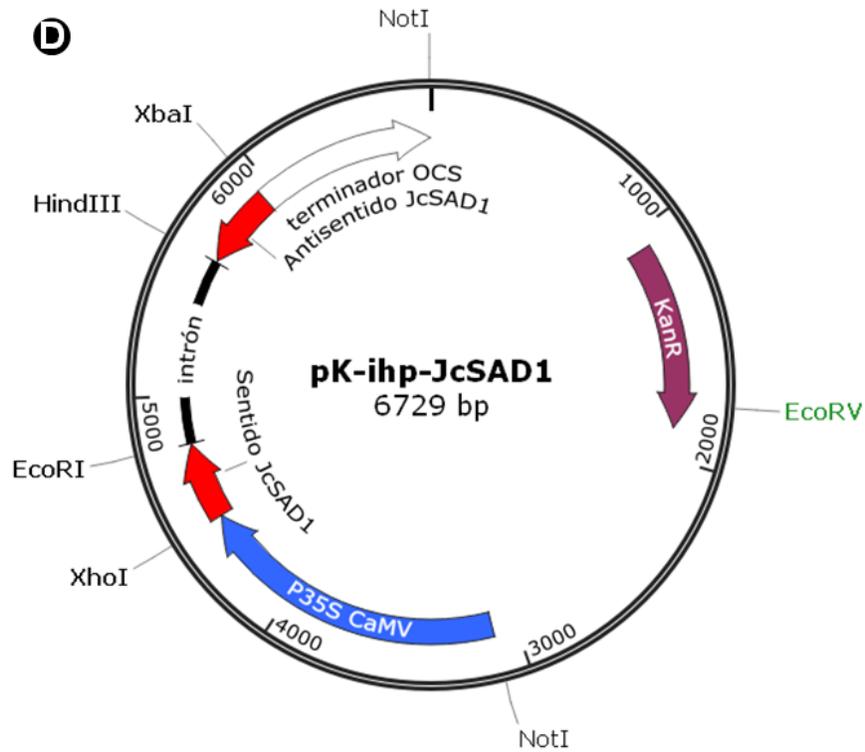


Figura 3.3.3 Constructo de silenciamiento “ihp-*JcSAD1*”.

A) Electroforesis *in silico* realizado con el software GENTle V 1.9.4. B) Gel de electroforesis en agarosa, “Testigo” es la misma muestra de pKANNIBAL pero sin digerir, C) Digestiones para liberar los fragmentos sentido y antisentido, el tratamiento testigo es el vector pK-ihp-*JcSAD1* sin digerir, D) mapa del vector pK-ihp-*JcSAD1*.

CONCLUSIONES

Se logro establecer una metodología para transformar callos de *J. curcas* mediante *A. tumefaciens*, utilizando en vector pCAMBIA1301 como vector de transformación de plantas. También, se generó un constructo de ADN que de acuerdo a lo reportado en la bibliografía, se espera que tenga un efecto potente y específico sobre el gen *SAD1* de *J. curcas*. Sin embargo por cuestión de tiempo no fue posible combinar ambos logros para obtener tejidos vegetales modificados genéticamente con dicha construcción.

Se comprobó mediante análisis bioinformáticos que la construcción de silenciamiento "*ihp-JcSAD1*", podría funcionar en otros modelos vegetales para silenciar genes ortólogos a *JcSAD1*, ya que la secuencia utiliza en la construcción comparte una elevada similitud con secuencias de otras especies vegetales de gran importancia.

Por lo anterior, considero que la construcción "*ihp-JcSAD1*" puede ser una herramienta valiosa para el estudio de la ruta de biosíntesis en otros sistemas vegetales.

En este trabajo han establecido metodologías y generado herramientas que contribuyan al estudio subsecuente estudio de *J. curcas* los cuales se espera culminen en la generación de variedades mejoradas, que hagan a *J. curcas* una opción más atractiva como cultivo bioenergético, con el fin de acercarnos un poco más al tan buscado desarrollo sostenible.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas para este trabajo, solo sería necesario introducir la construcción *ihp-JcSAD1* en pCAMBIA 1301, lo cual requerirá una sublocación en el vector pBluescript KS(+) (figura 2.5 C) y transformar callos de *J. curcas*, para obtener brotes transformados. Esto se podría lograr utilizando las metodologías ya estandarizadas en este trabajo.

Esto se puede lograr utilizando la endonucleasa NotI para poder ligar la construcción *ihp-JcSAD1* en pBluescript KS(+), y una vez realizado esto la construcción podrá ser transferida a pCAMBIA 1301 usando las endonucleasas Sall y SacI.

Una vez logrado esto, será posible transformar callos de *J. curcas* siguiendo la metodología establecida en este trabajo. Para comprobar que los tejidos regenerados verdaderamente estén transformados y han integrado la construcción *ihp-JcSAD1*, se podrá realizar un análisis de PCR con los oligonucleótidos *par_6* (tabla 2.7). los cebadores *par6_F* + *par6_R1* permitirán detectar el vector pCAMBIA 1301 [35], mientras que el par, *par6_F* + *par6_R2* servirán para detectar la construcción *ihp-JcSAD1*.

Estas mismas pruebas moleculares se podrán realizar periódicamente a la progenie de las plantas completas obtenidas, para asegurarse que no se pierdan las secuencias de silenciamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Elshahed MS: Microbiological aspects of biofuel production: Current status and future directions. *J Adv Res* 2010;1:103-111.
- [2] de Oliveira JS, Leite PM, de Souza LB, Mello VM, Silva EC, Rubim JC, Meneghetti SMP, Suarez PAZ: Characteristics and composition of *Jatropha gossypifolia* and *Jatropha curcas* L. oils and application for biodiesel production. *Biomass Bioenerg* 2009;33:449-453.
- [3] King AJ, He W, Cuevas JA, Freudenberger M, Ramiaramananana D, Graham IA: Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. *J Exp Bot* 2-13-2009;60:2897-2905.
- [4] Francis G, Edinger R, Becker K: A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. *Nat Res Forum* 2005;29:12-24.
- [5] Durrett TP, Benning C, Ohlrogge J: Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *Plant J* 2008;54:593-607.
- [6] Knothe G: Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology* 6-25-2005;86:1059-1070.
- [7] Gübitz GM, Mittelbach M, Trabi M: Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Biores Technol* 1999;67:73-82.
- [8] Pimentel D, Patzek TW: Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. *Nat Res Res* 3-1-2005;14:65-76.
- [9] Pramanik K: Properties and use of *Jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. *Renew Ener* 2003;28:239-248.
- [10] Ovando-Medina I, Espinosa-García F, Núñez-Farfán J, Salvador-Figueroa M: Does biodiesel from *Jatropha curcas* represent a sustainable alternative energy source? *Sustainability* 2009;1:1035-1041.

- [11] Lamers P, Hamelinckb C, Jungingerc M, Faaij A: International bioenergy trade-A review of past developments in the liquid biofuel market. *Renew Sust Energ Rev* 2011;15:2655-2676.
- [12] Dehgan B: Phylogenetic significance of interspecific hybridization in *Jatropha* (Euphorbiaceae). *Systematic Botany* 1984;9:467-478.
- [13] Carvalho CC, Clarindo WR, Prac MM, Santos Araújo FS, Carels N: Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. *Plant Sci* 2008;174:613-617.
- [14] Sujatha M, Reddy TP, Mahasi MJ: Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. *Biotechnol Adv* 2008;26:424-435.
- [15] Heller J: *Physic Nut. Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. Rome, Italy, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, International Plant Genetic Resources Institute, 1996.
- [16] Makkar HPS, Becker K, Schmook B: Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. *Plant Food Hum Nutr* 3-1-1998;52:31-36.
- [17] Mazumdar P, Basu A, Paul A, Mahanta C, Sahoo L: Age and orientation of the cotyledonary leaf explants determine the efficiency of de novo plant regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Jatropha curcas* L. *S Afr J Bot* 2010;76:337-344.
- [18] Openshaw K: A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass Bioenerg* 7-1-2000;19:1-15.
- [19] Augustus GDPS, Jayabalan M, Seiler GJ: Evaluation and bioinduction of energy components of *Jatropha curcas*. *Biomass Bioenerg* 2002;23:161-164.
- [20] Banerji R, Chowdhury AR, Misra G, Sudarsanan G, Verma SC, Srivastava GS: *Jatropha* seed oils for energy. *Biomass* 1985;8:277-282.

- [21] Abreu FR, Alves MB, Mac+do CCS, Zara LF, Suarez PAZ: New multi-phase catalytic systems based on tin compounds active for vegetable oil transesterification reaction. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 3-1-2005;227:263-267.
- [22] Li MR, Li HQ, Wu GJ: Study on factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of *Jatropha curcas*. *J Mol Cell Biol* 2006;39:83-87.
- [23] Li M, Li H, Jiang H, Pan X, Wu G: Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 2-22-2008;92:173-181.
- [24] Jako C, Kumar A, Wei Y, Zou J, Barton DL, Giblin EM, Covello PS, Taylor DC: Seed-specific over-expression of an Arabidopsis cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiol* 6-1-2001;126:861-874.
- [25] Knutzon DS, Thompson GA, Radke SE, Johnson WB, Knauf VC, Kridl JC: Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1992;89:2624-2628.
- [26] Shen B, Sinkevicius K, Selinger D, Tarczynski M: The homeobox gene *GLABRA2* affects seed oil content in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 2-3-2006;60:377-387.
- [27] Wang H-W, Zhang B, Hao Y-J, Huang J, Tian A-G, Liao Y, Zhang J-Z, Chen S-Y: The soybean Dof-type transcription factor genes, *GmDof4* and *GmDof11*, enhance lipid content in the seeds of transgenic Arabidopsis plants. *Plant J* 2007;52:716-729.
- [28] Liu Q, Singh SP, Green AG: High-stearic and high-oleic cotton seed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. *Plant Physiol* 8-1-2002;129:1732-1743.
- [29] Misra P, Toppo D, Mishra M, Saema S, Singh G: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation protocol of *Jatropha curcas* L. using leaf and hypocotyl segments. *J Plant Biochem Biot* 2012;21:128-131.

- [30] Purkayastha J, Sugla T, Paul A, Solleti S, Mazumdar P, Basu A, Mohommad A, Ahmed Z, Sahoo L: Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. Biol Plant 3-1-2010;54:13-20.
- [31] Costa G, Cardoso K, Del Bem L, Lima A, Cunha M, de Campos-Leite L, Vicentini R, Papes F, Moreira R, Yunes J, Campos F, Da Silva M: Transcriptome analysis of the oil-rich seed of the bioenergy crop *Jatropha curcas* L. BMC Genomics 2010;11:462.
- [32] Khemkladngoen N, Cartagena J, Fukui K: Physical wounding-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of juvenile cotyledons of a biodiesel-producing plant, *Jatropha curcas* L. Plant Biotechnol Rep 7-1-2011;5:235-243.
- [33] Qu J, Hui-Zhu M, Wen C, Shi-Qiang G, Ya-Nan B, Yan-Wei S, Yun-Feng G, Ye J: Development of marker-free transgenic *Jatropha* plants with increased levels of seed oleic acid. Biotechnol for Biofuels 2012;5:10.
- [34] Li M, Li H, Jiang H, Pan X, Wu G: Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. Plant Cell Tiss Org Cult 2-1-2008;92:173-181.
- [35] Pan J, Fu Q, Xu ZF: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of biofuel plant *Jatropha curcas* using kanamycin selection. Afr J Biotechnol 2010;9:6477-6481.
- [36] Zong H, Wang S, Ouyang C, Deng X, Li L, Li J, Chen F: *Agrobacterium*-mediated transformation of *Jatropha curcas* young leaf explants with lateral shoot-inducing factor (*LIF*). International Journal of Agriculture and Biology 2010;12:891-896.
- [37] Trivedi S, Gaudani H, Gupta M, Gupta N, Patil P, Gupta G, Krishna VK, Reddy MP: Establishment of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Jatropha curcas* L. International Journal of Agriculture Sciences 2009;1:11-20.
- [38] Tsuchimoto S, Cartagena J, Khemkladngoen N, Singkaravanit S, Kohinata T, Wada N, Sakai H, Morishita Y, Suzuki H, Shibata D, Fukui K: Development of transgenic plants in *Jatropha* with drought tolerance. Plant Biotechnol 2012;29:137-143.

- [39] Jha B, Mishra A, Jha A, Joshi M: Developing transgenic *Jatropha* using the SbNHX1 gene from an extreme halophyte for cultivation in saline wasteland. PLoS ONE 8-5-2013;8:e71136.
- [40] Thompson GA, Scherer DE, Foxall-Van Aken S, Kenny JW, Young HL, Shintani DK, Kridl JC, Knauf VC: Primary structures of the precursor and mature forms of stearyl-acyl carrier protein desaturase from safflower embryos and requirement of ferredoxin for enzyme activity. Proc Natl Acad Sci (USA) 3-15-1991;88:2578-2582.
- [41] Sparace SA, Mudd JB: Phosphatidylglycerol synthesis in spinach chloroplasts: Characterization of the newly synthesized molecule. Plant Physiol 11-1-1982;70:1260-1264.
- [42] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 2-19-1998;391:806-811.
- [43] Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB: Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. Proc Natl Acad Sci (USA) 11-10-1998;95:13959-13964.
- [44] Waterhouse PM, Ming-Bo W, Lough T: Gene silencing as an adaptive defence against viruses. Nature 6-14-2001;411:834-842.
- [45] Ye J, Qu J, Bui HTN, Chua N-H: Rapid analysis of *Jatropha curcas* gene functions by virus-induced gene silencing. Plant Biotechnol J 2009;7:964-976.
- [46] Burch-Smith TM, Anderson JC, Martin GB, Nesh-Kumar SP: Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. Plant J 2004;39:734-746.
- [47] Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM: Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. Plant J 9-1-2001;27:581-590.

- [48] Hall RD: The initiation and maintenance of callus cultures of carrot and tobacco; in Lindsey K (ed): Plant tissue culture manual. Supplement 3. The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1991, pp 1-19.
- [49] Galaz-Avalos RM, Aguilar-Díaz S, Xool-González PA, Huchín-May SMM, Loyola-Vargas VM: Callus, suspension culture, and hairy roots. Induction, maintenance and characterization; in Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds): Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology. Vol. 877. Heidelberg, Humana Press, 2012, pp 29-40.
- [50] Geijskes RJ, Wang LF, Laksmanan P, McKeon MG, Berding N, Swain RS, Elliot AR, Grof CPL, Jackson J, Smith GR: Smartsette seedlings: tissue culture seed plants for the Australian sugar industry. Sugarcane International 2003;13-17.
- [51] De Block M, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Schell J, Zambryski P: Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. EMBO J 1984;3:1681-1984.
- [52] Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW: Gus fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 1987;6:3901-3907.
- [53] Gallagher SR: Gus Protocols. Using the Gus Gene as a Reporter of Gene Expression. San Diego, Academic Press, Inc., 1992.
- [54] Fox BG, Shanklin J, Somerville C, Münck E: Stearoyl-acyl carrier protein delta 9 desaturase from *Ricinus communis* is a diiron-oxo protein. Proc Natl Acad Sci (USA) 3-15-1993;90:2486-2490.
- [55] Lindqvist Y, Huang W, Schneider G, Shanklin J: Crystal structure of Δ^9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. EMBO J 1996;15:4081-4092.
- [56] Murashige T, Skoog F: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 1962;15:473-497.
- [57] Gamborg OL, Miller RA, Ojima K: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 1968;50:151-158.

- [58] Palomo-Ríos E, Barceló-Muñoz A, Mercado J, Pliego-Alfaro F: Evaluation of key factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos of avocado (*Persea americana* Mill.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 5-1-2012;109:201-211.
- [59] Bakshi S, Sadhukhan A, Mishra S, Sahoo L: Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of cowpea via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Rep* 2011;30:2281-2292.
- [60] Bimboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 11-24-1979;7:1513-1523.