



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

GENERACIÓN DE UN VECTOR PARA LA
TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE
CLOROPLASTOS EN CEDRO ROJO

(Cedrela odorata L.)

Tesis que presenta

MAX MIZRAÍM APOLINAR HERNÁNDEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2011



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado GENERACIÓN DE UN VECTOR DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CLOROPLASTOS EN CEDRO ROJO (*Cedrela odorata* L.) 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. Yuri Jorge Jesús Peña Ramírez y la Dra. Luisa Alhucema López Ochoa, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Mérida, Yucatán, México, 25 noviembre de 2011.

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, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos 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.

Firma: _____



Nombre: I. B. Max Mizraím Apolinar Hernández

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte de los proyectos titulados *“Establecimiento de protocolos eficientes para la multiplicación clonal masiva de dos especies forestales de alto valor comercial: cedro rojo (Cedrela odorata) y Pinabete (Pinus chiapensis) por organogénesis y/o embriogénesis somática.”* y *“Aislamiento y caracterización de regiones del plastoma de cedro rojo (Cedrela odorata L.) y desarrollo de protocolos para su transformación plasmídica”* bajo la Co-dirección de la Dra. Luisa López Ochoa (Centro de Investigación científica de Yucatán) y el Dr. Yuri Jorge Jesús Peña Ramírez (Instituto Tecnológico Superior de Acayucan).

Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por parte de los Fondos Sectoriales CONACYT-CONAFOR C03-10013-2003, y de los Fondos Institucionales CONACYT-SEP C01-53851-2006.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores la Dra. Luisa A. López Ochoa (Centro de Investigación Científica de Yucatán) y al Dr. Yuri J. Peña Ramírez (Instituto Tecnológico Superior de Acayucan) por su amistad y todo su apoyo incondicional tanto en forma académica como personal, durante la realización de este proyecto.

A mi comité tutorial y revisor de tesis; Dra. Virginia A. Herrera Valencia, Dra. Aileen O'Connor Sánchez y al Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado, por todas las críticas constructivas que me hicieron crecer como persona y profesionalmente y por todos sus comentarios y observaciones realizadas para mejorar mi escrito de tesis. Así como al Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado por su ayuda en la utilización del software (Sequencher®) empleado para realizar la estrategia de este trabajo y la Dra. Virginia A. Herrera Valencia por facilitarnos el uso de la cámara de biobalística.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de plantas y al Dr. Tomás González Estrada por las instalaciones prestadas para el desarrollo de la parte experimental de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada N° 2282.

A los técnicos académicos M.C Lucila A. Sánchez Cash, Q.B.A Ileana C. Borges Argáez y Biol. Felipe A. Barredo Pool por la ayuda prestada en la realización de este trabajo.

Al IB. Timoteo Rodríguez López y su esposa IB. Abadesa Caridad Gregorio Martínez egresados del Instituto Tecnológico Superior de Acayucan, por toda su ayuda en la elaboración del protocolo de extracción de DNA de cloroplastos y el aislamiento de secuencias ribosomales.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio N° 6 y de CICY por sus comentarios sobre mi trabajo.

A Dios por darme la vida y permitirme estar aquí así como a mi madre Sara Hernández Alemán por ser una mujer de carácter y que me forjó una idea de triunfo y éxito aun contra la adversidad y muy especialmente a mi esposa Ana Rosa Vasconcelos Acosta a quien amo y admiro por su comprensión, apoyo incondicional y por su maravillosa compañía.

Dedicada a toda mi familia...

El gran pez

Del mar, donde el cielo asoma,

Viene el gran pez a comerte

Porque es ley, verdad y axioma,

Que el débil lo coma al fuerte.

Y el leviatán de la muerte

Acude al puntual llamado

Donde tú eres el que pesca,

Pero tú eres el pescado.

José Quintero.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
LISTADO DE FIGURAS.....	v
LISTADO DE CUADROS.....	vii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
BIBLIOGRAFÍA.....	7
 CAPÍTULO I ANTECEDENTES	 11
1.1 GENERALIDADES DE CEDRO ROJO (<i>Cedrela odorata</i> L.)	11
1.2 PROBLEMÁTICA DEL CEDRO ROJO	13
1.3 LA BIOTECNOLOGÍA COMO POSIBLE SOLUCIÓN A LA PROBLEMÁTICA DEL CEDRO.....	15
1.4 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA.....	16
1.4.1 ¿QUÉ ES LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA?	16
1.4.2 MÉTODOS UTILIZADOS PARA REALIZAR TRANSFORMACIÓN GENÉTICA.....	17

ÍNDICE

1.4.3 MÉTODOS DE TRANSFERENCIA DIRECTA DE GENES	17
1.4.3.1 TRANSFORMACIÓN UTILIZANDO POLIETILÉNGLICOL.....	18
1.4.3.2 TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN.....	19
1.4.3.3 TRANSFORMACIÓN POR BIOBALÍSTICA	19
1.5 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CLOROPLASTOS	20
1.5.1 ¿QUÉ SON LOS PLÁSTIDOS Y COMO ESTÁ ESTRUCTURADO EL GENOMA DE LOS CLOROPLASTOS?	21
1.6 RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA	22
1.6.1 SITIOS DE INSERCIÓN DE TRANSGENES EN CLOROPLASTO	24
1.7 ESTRUCTURA DE LOS VECTORES UTILIZADOS EN LA TRANSFORMACIÓN DE CLOROPLASTOS	26
1.8 MARCADORES DE SELECCIÓN PARA LA TRANSFORMACIÓN PLASTÍDICA	27
1.9 GENES REPORTEROS UTILIZADOS EN CLOROPLASTO	28
1.10 TRABAJOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CLOROPLASTOS EN ARBOLES FORESTALES	28
1.11 JUSTIFICACIÓN.....	31
1.12 OBJETIVOS.....	32
1.12.1 OBJETIVO GENERAL	32
1.12.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
1.13 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	33

BIBLIOGRAFÍA.....	34
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS	47
2.1 ESTRATEGIA GENERAL DEL PROYECTO.....	47
2.2 EXTRACCIÓN DE DNA DE CLOROPLASTO (cpDNA)	50
2.3 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN <i>rrn16S-trnI</i> (PCR-I)	51
2.4 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN <i>trnA-rrn23S</i> (PCR-II).....	52
2.5 PREPARACIÓN DEL VECTOR pUC19 Y DE LOS INSERTOS	52
2.6 LIGACIÓN DE LAS REGIONES <i>rrn16S-trnI</i> Y <i>trnA-rrn23S</i> En pUC19.....	54
2.7 TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i> CON LOS PRODUCTOS DE LIGACIÓN	54
2.8 EXTRACCIÓN DE DNA DE PLÁSMIDO POR EL MÉTODO DE LISIS ALCALINA	55
2.9 DIGESTIONES PARA VERIFICAR LA INSERCIÓN DE LOS INSERTOS	56
2.10 ELECTROFORESIS DEL DNA	56
2.11 SECUENCIACIÓN	56
2.12 ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	57
BIBLIOGRAFÍA.....	58
CAPÍTULO III RESULTADOS	59
3.1 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS	59
3.2 ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE LA REGIÓN <i>rrn16S-trnI-trnA-rrn23S</i>	62
3.3 SECUENCIA <i>rrn16S-trnI</i> De CEDRO ROJO CLONADO EN pUC19 (pCBL-1)	64

ÍNDICE

3.4 CLONACIÓN DE LA SECUENCIA <i>trnA-rn23S</i> pCBL-3.....	67
3.5 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN <i>rrn16S-trnI-trnA-rn23S</i> DE CEDRO ROJO	70
3.6 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN <i>rrn16S-trnI</i> DE CEDRO ROJO EN pCBL-1.....	71
3.7 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN <i>trnA-rn23S</i> DE CEDRO ROJO EN pCBL-3.....	72
3.8 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA <i>rrn16S-trnI-trnA-rn23S</i> DE CEDRO ROJO	73
3.8.1 ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA <i>rrn16S-trnI-trnA-rn23S</i> DE CEDRO ROJO CON TABACO, OLIVO Y ROBLE.....	74
3.9 CLONACIÓN DE LA REGIÓN <i>trnA-rn23S</i> EN pCBL-1 PARA OBTENER pCBL-4....	79
3.10 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL CASETE DE EXPRESIÓN	81
3.11 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR FINAL DE TRANSFORMACIÓN DE CLOROPLASTO DE CEDRO ROJO (pCBL-5)	84
BIBLIOGRAFÍA.....	88
 CAPÍTULO IV DISCUSIÓN GENERAL	89
BIBLIOGRAFÍA.....	95
 CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	101
 ANEXOS	103

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura del DNA del cloroplasto	22
Figura 1.2 Modelo de recombinación homóloga.....	23
Figura 1.3 Mecanismo de transformación por recombinación homóloga en cloroplastos .	24
Figura 1.4 Región donde se lleva a cabo generalmente la inserción de transgenes.	25
Figura 1.5 Representación esquemática del casete de expresión para cloroplastos.....	26
Figura 1.6 Estructura del vector de transformación de cloroplastos de <i>Populus alba</i> (pCB1GFP) y su lugar de inserción en el cpDNA.	29
Figura 2.1 Representación esquemática de las regiones que se pretenden amplificar del plastoma de cedro rojo.	47
Figura 2.2 Estructura esquemática de pCBL-1 y pCBL-3.....	48
Figura 2.3 Esquema de pCBL-4.....	49
Figura 2.4 Esquema de pCBL-5.....	50
Figura 2.5 Vector pUC19.	53
Figura 3.1 Alineamientos de la región <i>rrn16S-trnI-trnA-rrn23S</i> del plastoma de 8 especies vegetales utilizados para el diseño de los oligonucleótidos.....	61
Figura 3.2 Digestión del amplicón de la region <i>rrn16S-trnI-trnA-rrn23S</i> de cedro rojo ...	63
Figura 3.3 Análisis electroforético de la región <i>rrn16S-trnI</i> de cedro rojo.....	64
Figura 3.4 Preparación de inserto y vector para pCBL-1.....	65
Figura 3.5 Análisis de restricción de pCBL-1	66
Figura 3.6 Análisis electroforético de la region <i>trnA-rrn23S</i> de cedro rojo	67
Figura 3.7 Purificación de la digestión con <i>Sall</i> y <i>XbaI</i> de pUC19 y PCR-II.....	68
Figura 3.8 Análisis de restricción de pCBL-3	69
Figura 3.9 Estrategia utilizada para secuenciar la región <i>rrn16S-trnI</i> (pCBL-1).....	71
Figura 3.10 Alineamiento de las secuencias obtenidas en sentido y antisentido para ensamblar la región completa <i>rrn16S-trnI</i> de cedro rojo.....	72
Figura 3.11 Estrategia para secuenciar la región <i>trnA-rrn23S</i> clonada en pCBL-3.....	72
Figura 3.12 Alineamiento de las secuencias correspondientes a la región <i>trnA-rrn23S</i> decedro rojo.....	73
Figura 3.13 Alineamiento múltiple de la secuencia <i>rrn16S-trnI-trnA-rrn23S</i> de cedro rojo con tabaco, olivo y roble	78

Figura 3.14 Doble digestión de pCBL-1 y pCBL-3 con <i>Xba</i> I y <i>Not</i> I.....	79
Figura 3.15 Ensayo de restricción de las clonas pCBL-4	80
Figura 3.16 Análisis por PCR de pCBL-4	81
Figura 3.17 Casete de expresión	82
Figura 3.18 Mapa del vector pBMH con el casete de expresión.....	83
Figura 3.19 Análisis de restricción del casete de expresión	83
Figura 3.20 Ensayo de restricción de pCBL-4 con enzimas de restricción presentes solo en el casete de expresión	84
Figura 3.21 Construcción de pCBL-5	85
Figura 3.22 Análisis de restricción de las posibles clonas pCBL-5	86
Figura 3.23 Análisis de restricción para verificar la inserción correcta del casete de expresión	86
Figura 3.24 Análisis por PCR de la orientación del casete en las clonas pCBL-5 con los oligonucleótidos CBL-9/CBL-10	87

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Trabajos de transformación de cloroplastos en plantas superiores. Modificado de Heifetz 2000.....	30
Cuadro 2.1 Reacciones de digestión utilizando <i>HindIII</i> para preparar el vector pUC19 y el inserto PCR-I.	52
Cuadro 2.2 Reacciones de digestión utilizando <i>PstI</i> para preparar el vector pUC19 e inserto PCR-I.	53
Cuadro 2.3 Condiciones para realizar la ligación pUC19 + PCR-I.....	54
Cuadro 2.4 Condiciones para realizar la ligación pUC19 + PCR-II.....	54
Cuadro 3.1 Especies utilizadas para realizar el alineamiento y diseño de los oligonucleótidos usados en este trabajo.	59
Cuadro 3.2 Oligonucleótidos para amplificar la región <i>rm16S-trnI-trnA-rm23S</i> de <i>C. odorata</i> L..	62
Cuadro 3.3 Oligonucleótidos para secuenciar la región <i>rm16S-trnI-trnA-rm23S</i> de <i>C. odorata</i> L.	70
Cuadro 3.4 Resultados del BLAST de la región <i>rm16S-trnI-trnA-23S</i> de cedro rojo.....	74
Cuadro 3.5 Porcentaje de identidad y cobertura de la secuencia de cedro rojo vs tabaco, olivo y roble.	78
Cuadro 3.6 Secuencias, número de accesoión y tamaño de las secuencias utilizadas para construir el casete de expresión.	82

ABREVIATURAS

<i>aadA</i>	Gen que codifica para la Aminoglucósido 3' adeneiltransferasa
<i>accD</i>	Gen que codifica para la acetil-CoA carboxilasa
<i>bar</i>	Gen que codifica para la Fosfinotricina N- acetiltransferasa
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>CodA</i>	Gen que codifica para la Citosina deaminasa
cpDNA	Ácido desoxirribonucleico de cloroplastos
GFP	Proteína verde fluorescente
GUS	Proteína Beta-glucuronidasa
Indel	Inserciones o deleciones
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido
IR _A	Invertido repetido A
IR _B	Invertido repetido B
Kb	Kilo base = 1000 pb (pares de bases) de DNA
LSC	Región grande de una sola copia
mM	Milimol
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
<i>petA</i>	Gen que codifica para el Citocromo f
pM	Picomol
<i>PpsbA</i>	Promotor del gen que codifica para la proteína (D1) del fotosistema II
PPT	Fosfinotricina
<i>Prrn</i>	Promotor del RNA ribosomal
<i>psbA</i>	Gen que codifica para la proteína (D1) del fotosistema II
<i>psbE</i>	Gen que codifica para la subunidad- α del citocromo b ₅₅₉
<i>rbcL</i>	Gen que codifica para la subunidad grande de la RuBisCO

RecA	Proteína de recombinación del DNA
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
<i>rps7/12</i>	Genes que codifican para las proteínas ribosomales 7S-12S
<i>rm16S</i>	Gen que codifica para el RNA ribosomal 16S
<i>rm23S</i>	Gen que codifica para el RNA ribosomal 23S
SSC	Región pequeña de una sola copia
T-DNA	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
TPS	Proteínas solubles totales
<i>TpsbA</i>	Terminador del gen que codifica para la proteína (D1) del fotosistema II
tRNA	Acido ribonucleico de transferencia
<i>trnA</i>	Gen que codifica para el tRNA a alanina
<i>trnH</i>	Gen que codifica para el tRNA a histidina
<i>trnI</i>	Gen que codifica para el tRNA a isoleucina
<i>trnN</i>	Gen que codifica para el tRNA a asparagina
<i>Trps16</i>	Terminador del gen que codifica para la proteína ribosomal 16S
<i>ubiC</i>	Gen que codifica para la corismato piruvato liasa
UTR	Región no traducible
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta- δ -galactopiranósido

RESUMEN

La transformación de cloroplastos surge como una alternativa para realizar mejoramiento genético en plantas, por las ventajas que ofrece sobre la transformación de núcleos, por ejemplo: se evita el flujo génico debido a la estricta heredabilidad materna de los cloroplastos en la mayoría de las plantas, se pueden insertar operones completos bajo el control de una sola secuencia regulatoria (policistrones), se obtienen altos niveles de expresión y alta estabilidad de los transgenes porque no hay silenciamiento génico ni efecto de posición, esto último debido a que la integración ocurre por recombinación homóloga (RH) en sitios específicos del plastoma. Para lograr una RH que conduzca a una alta eficiencia de transformación, es necesario construir vectores especie-específicos. Una de las secuencias más utilizadas para flanquear a los casetes de expresión en dichos vectores, es la región ocupada por el *loci* *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S*. El cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) es una especie forestal tropical perteneciente a la familia de las meliáceas, de importancia comercial debido al alto valor que alcanza su madera. Uno de los problemas que afectan al cedro es el ataque por el insecto barrenador de las meliáceas (*Hypsipyla grandella*), que produce daño apical dando como resultado la bifurcación del tallo del árbol, haciéndolo inadecuado para su comercialización, lo cual ha afectado el desarrollo de plantaciones comerciales en el sureste de México. La transformación de cloroplastos de cedro con genes que confieran resistencia a insecto podría resolver esta problemática. Por ello se planteó el objetivo de construir un vector para la transformación de cloroplastos de cedro, que posteriormente podrá ser utilizado para la obtención de resistencia a *H. grandella*. Se diseñaron oligonucleótidos, a partir de secuencias heterólogas disponibles en las bases de datos, para amplificar un fragmento de 5.7 kb de la región *16S-trnI-trnA-23S* del plastoma de cedro, esta región se clonó en el vector pUC19. En la región intergénica *trnI-trnA* de la secuencia, se insertó un casete de expresión que contiene el gen *aadA*, que codifica la aminoglucósido 3'-adeniltransferasa que confiere resistencia a espectinomicina y el gen que codifica la proteína verde fluorescente, bajo la regulación de secuencias promotoras y UTR's que permiten su expresión en tejidos con plástidos verdes así como no fotosintéticos. La secuencia *16S-trnI-trnA-23S* de cedro mostró un 99 % de identidad con las secuencias de *Mangifera indica* L., *Citrus sinensis* y *Theobroma cacao*, abriendo la posibilidad de utilizar este vector de transformación en estas especies de importancia económica.

ABSTRACT

Chloroplast transformation is an alternative to nuclear transformation to carry out genetic improvement in plants. It offers several advantages such as: prevention of gene flow, due to strict maternal inheritance of the plastid genome; insertion of multiple transgenes under the control of a single regulatory sequence. Also, because there's no gene silencing in plastids, a high stability of transgenes is achieved together with high levels of expression. Since chloroplast transformation occurs by homologous recombination (HR) in specific regions of the plastome, there is a lack of positional effects due to transgene integration. Therefore, to achieve high transformation efficiencies is necessary to construct species-specific vectors. The *loci* occupied by the ribosomal RNA region *16S-trnI/trnA-23S* has successfully been used as HR sequence for strong transgene expression. The forest tree "Cigar box spanish cedar" (*Cedrela odorata* L.) is well known for its high-quality / high-value timber. It is a member of the hardwood Meliaceae family. The shoot borer (*Hypsipyla grandella*) attacks *C. odorata* on its early years of development, producing branched stems, making the plants useless for timber production. This limits the establishment of commercial plantations. Trait introduction for insect resistance (*i.e.* *cry* genes) to red cedar via chloroplast transformation could contribute to solve this problem, without the risk of transgene flow. Therefore, we generated a chloroplast transformation vector using the ribosomal RNA region as targets for HR. Primers were designed in order to clone the red cedar *16S-trnI/trnA-23S* region, based on an *in silico* analysis of heterologous sequences available in the databases. A 5.7 kb fragment was cloned into pUC19. An expression cassette containing both, the aminoglycoside 3'-adenyltransferase gene (*aadA*), which confers spectinomycin resistance and the green fluorescence protein gene (*gfp*), were introduced into the *trnI/trnA* intergenic region. Also, chloroplast regulatory sequences that trigger expression in both, green and non-green tissues were used. The red cedar *16S-trnI/trnA-23S* sequence shares 99% identity with important such as some fruit species as *Mangifera indica*, L., *Citrus sinensis* and *Theobroma cacao*, opening the application window of this transformation vector to other important plant crops.

INTRODUCCIÓN

Los árboles constituyen parte importante de la biomasa sobre la superficie terrestre. En el mundo entero la demanda de energías renovables, papel y productos de construcción derivados de la madera está creciendo rápidamente (Okumura *et al.*, 2006). Para reducir la presión de esta demanda sobre los bosques naturales, es necesario realizar plantaciones comerciales con árboles que tengan una mayor calidad (Boerjan, 2005).

El cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) es una especie forestal maderable perteneciente a la familia de las meliáceas, su distribución va desde el sur de México hasta el norte de Argentina (Pennington y Styles, 1975). Este es altamente apreciado en todo el mundo por el alto valor económico que alcanza su madera, la cual es muy utilizada para la construcción de muebles finos (Lamb, 1968). A causa de su importancia económica, las poblaciones naturales de esta especie se enfrentan a problemas de sobre explotación lo que ha llevado a la pérdida de los mejores fenotipos (ITTO, 2002; Cavers *et al.*, 2004; Lamb *et al.*, 2005). Una forma de contrarrestar esta problemática es desarrollar cultivos intensivos en plantaciones comerciales, sin embargo, esto se ha visto frustrado a causa de que el cedro rojo es altamente susceptible al ataque del barrenador *Hypsipyla grandella* Zeller, el cual está considerado como una de las plagas forestales más severas en América latina y el Caribe (Hilje y Cornelius, 2001). Este insecto en estado larval se alimenta del meristemo apical de plantas jóvenes, rompiendo la dominancia apical, trayendo como consecuencia la ramificación del árbol. Como resultado se deforma el fuste haciéndolo inadecuado para su aprovechamiento por la industria maderera (Keay, 1996; Briceño-Vergara, 1997; Valera, 1997; O'Neil *et al.* 2001).

Entre las formas de control de *H. grandella*, se encuentra el uso de agentes químicos, biológicos, mecánicos en forma individual como conjunta, sin embargo, no se ha logrado controlar esta problemática en México (Briceño-Vergara, 1997). Una forma alternativa para controlar este insecto es utilizando la ingeniería genética para la introducción de genes que confieran resistencia contra las plagas; un ejemplo de esto es lo obtenido en álamo (*Populus nigra*) donde se introdujo un gen *Cry1Ac* obteniendo como resultado resistencia contra insectos defoliadores (Hu *et al.*, 2001). Generalmente para realizar la introducción de estos genes se utiliza como sitio de inserción el genoma nuclear, sin embargo, esto trae como consecuencia un alto riesgo de introgresión de los transgenes

INTRODUCCIÓN

debido a que las plantas transformadas producen polen que podría fecundar especies naturales (Slavov *et al.*, 2004; Williams, 2005).

Con el fin de reducir el flujo génico a través del polen, la transformación de los plástidos ofrece una alternativa atractiva debido a que en la mayoría de las especies forestales dicotiledóneas la herencia de los cloroplastos es estrictamente materna lo que evita que el transgén se herede mediante el polen (Daniell y Parkinson, 2003; Daniell, 2002). Además de esta característica, la transformación de plástidos permite obtener altos niveles de expresión (De Cosa *et al.*, 2001), se pueden insertar transgenes en forma de operones (Quesada-Vargas *et al.*, 2005), y no hay silenciamiento génico ni problemas por efectos de posición, debido a que la integración de los transgenes se da por un mecanismo de recombinación homóloga (Maliga, 2004). La transformación de plástidos había sido aplicada solo a especies herbáceas (Daniell *et al.*, 2005), hasta que en el 2006 se publicó el primer reporte de una especie arbórea (Okumura *et al.*, 2006).

Debido a que el mecanismo de inserción de transgenes es por medio de recombinación homóloga (Maliga, 2004) los transgenes deben de estar flanqueados por secuencias recombinantes del genoma del cloroplasto. Daniell *et al.*, en 1998 propusieron una secuencia homóloga universal para todas las especies vegetales, sin embargo, más recientemente se ha aceptado que es más eficiente utilizar secuencias especie-específicas (Daniell *et al.*, 2006). Por lo que en este trabajo se construyó un vector para la transformación de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) utilizando como secuencias de recombinación homóloga, las regiones *rrn16S-trnI* y *trnA-rrn23S* de cedro rojo, estas secuencias se utilizaron para flanquear un casete de expresión que contiene el gen *aadA* (dirigido por el *Prm16S* y el *TpsbA*) como agente de selección y el gen *gfp* (dirigido por el promotor *G10 T7* y el *Trps16*) como gen marcador así como regiones reguladoras 5'UTR y 3'UTR de cloroplastos.

BIBLIOGRAFÍA

- Boerjan W. (2005). Biotechnology and the domestication of forest trees. *Curr Opin Biotech.* 16:159–166.
- Briceño-Vergara A. J. (1997). Aproximación hacia un manejo integrado del barrenador de las meliáceas *Hypsipyla grandella* Zeller. *Rev. For. Ven.* 41: 23–28.
- Cavers S.; Navarro C.; Lowe A. J. (2004). Targeting genetic resource conservation in widespread species: a case study of *Cedrela odorata* L. *For. Ecol. Manag.* 197: 285–294.
- Daniell H, Datta R, Varma S, Gray S, Lee SB. (1998). Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nat Biotechnol* 16: 345–348.
- Daniell H, Kumara S, Dufourmantel N. (2005). Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops. *Trends Biotechnol* 23:238–245.
- Daniell H, Lee SB, Grevich J, Saski C, Quesada-Vargas T, Guda C, Tomkins J, Jansen RK. (2006). Complete chloroplast genome sequences of *Solanum bulbocastanum*, *Solanum lycopersicum* and comparative analyses with other Solanaceae genomes. *Theor Appl Genet* 112: 1503–1518.
- Daniell, H. (2002). Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat. Biotechnol.* 20 581–586.
- Daniell, H. y Parkinson, C. L. (2003). Jumping genes and containment *Nat. Biotechnol.* 21 374–375.
- De Cosa B, Moar W, Lee S-B, Miller M, Daniell H. (2001). Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol* 19:71–74.
- Hilje L., Cornelius J. (2001). Es inmanejable *Hypsipyla grandella* como plaga forestal? Manejo integrado de plagas. CATIE, Costa Rica. No. 61. 4 pp.
- Hu, J.J., Tian, Y.C., Han, Y.F., Li, L. & Zhang, B.E. (2001). Field evaluation of insect-resistant transgenic *Populus nigra* trees. *Euphytica*, 121: 123–127.

INTRODUCCIÓN

- ITTO. (2002). International Tropical Timber Organization guidelines for the restoration, management and rehabilitation of degraded and secondary tropical forests, ITTO Policy Development Series No 13. ITTO, Yokohama.
- Keay R. W. J. (1996). The future of the genus *Swietenia* in its native forest. *Bot. J. Linn. Soc.* 122: 3–7.
- Lamb A.F.A.(1968). Fast growing timbers of the lowland tropics, no. 2 *Cedrela odorata* L. Commonwealth Forestry Institute, University of Oxford, Oxford.
- Maliga P. (2004). Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 55:289–313.
- O'Neil G. A.; Dawson I.; Sotelo-Montes C.; Guarino L.; Guari-Guata M.; Current D.; Weber J. C. (2001). Strategies for genetic conservation of trees in the Peruvian Amazon. *Biodivers. Conserv.* 10: 837–850.
- Okumura S, Sawada M, Park YW, Hayashi T, Shimamura M, Takase H, Tomizawa K. (2006). Transformation of poplar (*Populus alba*) plastids and expression of foreign proteins in tree chloroplasts. *Transgenic Res* 15:637-646.
- Pennington T.D., Styles B.T. (1975). A generic monograph of the Meliaceae. *Blumea* 22(3):419–540.
- Quesada-Vargas T, Ruiz O.N., Henry Daniell H. (2005). Characterization of heterologous multigene operons in transgenic chloroplasts. Transcription, processing, and translation. *Plant Physiol* 138:1746–1762.
- Slavov G.T., Difazio S.P., Strauss S.H. (2004). Gene flow in forest trees gene migration patterns and landscape modeling of transgene dispersal in hybrid poplar. In: Nijs HCM, Bartsch D, Sweet J (eds) *Introgression from genetically modified plants into wild relatives*. CABI Pub, Cambridge, pp 89–106.
- Valera F. P. (1997). Genetic resources of *Swietenia* and *Cedrela* in the neotropics: Proposals for coordinated action. Forest Resources Division, Forestry Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Williams C.G. (2005). Framing the issues on transgenic forests. Nat Biotechnol 23:530--532.

CAPÍTULO I ANTECEDENTES

1.1 GENERALIDADES DE CEDRO ROJO (*Cedrela odorata* L.)

El cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) es una de las especies forestales de mayor importancia económica en los bosques tropicales de México, fue descrito originalmente por Linneo en 1759 en su obra *System Naturae*. De acuerdo a Cronquist, el cedro rojo se clasifica de la siguiente manera: División: Magnoliophyta; Clase: Magnoliopsidae; Subclase: Rosidae; Orden: Sapindales; Familia: Meliaceae; Género: *Cedrela*; Especie: *odorata* (citado por Tullume, 2000).

El cedro al igual que la caoba (*Swietenia macrophylla*) (otra especie de interés económico) es originario de América, y su distribución va desde el norte de México, pasando por Centroamérica incluyendo las islas del Caribe, hasta Brasil. En México se encuentra en la vertiente del Golfo, desde el sur de Tamaulipas y sureste de San Luís Potosí hasta la Península de Yucatán. En la vertiente del Pacífico, desde Sinaloa hasta Guerrero, en la depresión Central y las costas de Chiapas (Vázquez-Yanes *et al.*, 1999). Crece de manera natural en los estados de: Campeche, Colima, Chiapas, Durango, Guerrero, Jalisco, Hidalgo, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán. Sin embargo, los estados con potencial óptimo para el desarrollo de plantaciones comerciales son; Campeche, Chiapas, Tabasco, Veracruz, Oaxaca, Quintana Roo y Yucatán, ya que en estos estados se satisfacen los requerimientos necesarios para su buen desarrollo como altitud, temperatura, suelo, humedad y precipitación. De un total de 93,000 has los estados con mayor superficie plantada de cedro rojo son: Veracruz 24.8%, Campeche 18.42%, Oaxaca 12.28%, Chiapas 11.10%, Puebla 9.13%, Tabasco 4.78%, Yucatán 4.09% y el resto de los estados mencionados 15.4% (Fumiaf y SAGARPA, 2005).

El árbol de cedro rojo es caducifolio, con número cromosómico $2n = 50$ o $2n = 56$ (Styles y Koshla, 1976), con una altura de 20 a 35 m alcanzando hasta 45 m en algunas zonas, el diámetro del tronco puede ser de hasta 2.5 m, sus flores son pequeñas (Urbina, 2000), es un árbol monoico, es decir que sus flores femeninas y masculinas se encuentran en el mismo árbol agrupadas en racimos florales o panículas. El fruto es una cápsula leñosa de

color pardo verdoso con apariencia de nuez, de 2.5 a 5 cm de largo, el cual contiene de 20 a 40 semillas aladas, las cuales son de color café oscuro y se encuentran adheridas al eje del fruto (Patiño, 1997). La copa es grande, redondeada, con hojas compuestas alternas paripinnadas o imparipinnadas, de 15 a 50 cm (INIFAP, 2005). Crece en climas tropicales y subtropicales, húmedos y semihúmedos, se puede situar en comunidades a nivel del mar e incluso hasta los 3000 msnm (metros sobre el nivel del mar). Un ejemplo de esto es Chiapas, donde se puede encontrar desde los 0 hasta 1800 msnm. Se localiza comúnmente cohabitando con especies del género *Pinus* (Lamb, 1968).

La importancia del cedro radica en su aromática madera, conocida como "cigar box spanish—cedar" en las esferas comerciales, es considerada preciosa debido a los altos precios y su demanda es alta en los trópicos americanos porque es naturalmente resistente a las termitas y a la pudrición (Cintrón, 1990). Esta apreciación es consecuencia de su dureza, color y aroma, además de su magnífico comportamiento como material para distintos usos: madera aserrada, chapa, triplay, ebanistería y carpintería (Simula *et al.*, 2005). Se utiliza en acabados y divisiones de interiores, muebles de lujo, chapas decorativas, artículos torneados, gabinetes de primera clase, puertas talladas, contrachapados, molduras y paneles.

A la fecha, el comercio de esta madera ha representado un buen negocio para los productores mexicanos, que exportan a los EE. UU. Esta madera aserrada y en determinadas medidas (madera dimensionada) se cotiza en 13,000 pesos por m³. En la actualidad, las plantaciones comerciales en México suman 93,000 hectáreas pero el plan de la CONAFOR, mediante el programa PRODEPLAN, es alcanzar 180,000 ha para el año 2025 (Fumiaf y SAGARPA, 2005).

A pesar de su amplia distribución, el cedro no es nunca común a través de los bosques tropicales americanos; su número de individuos se ve constantemente reducido debido a la sobreexplotación sin una regeneración exitosa.

1.2 PROBLEMÁTICA DEL CEDRO ROJO

Nuestro país cuenta con una superficie arbolada para uso forestal que se aproxima a los 57 millones de hectáreas, de las cuales el 32% corresponde a selvas tropicales que se encuentran en las zonas litorales del Golfo de México y del pacífico, en el Istmo de Tehuantepec, la península de Yucatán y la zona de la frontera con Guatemala. En contraste, la producción maderera nacional no ha crecido en congruencia con esta disposición natural ya que de la producción natural maderable, el 82% corresponde a coníferas, 12% a encino y otras latifoliadas, y solo el 4% corresponde a maderas tropicales comunes y preciosas (Simula *et al.*, 2005; SEMARNAT, 2002).

El cedro rojo es una especie que ha sido sobreexplotada a lo largo de los siglos debido a la constante demanda de su madera, existiendo una tala inmoderada, lo que ha llevado a la pérdida de los mejores fenotipos (Vázquez *et al.*, 1999). Según reportes de la FAO (por sus siglas en inglés, Food and Agriculture Organization of the United Nations) en el 2001, en todo el mundo se perdieron 14.2 millones de hectáreas de bosque por deforestación y se están plantando anualmente 5.2 millones de hectáreas de árboles, lo que indica que la deforestación neta es de 9 millones de hectáreas, ocasionando una pérdida de material genético importante para la supervivencia de esta especie. Aunado a la problemática antes descrita, emerge otra con considerables consecuencias y que tiene como fuente la práctica artesanal para su multiplicación. Debido a que el cedro fructifica en época de lluvia, las semillas —una vez que han llegado al suelo— son muy susceptibles al ataque de patógenos y a la pudrición. Las prácticas tradicionales de recolección de semillas han sido poco eficientes ya que consisten en subir a la copa de los árboles y como los mejores fenotipos tienen grandes alturas se dificulta su recolección, lo que ha causado que se disponga de semilleros que provienen de árboles de baja estatura y con fustes muy ramificados, trayendo como consecuencia la selección de genotipos poco favorables para su comercialización (Simula *et al.*, 2005; SEMARNAT, 2002).

En conjunto a esta problemática, existe otra dificultad para establecer plantaciones con árboles de calidad forestal de cedro rojo y es la falta de variedades resistentes al ataque del insecto lepidóptero, conocido como el barrenador de las Meliáceas *Hypsipyla grandella* Zeller, el cual es una de las plagas forestales más severas conocidas en el trópico. El principal daño es causado por la larva del insecto, la cual destruye el

CAPÍTULO I

meristemo apical, barrenándole los ápices y haciendo túneles en los tallos jóvenes. Los rebrotes de las plantas afectadas por repetidos ataques del insecto, dan como resultado numerosas ramas laterales y como consecuencia árboles mal formados con los fustes deformados, indeseables para la producción de madera (Briceño, 1997).

Solo una larva del insecto *H grandella* es suficiente para deformar un árbol completo. En 2006 en México, la superficie afectada por insectos barrenadores con notificación fue de 3761.25 ha, de los cuales sobresalió *Hypsipyla grandella* que afectó 67.4% del total (2536.25 ha). El nivel de incidencia fue de 33.33% con incidencia media y de 66.66% con incidencia fuerte (en base a ondulación, bifurcación o polifurcación de las plantas) con lo que se concluyó que los tratamientos aplicados no están controlando adecuadamente a esta plaga (SEMARNAT, 2006).

Una de las formas de tratar al barrenador de las meliáceas es por medio de control químico, para ello se han utilizado insecticidas sintéticos y naturales, sin embargo, este método ha producido fuertes intoxicaciones a las personas que los aplican, aunado al riesgo de contaminación ambiental y también el incremento desproporcionado del costo de producción (INIFAP, 2005). El control natural y/o biológico también se ha utilizado y consiste en buscar depredadores naturales de *Hypsipyla sp.*, algunos de estos depredadores son: *Hexamermis sp.* (nemátodos en larvas), *Metiops mirabilis* Towns (Tachinidae en larvas y pupas) y especies de *Trychogrammitidae*, en huevos (Grijma, 1974) y hongos tales como *Metarrhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. No obstante, este método tiene el inconveniente de la poca permanencia en las plantaciones si no existen las condiciones adecuadas para el desarrollo de los organismos (Briceño, 1997).

A pesar de utilizar estos métodos no se ha podido controlar *Hypsipyla grandella* al 100%. Un ejemplo de esto es lo realizado por Díaz (2004) quien probó 3 métodos de control: 1) biológico (Aplicación de *Beauveria bassiana*), 2) químico (insecticida sistémico Furadán) e 3) insecticida orgánico (Neem), obteniendo que aplicando cualquiera de estos tres tipos de control se obtenía una incidencia de *H. grandella* del 10% lo que era suficiente para atacar a toda una plantación de cedro rojo (Díaz, 2004).

1.3 LA BIOTECNOLOGÍA COMO POSIBLE SOLUCIÓN A LA PROBLEMÁTICA DEL CEDRO

La biotecnología ha tenido un gran impacto en el desarrollo de sistemas de propagación masiva mediante técnicas de cultivo *in vitro*, permitiendo la producción de grandes cantidades de plántulas, las cuales pueden ser utilizadas para reforestación o para iniciar plantaciones comerciales con organismos de características élite, que ayuden a disminuir la tala inmoderada de los bosques (Patiño, 1997). Esto ha quedado demostrado en diversas especies forestales, como por ejemplo: las coníferas *Picea abies* (Chalupa, 1985; Hackman y Von Arnol, 1985) y *Larix decidua* (Nagmani y Bonga, 1985). Por otro lado, la generación de variedades transgénicas de especies forestales permitiría la mejora de sus características agronómicas y maderables, prometiendo grandes beneficios a mediano y largo plazo para la industria (Kellison *et al.*, 2004). Los esfuerzos para desarrollar variedades de árboles transgénicos y su posterior comercialización iniciaron hace alrededor de 15 años, y dentro de las mejoras que se han buscado conferirles a estos individuos se encuentran: mejoramiento en la forma y crecimiento del fuste (Israelson *et al.*, 2004), mejoras que faciliten los procesos industriales de extracción de pulpa (Baucher *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2000), restauración ecológica, mejora en la capacidad de enraizamiento y recuperación de suelo (Balocchi y Valenzuela, 2004), mejorar la calidad de la madera, resistencia a enfermedades e insectos (Tang y Tlan, 2003, Xiao-Hua *et al.*, 2003; Dowd *et al.*, 1998), tolerancia a herbicidas, tolerancia a sequía y otros agentes abióticos (Gleeson *et al.*, 2005).

Según cita Balocchi y Valenzuela (2004) en el libro "Biotecnología forestal en América latina" el primer experimento con árboles transgénicos —del cual se tiene conocimiento— fue establecido en Gante, Bélgica en 1988 usando álamo tolerante a herbicidas. Desde entonces ha habido más de 200 reportes de pruebas en campo, que involucran 15 especies forestales. La mayoría de los ensayos de campo (64%) se han llevado a cabo en E.U. y más del 50% se han realizado en *Populus* spp., los rasgos designados son principalmente: tolerancia a herbicida (31%), seguido por los genes marcadores (23%) y resistencia a insectos (14%). Se tiene solo un reporte de plantaciones comerciales establecidas de álamo (*Populus nigra*) con un gen *Cry1Ac* de *B. turingiensis* contra los insectos defoliadores *Apocheima cinerarius* Erschoff y *Orthosia incerta* Hufnagel, en el

cual se obtuvo que las plantas transgénicas solo presentaban un 10% de daños en sus hojas, comparado con los controles donde se obtuvo un 80-90% de daño (Hu *et al.*, 2001).

Pese a los logros tecnológicos obtenidos y los beneficios alcanzados con la transformación genética en especies forestales tales como: incrementos en la densidad de la madera, reducción del contenido de lignina, modificación de los tipos de lignina, incrementos en el contenido de celulosa, resistencia a insectos, entre otras (Balocchi y Valenzuela, 2004), hasta la fecha el uso de esta tecnología no es muy aceptada en la comunidad académica así como tampoco en el sector social, debido a que estas especies son cultivadas como parte integral de los ecosistemas naturales y pudieran tener repercusiones en caso de existir hibridación intraespecífica, por la posibilidad del paso del transgén hacia poblaciones silvestres (Kaiser, 2001; James, 1997). Cabe destacar que todos los trabajos mencionados se han realizado utilizando el genoma nuclear como sitio blanco de inserción de transgenes, por lo que la transformación del cloroplasto ofrece la posibilidad que evitar el flujo genético así como otras ventajas mencionadas anteriormente.

1.4 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

1.4.1 ¿QUÉ ES LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA?

Es un proceso por medio del cual se mueve material genético de un organismo a otro horizontalmente de manera natural o mecánica, alterando el genotipo del receptor. La transferencia puede ser con DNA ya sea entre organismos emparentados o incluso entre reinos como hongos, plantas, bacterias, animales (SABIC, 2001).

La transformación genética ocurre de manera natural entre organismos, las bacterias se encargan de mover material genético de forma rutinaria entre ellas mismas, los virus también tienen la capacidad de transferir DNA y RNA dentro de un organismo (animal, planta e incluso hongos) y causar cambios en el material genético del hospedero. Bacterias como *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*, son dos ejemplos de sistemas de transformación naturales (SABIC, 2001).

En la naturaleza *A. tumefaciens* causa la enfermedad llamada agalla de corona, introduciendo en la célula vegetal una parte de su DNA de transferencia (T-DNA). El T-DNA es integrado dentro del genoma de la planta durante el proceso de infección. Los

genes del T-DNA son expresados en el hospedero e inducen la formación de tumores y la síntesis de unos derivados de aminoácidos llamados opinas y nopalinas, los cuales son aprovechados por la bacteria (Valderrama, 2005). Desde 1970, hasta nuestros días se ha venido estudiando en detalle el mecanismo por el cual *A. tumefaciens* induce la formación de tumores en plantas y el conocimiento adquirido ha sido fundamental para su uso como herramienta en la ingeniería genética de plantas. Así mismo, esta interacción, ha dado pie a formular mecanismos de integración genómica (Tzfira y Citovsky, 2002).

1.4.2 MÉTODOS UTILIZADOS PARA REALIZAR TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Uno de los métodos más utilizados en el laboratorio para lograr la transformación genética es utilizando cepas de *A. tumefaciens* modificadas genéticamente. Estas cepas se denominan desarmadas, debido a que los genes que causan la enfermedad de la agalla de corona han sido removidos y sustituidos por genes de interés (SABIC, 2001).

La inserción de nuevos genes y sus elementos regulatorios en el T-DNA ha permitido la transformación genética de plantas susceptibles con genes de importancia agronómica. Esto a su vez ha servido para el estudio de la función y expresión de genes, así como para el desarrollo de plantas con nuevas características (Gelvin, 2003).

El principio de transferencia de DNA mediante *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* ha sido útil para la transformación de especies de plantas dicotiledóneas. Sin embargo, ciertas condiciones experimentales deben ser establecidas para que el sistema de transformación funcione adecuadamente en monocotiledóneas, las cuales no son generalmente susceptibles a *A. tumefaciens* aunque, aun así se ha logrado la transformación de especies de importancia económica como el arroz (Cheng *et al.*, 1998), el banano (May *et al.*, 1995), callos embriogénicos de maíz (Ishida *et al.*, 1996), trigo (Cheng *et al.*, 1997) y embriones inmaduros de la caña de azúcar (Arencibia *et al.*, 1998), entre otras.

1.4.3 MÉTODOS DE TRANSFERENCIA DIRECTA DE GENES

Además de la transferencia de genes por medio de *A. tumefaciens*, existen varios métodos artificiales que han sido desarrollados para la transformación genética de plantas. El objetivo de estos métodos es introducir directamente una gran cantidad de

DNA a través de la célula vegetal. Varios agentes y estrategias son utilizados para lograr este fin, algunos de estos métodos son: químicos, campos eléctricos, bombardeo de tejidos de plantas con partículas a gran velocidad, entre otros. Este último método puede ser utilizado no solo para transformar genomas nucleares sino también para genomas de cloroplastos (Crouzet, 2002).

1.4.3.1 TRANSFORMACIÓN UTILIZANDO POLIETILÉNGLICOL

Las células de las plantas tienen un obstáculo que dificulta la transformación, este obstáculo es la pared celular. Por esta razón, los primeros métodos utilizados para lograr la transformación genética consistían en el cultivo de células sin pared celular, esto se lograba utilizando enzimas (celulasas, pectinasas) para poder remover la pared celular y quedarse solo con células sin pared, estas células son llamadas protoplastos (Hooykaas, 2001). Los protoplastos son sujetos a tratamientos con polietilenglicol (PEG) y cationes bivalentes (calcio o magnesio) en presencia de DNA transformante (Paszkowski *et al.*, 1984). El PEG y el catión condensan el DNA, desestabilizan la membrana plasmática y la dejan permeable para el paso del DNA. Una vez en el interior de la célula, el DNA entra al núcleo, donde ocurre la integración al genoma nuclear, esto sucede posiblemente durante la división celular, en un proceso muy azaroso (Crouzet, 2002).

El hecho de que se usen protoplastos para la transformación mediante PEG tiene ventajas y desventajas. Los protoplastos pueden ser obtenidos de un gran número de tejidos. Millones de estos pueden ser manipulados y transformados simultáneamente, principalmente para la producción de cientos e incluso miles de protoplastos transformados. Sin embargo, la generación de plantas transgénicas fértiles por esta técnica depende de la eficacia del proceso de regeneración de un protoplasto a planta (Crouzet, 2002). La tecnología de los protoplastos fue inicialmente restringida a ciertas especies de plantas dicotiledóneas, pero posteriormente llegó a ser posible para especies monocotiledóneas importantes como los cereales (Hooykaas, 2001).

Un ejemplo utilizando este principio es el trabajo realizado por Lazzeri, en el cual protoplastos aislados de células en suspensión de cebada, fueron transformados con un plásmido que contenía a los genes de la neomicina fosfotransferasa *NPT II* y β -glucuronidasa (*uidA*), para ello se utilizaron tres tratamientos diferentes con PEG, como resultado se obtuvo una eficiencia de transformación de 40 a 80% (Lazzeri *et al.*, 1991).

1.4.3.2 TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN

Un método alternativo al tratamiento químico de protoplastos es la aplicación de choques eléctricos en presencia de una gran cantidad de DNA transformante desnudo. La membrana plasmática se vuelve temporalmente permeable por un campo eléctrico a alto voltaje aplicado por un periodo de tiempo muy corto de milisegundos (Fromm *et al.*, 1985), lo cual permite la introducción del DNA (Crouzed, 2002) a las células vegetales. Originalmente la electroporación podía ser únicamente aplicada para protoplastos, por lo tanto la posibilidad de obtener una planta transgénica fue extremadamente limitada por la disponibilidad de protocolos eficientes para la regeneración de protoplastos a plantas completas. Más recientemente, la electroporación ha sido aplicada exitosamente para tejidos más complejos, por lo cual la regeneración puede ser más fácil (Crouzed, 2002).

En 1992 D'Halluin, logró transformar y regenerar callos embriogénicos de maíz utilizando electroporación, al maíz le fue introducido el gen de la neomicina fosfotransferasa (*neo*) obteniendo como resultado que el 90% de plantas recuperadas de callos expresaban el gen *neo*. El número de plantas regeneradas a partir de callos seleccionados con kanamicina varió de 1 a 30 y el tiempo total desde la transformación hasta el invernadero fue de 12 semanas (D'Halluin *et al.*, 1992).

1.4.3.3 TRANSFORMACIÓN POR BIOBALÍSTICA

Este es uno de los métodos más utilizados para la transformación solo después de *A. tumefaciens*. El término biobalística deriva de la fusión de las palabras "biología y balística" o "balística biológica", fue ideado y refinado en la década de 1980-1990 por un grupo de investigadores de la Universidad de Cornell E.U (Sanford, 1988; Sanford *et al.*, 1987).

La biobalística es una técnica basada en principios físicos que permiten literalmente disparar genes a las plantas, para lo cual se emplean micropartículas de un tamaño que oscila entre 0.6 hasta 1.6 μm de un metal denso como es el caso del oro o el tungsteno (Crouzed, 2002). Estas partículas son recubiertas con DNA (esto se logra adicionando espermidina y calcio), posteriormente las partículas son impulsadas a través de una columna por un gas, usualmente helio, aunque también se suele utilizar dióxido de carbono (CO_2), pólvora o bien por medio de una descarga eléctrica, hacia el tejido que se

quiera transformar. Una vez que se ha penetrado la pared celular, el DNA de las partículas puede expresarse en el citoplasma dando como resultando una expresión transitoria de los genes insertados, pero esta expresión se pierde después de que la célula se divide. Lo más deseable es que la integración se realice covalentemente en el DNA nuclear (cromosomas) logrando así una transformación estable, aunque esto es menos frecuente ya que esta integración es totalmente aleatoria, por lo que se utiliza un sistema de selección *in vitro* que permita distinguir células transformadas y no transformadas (Crouzed, 2002).

1.5 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CLOROPLASTOS

Como una alternativa innovadora para la transformación genética de plantas surge la transplastómica, en donde el blanco de inserción de nuevos genes es el cloroplasto, con la cual un amplio rango de productos han sido obtenidos. Hasta ahora más de 100 transgenes han sido integrados y expresados establemente incluyendo genes que codifican enzimas de alto valor industrial, biomateriales, proteínas de interés biofarmacéutico, anticuerpos, antibióticos, antígenos de vacunas y genes para conferir importantes tratamientos agronómicos (Bock y Warzecha 2010; Daniell *et al.*, 2009).

Además esta estrategia es una opción viable para la contención de transgenes debido a la estricta heredabilidad materna de los cloroplastos en la mayoría de las especies forestales dicotiledóneas (Daniell y Parkinson, 2003; Daniell, 2002). También se aprovechan las ventajas que ofrece este sistema comparado con la transformación nuclear como son: la alta acumulación de proteínas solubles totales o TSP (por sus siglas en ingles, Total Soluble Protein) de hasta el 46% (De Cosa *et al.*, 2001), la ausencia de efectos epigenéticos como el silenciamiento génico (Lee *et al.*, 2003; De Cosa *et al.*, 2001) que sí ha sido observado en la transformación via nuclear. El efecto de posición (Daniell *et al.*, 2001) es otro problema en la transformación nuclear que no ocurre en la transformación de cloroplastos, ya que la integración de los transgenes se lleva a cabo por un mecanismo de recombinación homóloga, facilitado por un sistema tipo *RecA* (Cerrutti *et al.*, 1992), por esta razón los vectores de transformación para cloroplastos incluyen secuencias de recombinación homóloga que flanquean el casete de expresión. Estas secuencias se encuentran dentro del genoma del cloroplasto de forma que la integración se lleva a cabo

en forma sitio-específica (Daniell, Ruiz, y Dhingra, 2005; Kumar y Daniell, 2004; Daniell, 1997, 1993).

Aunque originalmente esta estrategia estuvo limitada solo a plantas de tabaco (*N. tabacum*) y al alga *Chlamydomonas reinhardtii*, actualmente se ha extendiendo a cultivos de interés comercial de alto valor económico tales como: soya, algodón, especies de *Brassica*, papa, tomate, lechuga, remolacha, berenjena, entre otras; y más recientemente a árboles forestales (revisión realizada por Verma y Daniell 2007; Okumura *et al.*, 2006). Hasta hoy, existen más de 90 patentes registradas solo por el grupo del doctor Henry Daniell quien es pionero en la transformación de cloroplastos y quien ha publicado más de 100 artículos sobre transformación de cloroplastos (<http://daniell.ucf.edu/people/daniell>).

1.5.1 ¿QUÉ SON LOS PLÁSTIDOS Y COMO ESTÁ ESTRUCTURADO EL GENOMA DE LOS CLOROPLASTOS?

Los plástidos son una familia de organelos que se encuentran en las células vegetales de las plantas y algas eucariotas, cumpliendo una gran variedad de procesos metabólicos y de biosíntesis que son vitales para el desarrollo y crecimiento de las plantas (McFadden, 2001).

Los plástidos de acuerdo con su función y localización en las plantas, se pueden clasificar en: Cromoplastos, los cuales biosintetizan y almacenan pigmento, localizándose en flores y frutos; leucoplastos, que se encuentran en raíces; oleoplastos, que acumulan ácidos grasos y se encuentran en la semilla; amiloplastos, se encuentran en semillas y tubérculos, acumulando almidón; cloroplastos, se encuentran principalmente en tejidos verdes y son responsables de la fotosíntesis (Leister, 2003).

El DNA de los cloroplastos (cpDNA) es una molécula circular cerrada de doble cadena contiene la maquinaria necesaria para realizar la replicación del cpDNA independiente del núcleo (Maliga, 2003), un genoma típico de cloroplasto consiste de unidades básicas de doble cadena de DNA de 110 a 220 Kb, arregladas en círculos monoméricos o multiméricos (Lilly *et al.*, 2001; Palmer, 1985). Generalmente este genoma está altamente conservado (Raubeson y Jansen, 2005), cuenta con dos regiones repetidas inversas (IR_A e IR_B; del inglés "*Inverse Repeat A*" e "*Inverse Repeat B*") de aproximadamente 20 a 30 Kb cada una, separadas por una región grande de una sola copia (LSC; del inglés "*Large*

Single Copy") y de una región pequeña de una sola copia (SSC; del inglés "*Small Single Copy*") (figura 1.1) (Verma y Daniell, 2007). Dependiendo de la especie, tejido, estado de desarrollo y condiciones ambientales el número de genomas puede superar 10,000 copias idénticas por célula (Bendich, 1987).



Figura 1.1 Estructura del DNA del cloroplasto. Forma esquemática en la cual se representan los repetidos invertidos (IR_A e IR_B) así como las dos regiones de copia sencilla, la grande (LSC) y la pequeña (SSC)(modificada de Daniell *et al.*, 2005).

1.6 RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

La integración de los transgenes dentro de los cloroplastos se realiza por recombinación homóloga facilitada por un sistema tipo *RecA* (Cerutti *et al.*, 1992), entre las secuencias recombinantes del vector de transformación y la región blanco del genoma plástidico (figura 1.3). La recombinación homóloga se define como el intercambio recíproco de información genética entre dos moléculas idénticas de DNA (Szostak *et al.*, 1983). El complejo *RecBCD* inicia la recombinación con DNA de doble cadena (Kowalczykowski, 2000), este complejo es llamado así en *E. coli*. Participa durante la replicación del DNA al reparar y reiniciar la replicación de horquillas rezagadas (Kuzminov, 1995). La función de cada vía de recombinación es generar extremos 3' del DNA, los cuales son necesarios para el evento de invasión y apareamiento de regiones complementarias en el DNA, esta etapa es dependiente de la proteína *RecA* (Kowalczykowski *et al.*, 1994). Al final del

proceso de recombinación, una DNA ligasa sella las cadenas y termina el evento de recombinación homóloga (figura 1.2).

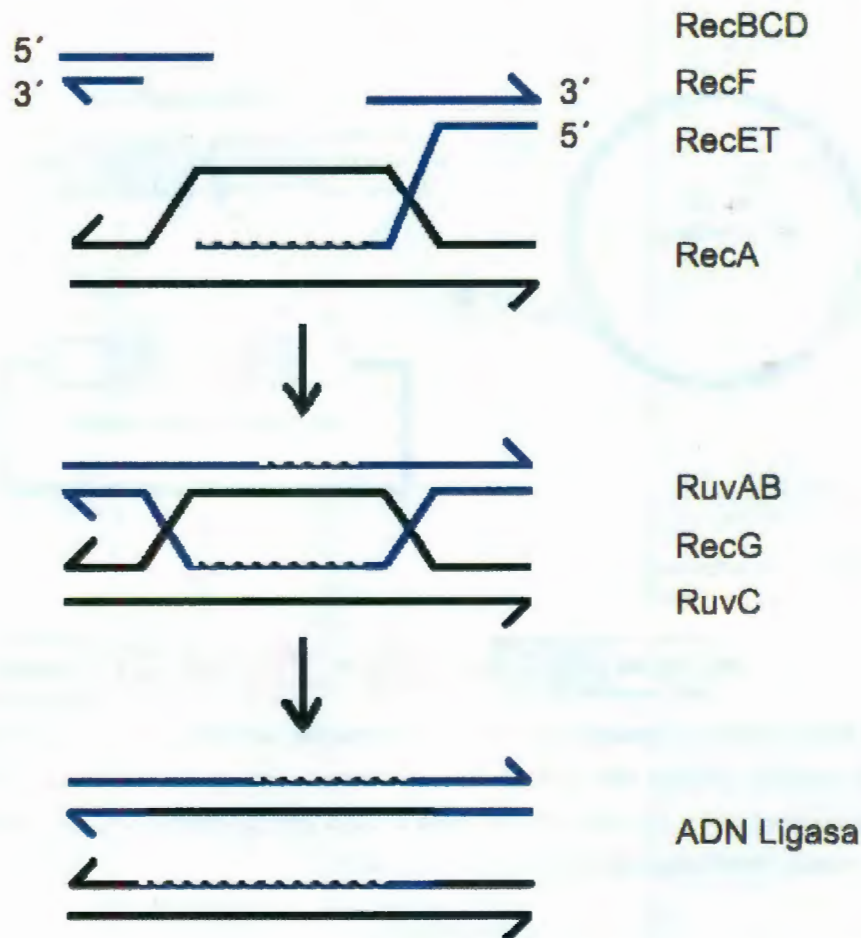


Figura 1.2 Modelo de recombinación homóloga. Las vías *RecBCD*, *RecFOR* y *RecET* generan extremos de DNA 3', las cuales son reconocidas por *RecA* para la invasión de la región homóloga. Proteínas como *RuvAB*, *RecG* migran hacia el intermediario de Holliday, *RuvC* lo resuelve con un corte y posteriormente la DNA ligasa liga los cortes (modificada de Santoyo, 2008).

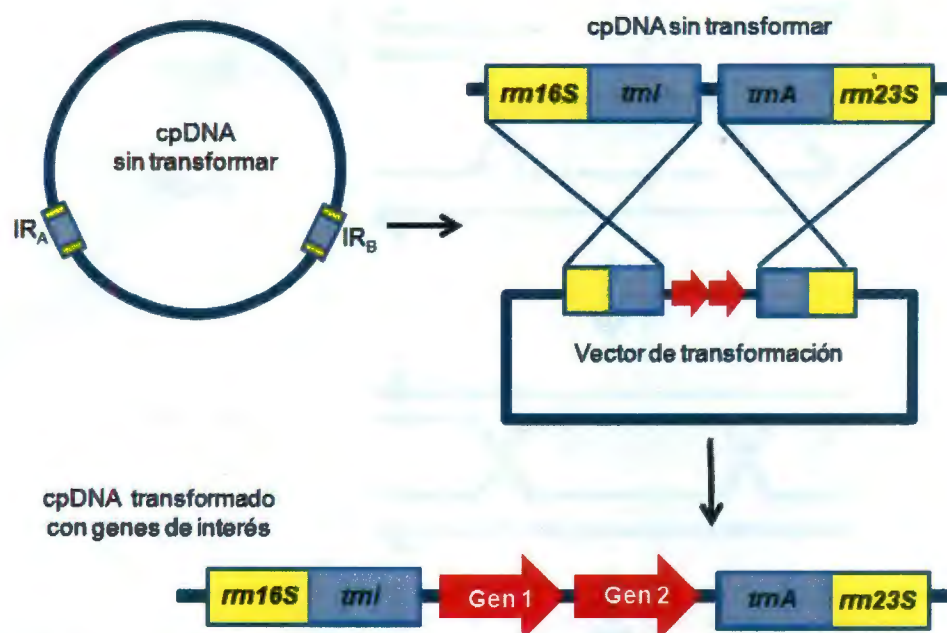


Figura 1.3 Mecanismo de transformación por recombinación homóloga en cloroplastos. después de que los vectores (arriba) son flanqueados con secuencias de los repetidos invertidos del cloroplasto, la integración del transgen se lleva a cabo por un mecanismo de recombinación homóloga (abajo). (Modificada de Dhingra y Daniell, 2005).

1.6.1 SITIOS DE INSERCIÓN DE TRANSGENES EN CLOROPLASTO

En la transformación de cloroplastos, generalmente los transgenes son insertados dentro de la región espaciadora entre dos genes funcionales a través de un mecanismo de recombinación homóloga. Lo cual permite una integración sitio específica eliminando el problema del efecto de posición observado en la transformación nuclear de plantas (Daniell, 2002).

Muchas regiones espaciadoras del genoma del cloroplasto han sido utilizadas como sitios blancos para la inserción de transgenes, entre las cuales se encuentran: *rbcl-accD*, *psbE-petA*, *trnN-rps7/12*, *trnN-rm16S*, *psbA-trnH*, *trnI-trnA* entre otras (Maliga, 2005). Sin

embargo, el sitio más utilizado para la inserción de transgenes en los cloroplastos, es la región que codifica para los RNA ribosomales, la cual consiste de cuatro marcos de lectura abiertos, el gen del RNA Ribosomal 16S (*rm16S*), los genes que codifican para los *tRNAs* de isoleucina y alanina (*trnI* y *trnA*) y el gene que codifica al RNA ribosomal 23S (*rm23S*) (De Cosa *et al.*, 2001) (figura 1.4). La inserción se realiza particularmente entre la región intergénica de los genes del *tRNA* de isoleucina y alanina (*trnI* y *trnA*). Esta región está localizada en el IR_A e IR_B del genoma del cloroplasto por lo cual se pueden alcanzar hasta 20,000 copias del transgén por célula, facilitando así la alta expresión de los transgenes. Otra característica importante de este sitio es la presencia de un origen de replicación río abajo al gen *rm23S* (Lugo *et al.*, 2004; Kunnimalaiyaan, 1997) lo cual puede facilitar la replicación del vector dentro del cloroplasto (Daniell *et al.*, 1990) incrementando la probabilidad de la integración del transgén y lograr la homoplastia en la primera ronda de selección (Guda *et al.*, 2000).

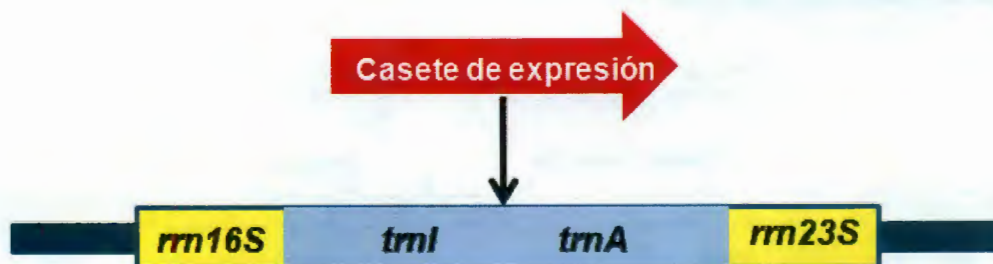


Figura 1.4 Región donde se lleva a cabo generalmente la inserción de transgenes.

Los niveles de expresión de transgenes que se han reportado utilizando este sitio de integración han sido de los más altos, ejemplos de ello son: 31% de TSP obtenidos al expresar el péptido 2L21 el cual confiere resistencia a *C. lupus familiaris* contra el virus canino parvovirus (Molina *et al.*, 2004); 35% TSP, al expresar el gen de *E.coli ubiC* el cual codifica para la corisimato piruvato liasa (CPL) (Viitanen *et al.*, 2004); 46.1% TSP de toxinas Bt (De cosa *et al.*, 2001), cabe destacar que todos estos resultados han sido obtenidos en tabaco (*N. tabacum*).

1.7 ESTRUCTURA DE LOS VECTORES UTILIZADOS EN LA TRANSFORMACIÓN DE CLOROPLASTOS

El vector básico para la transformación de cloroplastos está compuesto de regiones recombinantes flanqueantes a un casete de expresión específico para cloroplasto. Las secuencias recombinantes son específicas para cada especie (ej. *trnI-trnA*), normalmente se utiliza la técnica de PCR para aislar estas secuencias (Singh *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2008).

El casete de expresión para cloroplasto está compuesto de un promotor, un marcador de selección y secuencias reguladoras no traducibles (UTR) 5' y 3' que incrementan la eficiencia de la transcripción y traducción del gen. Los promotores específicos de cloroplasto así como los elementos reguladores son amplificados del DNA plastídico usando la información de la secuencia base disponible del plastoma. Una vez clonadas estas secuencias pueden ser manipuladas para la adición de sitios de restricción para facilitar el ensamblado del vector (figura 1.5).

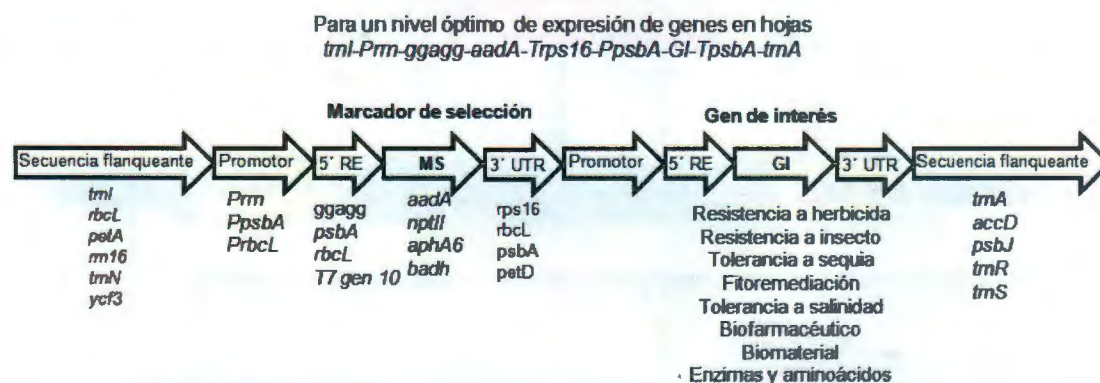


Figura 1.5 Representación esquemática del casete de expresión para cloroplastos. En esta imagen se muestran los diferentes genes que se han utilizado para diseñar los casetes de expresión en cloroplastos (Modificado de Verma y Daniell, 2007).

En 1998, Daniell *et al.* propusieron utilizar un vector universal para la transformación de cloroplastos de varias especies de plantas, que contenía los genes *rbcL* y *accD* del genoma del cloroplasto de tabaco (*N. tabacum*) como secuencias flanqueantes para la

recombinación homóloga. Esto fue basado en la alta identidad de las secuencias nucleotídicas de la región espaciadora intergénica entre los genomas de cloroplastos de plantas superiores (Daniell, *et al.*, 1998).

Este vector fue utilizado exitosamente en la transformación de cloroplastos de papa y tomate, pero la eficiencia de transformación fue significativamente más baja comparada con tabaco (Ruf *et al.*, 2001; Sidorov *et al.*, 1999) ya que se obtuvo solo una línea transgénica de 35 bombardeos en papa y solo una línea de plantas transgénicas de 87 bombardeos en tomate. Aunque las secuencias recombinantes flanqueantes de tabaco que se utilizaron en el vector tenían 98 % de identidad con las secuencias de papa y tomate, la eficiencia fue mucho más baja que en tabaco donde se obtuvieron 15 líneas de cloroplastos transgénicos en un solo bombardeo (Fernandez-San Millan *et al.*, 2003). Un caso similar ocurrió con la transformación de cloroplastos de tabaco, empleando un vector basado en secuencias de petunia (De Gray *et al.*, 2001). Esto se debe a que disminuye la identidad entre secuencias nucleotídicas de diferentes especies, lo que reduce el éxito de la recombinación homóloga. Esto ha sido reportado para solanáceas (Daniell *et al.*, 2006) y 9 genomas cloroplastídicos de algunos cereales (Saski *et al.*, 2007).

1.8 MARCADORES DE SELECCIÓN PARA LA TRANSFORMACIÓN PLASTÍDICA

El primer gen utilizado con éxito para la selección de plantas transplastómicas fue el gen *aadA* que codifica la enzima 3'-adenililtransferasa, la cual inactiva a los antibióticos espectinomycin y estreptomycin por adenilación (Svab and Maliga, 1993). Este gen fue el primero en ser utilizado para verificar la integración y expresión estable durante la transformación de *Chlamydomonas reinhardtii* (Goldschmidt y Clermont, 1991).

Otro gen marcador alternativo es el de la neomicina fosfotransferasa (*neo*), el cual confiere resistencia a kanamicina (Carrer *et al.*, 1993). Un gen diferente que también confiere resistencia a kanamicina (*aphA6*) con relativamente alta eficiencia de transformación fue reportado después (Huang *et al.*, 2002). El gen bacteriano *bar* también es utilizado como marcador de selección, este codifica la fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) dando resistencia al herbicida PPT (Fosfinotricina) (Lutz *et al.*, 2001); también

existe un agente de selección negativo que está basado en el gen bacteriano *codA* (Serino y Maliga, 1997).

1.9 GENES REPORTEROS UTILIZADOS EN CLOROPLASTO

Los genes que codifican la beta glucuronidasa de *E. coli* (*uidA*), la cloranfenicol acetiltransferasa de *Streptomyces venezuelae* (CAT) y la proteína verde fluorescente (GFP) de la medusa *Aequorea victoria*, han sido utilizados como reporteros en plástidos (Khan y Maliga, 1999; Daniell *et al.*, 1990; Ye *et al.*, 1990; Daniell y McFadden, 1987). La actividad enzimática de GUS puede ser visualizada por análisis histoquímicos (Daniell *et al.*, 1991; Ye *et al.*, 1990) y también cuantificada por métodos fluorométricos, en ambos casos es necesaria la destrucción de los tejidos. GFP es un marcador visual fluorescente que funciona mediante autocatálisis en presencia de oxígeno y produce una fluorescencia verde al absorber luz azul o UV (Hanson y Kohler, 2001), la fluorescencia puede ser cuantificada o bien la proteína puede ser detectada mediante anticuerpos. Es particularmente útil porque permite monitorear la expresión génica *in vivo*, *in situ* y en tiempo real, sin destruir los tejidos bajo estudio y a bajo costo.

1.10 TRABAJOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CLOROPLASTOS EN ARBOLES FORESTALES

Hasta ahora solo existe un trabajo de transformación de cloroplastos en árboles reportado por Okumura *et al.*, 2006, quienes trabajaron con álamo blanco (*Populus alba*) como modelo de estudio. La metodología de este trabajo consistió en bombardear hojas de álamo con un vector construido de forma monocistrónica, que contenía el gen *aadA* el cual confiere resistencia a espectinomicina y *gfp* como gen reportero. La proteína GFP se puede observar como un producto visible (fluorescencia). El casete de expresión del vector fue introducido entre la secuencia *rbcL* y *accD* del vector pCB1, para dar como resultado el vector de transformación pCB1GFP (figura 1.6), la expresión del gen *aadA* fue dirigida por el promotor del RNA ribosomal 16S de tabaco (*Prrn*) y como terminador *pbsA* de tabaco (*TpsbA*). La expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) fue dirigida por el promotor del gen *psbA* de tabaco (*PpsbA*) y el terminador del gen *Trps16* de la misma especie (*Trps16*).

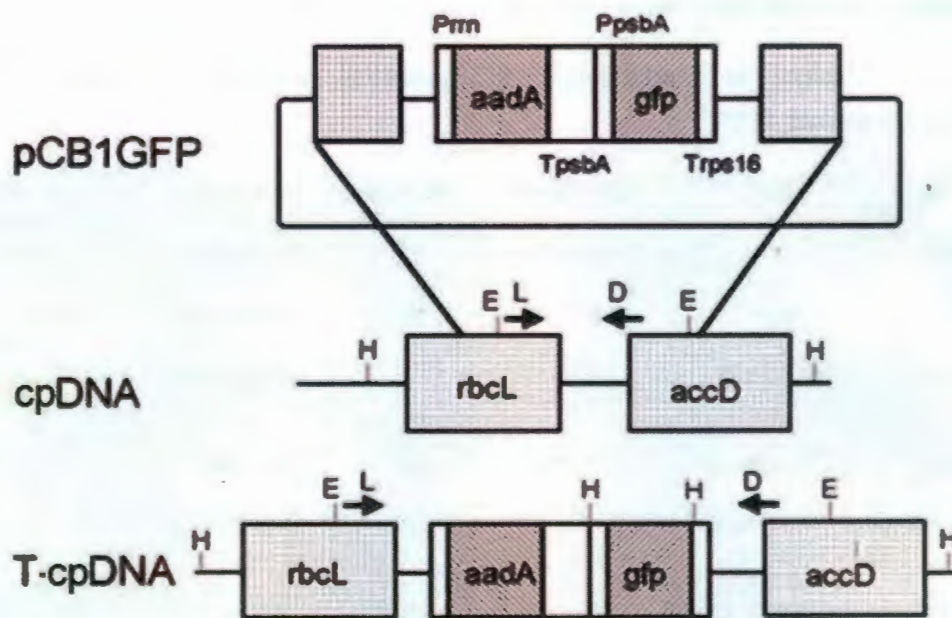


Figura 1.6 Estructura del vector de transformación de cloroplastos de *Populus alba* (pCB1GFP) y su lugar de inserción en el cpDNA. En este vector se utilizaron como regiones flanqueantes de los transgenes a la secuencia del gen de la subunidad grande de la RUBISCO (*rbcL*) y del gen de la acetil carboxilasa (*accD*) para dirigir la inserción de los genes *aadA* y *gfp* (Okumura *et al.*, 2006).

Como resultado del trabajo se obtuvieron 10 brotes desarrollados que presentaban fluorescencia, de los cuales 3 fueron transferidos a tierra y el resto se cultivó de forma aséptica. De los árboles sembrados en tierra se realizaron diferentes ensayos como *Southern blot* y *western blot* para asegurarse de que realmente se tenían líneas transplastómicas. Mediante el *Southern blot*, los autores comprobaron que los transgenes se habían insertado en el plastoma del álamo blanco. La presencia de la proteína GFP se detectó mediante excitación con luz UV en las plantas y se corroboró por *western blot*. Además se realizó un ensayo con enzimas de restricción para verificar la homoplasia de la transformación. Con estos tres experimentos se logró constatar que efectivamente se habían obtenido plantas transplastómicas homoplasídicas utilizando promotores y terminadores de *Nicotiana tabacum*.

CAPÍTULO I

Para otras especies vegetales se han hecho varios trabajos de transplastómica, mismos que pueden ser observados en el cuadro 1.1.

Cuadro 1.1 Trabajos de transformación de cloroplastos realizados en plantas superiores. Modificado de Heifetz, 2000.

Especie	Gen	Secuencia	Método	Resultado	Referencia
Tabaco	<i>uidA</i>	<i>tmV-16S</i>	BB	homoplastía	Staub y Maliga, 1993.
Papa	<i>gfp</i>	<i>rps12-tmV</i>	BB	homoplastía	Sidorov <i>et al.</i> 1999
Tabaco	Toxinas Bt	<i>trnI-trnA</i>	BB	homoplastía	De Cosa <i>et al.</i> 2001
Tabaco	CT-B (cólera)	<i>trnI-trnA</i>	BB	homoplastía	Daniell <i>et al.</i> 2001
Zanahoria	Betaína aldehído deshidrogenasa	<i>trnI-trnA</i>	BB	homoplastía	Kumar <i>et al.</i> 2004
Tabaco	interferón $\alpha 2b$	<i>trnI-trnA</i>	BB	homoplastía	Daniell <i>et al.</i> 2005
Álamo blanco	<i>aadA-gfp</i>	<i>rbcL-accD</i>	BB	homoplastía	Okumura <i>et al.</i> 2006

BB. Biobalística

1.11 JUSTIFICACIÓN

Debido a que el mejoramiento genético de las especies forestales utilizando cruzas de parentales puede tomar muchos años, además de la falta de individuos de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) resistentes al ataque del insecto plaga *Hypsipyla grandella* en México, es necesario tratar estos problemas a mediano plazo, lo que se puede lograr utilizando la ingeniería genética para la introducción de uno o más genes que confieran resistencia contra este insecto. En el caso de las especies tropicales preciosas como el cedro rojo no se han realizado trabajos para su mejoramiento genético. Tomando en cuenta los posibles problemas de aceptación de especies forestales sometidas a transformación genética por la vía nuclear, debidos principalmente al flujo génico por polen, aunados a los posibles problemas técnicos que se pueden presentar, como son 1) bajos niveles de expresión, 2) variación en la expresión y 3) posible inestabilidad del transgén, etc. se requiere implementar la transformación genética de cloroplastos de cedro rojo, la cual podría constituirse como una herramienta muy útil en el mejoramiento de esta especie. Para llevarlo a cabo, en el presente trabajo se generó un vector para la transformación genética del cloroplasto de cedro rojo que permitirá en un futuro la introducción de genes de resistencia contra *Hypsipyla grandella*, así como otros que se consideren convenientes.

1.12 OBJETIVOS

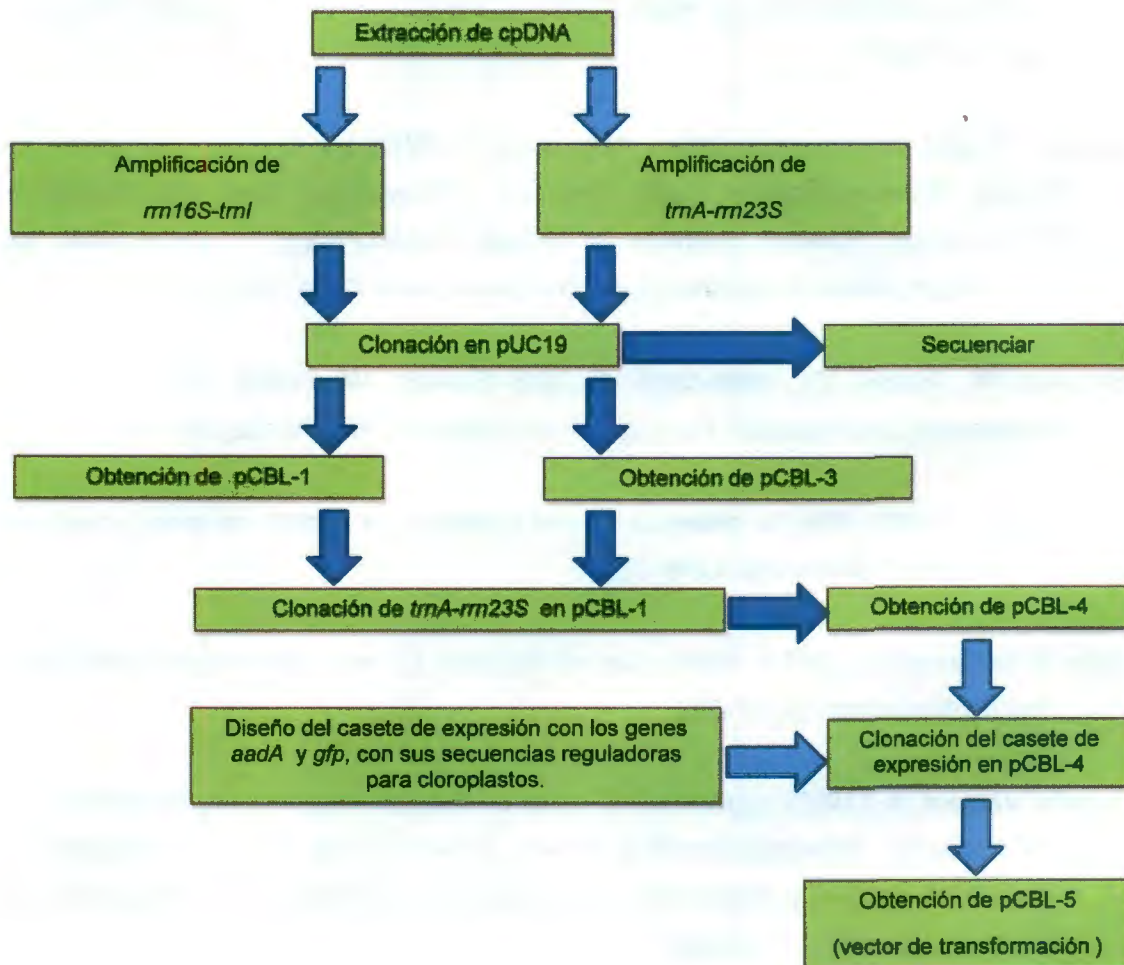
1.12.1 OBJETIVO GENERAL

- Realizar la construcción de un vector para la transformación genética del cloroplasto del cedro rojo (*Cedrela odorata* L.).

1.12.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar y secuenciar la región *rrn16S-trnI* del plastoma de cedro rojo.
- Clonar y secuenciar la región *trnA-rrn23S* del plastoma de cedro rojo.
- Construir un casete de expresión que contenga como marcador de selección el gen *aadA* que confiere resistencia a espectinomicina y el gen reportero *gfp*.
- Construir un vector de transformación para cedro rojo que incluya como secuencias flanqueantes del casete de expresión las secuencias *rrn16S-trnI* y *trnA-rrn23S* del genoma del cloroplasto de esta especie.

1.13 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



BIBLIOGRAFÍA

- Arencibia, A. (1998). An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. En: Transgenic Research. Vol. 7; p. 1–10.
- Balocchi, C. and Valenzuela S. (2004). Introduction to GMOs and Biosafety in Forestry. In Forest Biotechnology in Latin America. Proceedings from the workshop Biotecnología Forestal. Institute of Forest Biotechnology – Universidad de Concepción. Global Biotechnology Forum, Concepción, Chile. 126 pp.
- Baucher, M., Halpin, C., Petit-Conil, M. and Boerjan, W. (2003). Lignin: Genetic Engineering and Impact on Pulping. Crit Rev Biochem Mol Biol (38) 305–350.
- Bendich A.J. (1987). Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? BioEssays 6:279-282.
- Bock R, Warzecha H. (2010). Solar-powered factories for new vaccines and antibiotics. Trends Biotechnol 28:246–252.
- Briceño Vergara, A. (1997). Aproximación hacia un manejo integrado Del barrenador de las meliáceas, *Hypsipyla Grandella* (zeller). Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Centro de Estudios Forestales y Ambientales de Postgrado, Mérida – Venezuela.
- Carrer H., Hockenberry TN., Svab Z., Maliga P. (1993). Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. Mol Gen Genet 241: 49–56.
- Cerutti H., Osman M., Grandoni P., Jagendorf A.T. (1992). A homologous of Escherichia coli Rec A protein in plastids of higher plants. Proc Natl Acad Sci USA 89: 8068–8072.

- Chalupa V. (1985). Somatic Embryogenesis and plantlet regeneration from culture immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Kartes. Comm. Inst For 14, 57–63.
- Cheng M. *et al.* (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiology. Vol. 115; p. 971–980.
- Cheng, X.Y. (1998). *Agrobacterium* transformed rice expressing synthetic cry1Ab and cry1Ac genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Vol.95; p. 2767–2772.
- Cintron B. B. (1990). *Cedrela odorata* L. Cedro hembra, Spanish cedar. En: Silvics of North America: 2. Hardwoods. Burns, R. M. y Honkala, B. H., eds. Handb. 654. Washington, DC: U. S. Department of Agriculture, Forest Service: 250–257.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) (2005). Manual práctico para la producción de plantas. 197p.
- Crouzet, P. and Hohn, B. (2002). Transgenic plants. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, London, UK, pp. 1–7.
- D'Halluin Kathleen, Bonne EIS, Bossut Martine, Beuckeleer De Marc, and Leemans Jan. (1992). Transgenic Maize Plants by Tissue Electroporation. The Plant Cell, Vol. 4, 1495-1505.
- Daniell H. (1993). Foreign gene expression in chloroplasts of higher plants mediated by tungsten particle bombardment. *Methods Enzymol.* 217: 536–556.
- Daniell H. (1997). Transformation and foreign gene expression in plants by microprojectile bombardment. *Methods Mol. Biol.* 62: 463–489.
- Daniell H. (2002). Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat. Biotechnol.* 20 581–586.

CAPÍTULO I

- Daniell H., Datta R., Varma S., Gray S., Lee S.B. (1998). Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nat Biotechnol* 16: 345–348.
- Daniell H., Krishnan M., McFadden B.A. (1991). Transient expression of b-glucuronidase in different cellular compartments following biolistic delivery of foreign DNA into wheat leaves and calli. *Plant Cell Rep* 9:615–619.
- Daniell H., Lee S.B., Panchal T and Wiebe P.O. (2001). Expression of cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J. Mol. Biol.* 311: 1001–1009.
- Daniell H., Lee SB., Grevich J., Saski C., Quesada-Vargas T., Guda C., Tomkins J., Jansen R.K. (2006). Complete chloroplast genome sequences of *Solanum bulbocastanum*, *Solanum lycopersicum* and comparative analyses with other Solanaceae genomes. *Theor Appl Genet* 112: 1503–1518.
- Daniell H., McFadden B.A. (1987). Uptake and expression of bacterial and cyanobacterial genes by isolated cucumber etioplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6349–6353.
- Daniell H., Ruiz O. N. and Dhingra A. (2005). Chloroplast genetic engineering to improve agronomic traits. *Methods Mol. Biol.* 286: 111–137.
- Daniell H., Singh N.D., Mason H., Streatfield S.J. (2009). Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci* 14:669–679.
- Daniell H., Vivekananda J., Nielsen BL., Ye G.N., Tewari KK (1990). Transient foreign gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 88–92.
- Daniell, H. y Parkinson, C. L. (2003). Jumping genes and containment *Nat. Biotechnol.* 21 374–375.

- De Cosa B., Moar W., Lee S.B., Miller M., Daniell H. (2001). Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol* 19: 71–74.
- De Gray G., Rajasekaran K., Smith F., Sanford J., Daniell H. (2001). Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiol* 127: 852–862.
- Dhingra A. and Daniell H. (2005). Chloroplast genetic engineering via organogenesis or somatic embryogenesis. In: *Arabidopsis Protocols II*. Sanchez-Serrano, J. J., and Salina, J, Eds., Humana Press, New Jersey. In Press.
- Díaz Maldonado E.R.A., *et al.* (2004). Diagnóstico de las Condiciones Fitosanitarias de las Plantaciones Forestales en la Península de Yucatán. In 3er Congreso Forestal de Cuba y III Simposio Internacional de Técnicas Agroforestales. Instituto de Investigaciones Forestales. Cuba. 24 p.
- Dowd, P. F., Lagrimini, L. M. and Herms, D. A. (1998). Differential leaf resistance to insects of transgenic sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) expressing tobacco anionic peroxidase. *Cell Mol. Life Sci.* 54 712–720.
- Fernandez-San Millan, A., Mingeo-Castel, A. M., Miller, M., and Daniell, H. (2003). A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnol. J.* 1: 71–79.
- Fromm ME, Taylor LP and Walbot V. (1985). Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 80: 4803–4807.
- Fumiaf y SAGARPA (2005). Plan de negocios para el cultivo de la especie forestal comercial Cedro Rojo (*Cedrela odorata* L.) en México. Fundación mexicana para investigación agropecuaria y forestal, A.C.(Fumiaf) y Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 29 p.

CAPÍTULO I

- Gelvin, S. (2003). Agrobacterium-mediated plant transformation: the Biology behind the "GENE-Jockeying" TOOL. En: Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 67; p. 16–37.
- Gleeson, D., Lelu-Walter MA. and Parkinson, M. (2005). Overproduction of proline in transgenic hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea* (Dengler)) cultures renders them tolerant to cold, salt and frost. *Molecular Breeding* 15 (1) 21–29.
- Goldschmidt-Clermont M. (1991). Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res* 19: 4083–4089.
- Grijma, P. (1974). Contributions to an integrated control program of *Hypsipyla grandella* (Zeller) in Costa Rica. Doctoral Thesis. State Agric. Univ. Wageningen, Holland.
- Guda C, Lee SB, Daniell H. (2000). Stable expression of a biodegradable protein-based polymer in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Rep* 19:257-262.
- Hackman I., Von Arnolds S., (1985). Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (*Norway spruce*). *J. Plant Physiol* 121, 149–158.
- Hanson MR, Kohler RH (2001). GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *J Exp Bot* 52:529–539.
- Hooykaas P. JJ. (2001). Plant Transformation. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London, UK, pp. 1–6.
- Hu, J.J., Tian, Y.C., Han, Y.F., Li, L. & Zhang, B.E. (2001). Field evaluation of insect-resistant transgenic *Populus nigra* trees. *Euphytica*, 121: 123–127.
- Huang FC, Klaus S, Herz S, Zou Z, Koop HU, Golds T (2002). Efficient plastid transformation in tobacco using the *aphA-6* gene and kanamycin selection. *Mol Genet Genomics* 268: 19–27.

INIFAP (2005). El cedro, Establecimiento y Manejo en la Huasteca Potosina. San Luís Potosí: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Tecnología No. 7 <http://www.oeidrusslp.gob.mx/modulos/tecnologiasdesc.php>.

Ishida, Y. *et al.* (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nature Biotechnology. Vol. 4; p. 745–750.

Israelsson, M., Mellerowicz, E., Chono, M., Gullberg, J. and Moritz, T. (2004). Cloning and Overproduction of Gibberellin 3–Oxidase in Hybrid aspen Trees. Effects on Gibberellin Homeostasis and Development. Plant Physiol. 135 221.

James, R. R. (1997). Using a social ethic toward the environment in assessing genetically engineered insect–resistance in trees. Agriculture and Human Values 14 (3) 237–249.

Kaiser, J. (2001). Words (and Axes) Fly Over Transgenic Trees. Science, 292 (5514): 34–36.

Kellison, R., McCord, S. y Gartland, K. M. A. Eds. (2004). Forest Biotechnology in Latin America. Proceedings from the workshop Biotecnología Forestal. Institute of Forest Biotechnology – Universidad de Concepción. Global Biotechnology Forum, Concepción, Chile. 126 pp.

Khan MS, Maliga P (1999). Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. Nat Biotechnol 17: 910–915.

Kowalczykowski, S.C. (2000). Initiation of genetic recombination and recombination–dependent replication. Trends Biochem Sci. 25:156–165.

Kowalczykowski, S.C., D.A. Dixon, A. K Eggleston, S. D. Lauder & W.M Rehauer. (1994). Biochemistry of homologous recombination in *E. coli*. Microbiol Rev. 58:401–465.

CAPÍTULO I

- Kumar, S., and Daniell, H. (2004). Engineering the chloroplast genome for hyperexpression of human therapeutic proteins and vaccines antigens. *Methods Mol. Biol.* 267: 365–383.
- Kunnimalaiyaan, M., Shi, F., and Nielsen, B. L. (1997). Analysis of the tobacco chloroplast DNA replication origin (*oriB*) downstream of the 23S rRNA gene. *J. Mol. Biol.* 268, 273–283.
- Kuzminov, A. (1995). Collapse and repair of replication forks in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* 16:373–384.
- Lamb, A. F. A. (1968). Fast growing timber trees of the lowland tropics. *Cedrela odorata*. Commonwealth Forestry Institute, Oxford. 2: 46.
- Lazzeri P.A., Brettschneider R., Lihers R. and Lfrz H.. (1990). Stable transformation of barley via PEG-induced direct DNA uptake into protoplasts. *Theor Appl Genet* 81:437–444.
- Lee, S. B., Kwon, H. B., Kwon, S. J., Park, S. C., Jeong, M. J., Han, S. E., and Daniell, H. (2003). Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. *Mol. Breeding* 11: 1–13.
- Leister, D. (2003). Chloroplast research in the genomic age. Elsevier, 47–56.
- Lilly JW, Havey MJ, Jackson SA, Jiang J (2001) Cytogenomic analyses reveal the structural plasticity of the chloroplast genome in higher plants. *Plant Cell* 13: 245–254.
- Lugo, S. K., Kunnimalayaan, M., Singh, N. K., and Nielsen, B. L. (2004). Required sequence elements for chloroplast DNA replication activity in vitro and in electroporated chloroplasts. *Plant Sci.* 166: 151–161.

- Lutz KA, Knapp JE, Maliga P (2001) Expression of bar in the plastid genome confers herbicide resistance. *Plant Physiol* 125: 1585–1590.
- Maliga P (2003) Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Biotechnol* 21:20-28.
- Maliga P. (2005). New vectors and marker excision systems mark progress in engineering the plastid genome of higher plants. *Plant Biol.*, 55:289-313.
- May, G. D. *et al.* (1995) Generations of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*–mediated transformation. *Biotechnology*. Vol. 13; p. 486–492.
- McFadden, G.I. (2001). Chloroplast origin and integration . *Plant Physiology*. 50-53.
- Molina A, Hervás-Stubbs S, Daniell H, Mingo-Castel A, Veramendi J (2004) High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol J* 2:141-153.
- Nagmani R., Bonga J.M., (1985). Embryogenesis in subculture callus of *Larix decidua*. *Can J For Res* 15, 1088–1091.
- Okumura S, Sawada M, Park YW, Hayashi T, Shimamura M, Takase H, Tomizawa K. (2006). Transformation of poplar (*Populus alba*) plastids and expression of foreign proteins in tree chloroplasts. *Transgenic Res* 15:637-646.
- Palmer JD (1985). Comparative organization of chloroplast genomes. *Annu Rev Genet* 19: 325–354.
- Paszkowski J, Shillito RD, Saul M *et al.* (1984). Direct gene transfer to plants. *EMBO Journal* 3: 2717–2722.

CAPÍTULO I

- Patiño, F. (1997). Recursos Genéticos de *Swietenia* y *Cedrela* en los Neotrópicos. Propuestas para Acciones Coordinadas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma –Italia, pág. 58.
- Raubeson LA, Jansen RK (2005) Chloroplast genomes of plants. In RJ Henry, ed, Diversity and Evolution of Plants—Genotypic and Phenotypic Variation in Higher Plants. CABI Publishers, Cambridge, MA, pp 45–68.
- Ruf S, Hermann M, Berger IJ, Carrer H, Bock R (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. Nat Biotechnol 19: 870–875.
- Sanford, J. (1988). The biolistic process. Trends Biotech. 6: 299-302.
- Sanford, J.C., T.M. Klein, E.D. Wolf y N. Allen. (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. J. Part. Sci. Tech. 5:27-37.
- Santoyo G. (2008). Recombinería en bacterias: ingeniería del ADN usando recombinación homóloga. Revista Latinoamericana de Microbiología. 50: 38-47.
- Saskatchewan Agricultural Biotechnology Information Center (SABIC), (2001). What is genetic transformation?. AgBiotech Infosource. ISSUE 68. Disponible en línea en http://www.agwest.sk.ca/publications/infosource/inf_oct01.pdf
- Saski C, Lee SB, Fjellheim S, Guda C, Jansen RK, Luo H, Tomkins J, Rognli OA, Daniell H, Clarke JL (2007) Complete chloroplast genome sequences of *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor* and *Agrostis stolonifera*, and comparative analyses with other grass genomes. Theor Appl Genet 115: 571–590.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2006). Convocatoria para el otorgamiento de apoyos de los Programas de Desarrollo Forestal de la Comisión Nacional Forestal. Diario Oficial de la Federación del 7 de marzo de 2006.

SEMARNAT (2002). Programa Nacional Forestal 2001–2006.

Serino G, Maliga P (1997) A negative selection scheme based on the expression of cytosine deaminase in plastids. *Plant J* 12: 697–701.

Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz PTJ, Staub JM, Nehra NS (1999) Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J* 19: 209–216.

Simula, M., Siquiera, G. Sosa–Cedillo V. and Synnott, T. (2005). Achieving the ITTO Objective 2000 and sustainable forest management in Mexico. International Tropical Timber Organization. ITTC (XXXIX) / 5. 168pp.

Singh ND, Ding Y and Daniell H (2009). Chloroplast-derived vaccine antigens and biopharmaceutical: protocols for expression, purification, or oral delivery and functional evaluation. *Methods Mol Biol* 483: 163–192.

Styles, B. T. and Khosla, P. K. (1976). Cytology and reproductive biology of Meliaceae. In: *Tropical trees: variation, breeding and conservation*. (eds). Linnean Society Symposium. Series Number 2 : 61–68.

Svab Z, Maliga P (1993) High–frequency plastid transformation in tobacco byselection for a chimeric aadA gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 913–917.

Szostak, J. W., T.L. Orr–Weaver, R.J Rothstein & F.W. S. tahl. (1983). The double–strand–break repair model for recombination. *Cell*. 33:25–35.

Tang, W. and Tian Y. (2003). Transgenic loblolly pine (*Pinus taeda* L.) plants expressing a modified δ –endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* with enhanced resistance to *Dendrolimus punctatus* Walker and *Crypyothelea formosicola* Staud. *Journal of Experimental Botany* 54 (383) 835–844.

CAPÍTULO I

- Tullume, C. (2000). Características anatómicas y propiedades físico mecánicas del Cedro (*Cedrela odorata* L) proveniente de Satipo. Tesis para optar el título de Ingeniero Forestal. UNALM – Perú.
- Tzfira, T.; Vaidya, m. And Citovsky, V. (2002). Increasing plant susceptibility to *Agrobacterium* infection by overexpression of the Arabidopsis nuclear protein VIP1. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA*. Vol. 99, No.16; p. 10435–10440.
- Urbina, M. (2000). “Manejo y poda de raíces en árboles de *Schinus molle* (molle peruano), *Jacaranda mimosifolia* (Jacaranda), *Grevillea robusta* (Grevillea) y *Cedrela odorata* (cedro)”. Tesis para optar el Título de Ingeniero Forestal. UNALM –Perú.
- Valderrama F. A. M; Arango I. R; Afanador K. L. (2005). Transformación de Plantas Mediada por *Agrobacterium*: “Ingeniería Genética Aplicada”. *Rev.Fac. Nal. Agr. Medellín*. Vol.58, No. 1. P. 2569–2585.
- Vázquez–Yanes, C., A. I. Batis Muñoz, M. I. Alcocer Silva, M. Gual Díaz y C. Sánchez Dirzo. (1999). Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. Reporte técnico del proyecto J084. CONABIO – Instituto de Ecología, UNAM.
- Verma D. y Daniell H. (2007). Chloroplast Vector Systems For Biotechnology Applications. Department of Molecular Biology and Microbiology, College of Medicine, University of Central Florida, Orlando Florida. *Plant Physiology*, December 2007, vol. 145, pp. 1129–1143.
- Verma D., Samson NP., Koya V and Daniell H. (2008). A protocol for expression of foreign genes in chloroplast. *Nat Protoc* 3: 739-758.
- Viitanen PV, Devine AL, Khan MS, Deuel DL, Van Dyk DE, Daniell H (2004) Metabolic engineering of the chloroplast genome using the *Escherichia coli* *ubiC* gene reveals

that chorismate is a readily abundant plant precursor for p-hydroxybenzoic acid biosynthesis. *Plant Physiol* 136:4048-4060.

Xiao-Hua, S., Bing-Yu, Z., Qin-Jun, H., Lie-Jian, H., Xiang-Hua, Z. (2003). Advances in tree genetic engineering in China. In: *Proceedings of the XII World Forestry Congress, Quebec City, Canada*. Disponible en línea en: www.fao.org/docrep/article/wfc/xii/0280-b2.htm

Ye GN, Daniell H, Sanford JC (1990) Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant Mol Biol* 15: 809-819.

Zhong, R., Morrison, W. H., Himmelsbach, D. S., Poole, F. L. and Ye, Z-H. (2000). Essential Role of Caffeoyl Coenzyme A O Methyltransferase in Lignin Biosynthesis in Woody Poplar Plants. *PlantPhysiol.* 124 563-577.

CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ESTRATEGIA GENERAL DEL PROYECTO

La estrategia general del proyecto consistió en amplificar por separado y mediante PCR las regiones del plastoma de cedro rojo que comprenden al *rrn16S-trnI* (PCR-I) y *trnA-rrn23S* (PCR-II) (figura 2.1). Para realizar la amplificación de estas regiones fue necesario el diseño de oligonucleótidos específicos. Como no se contaba con la secuencia de nucleótidos de esta región en cedro se partió de una secuencia obtenida por Gregorio-Martínez (2010), quien aisló y secuenció un fragmento de ~ 923 pb del gen *rrn23S* de roble (*T. rosea*). Se utilizó esta secuencia por que el roble al igual que cedro es una especie leñosa originaria de América, su distribución geográfica es similar y filogenéticamente deberían estar más estrechamente relacionados en comparación a tabaco que es una especie herbácea, especie de la cual ya existen oligonucleótidos diseñados para amplificar esta región.

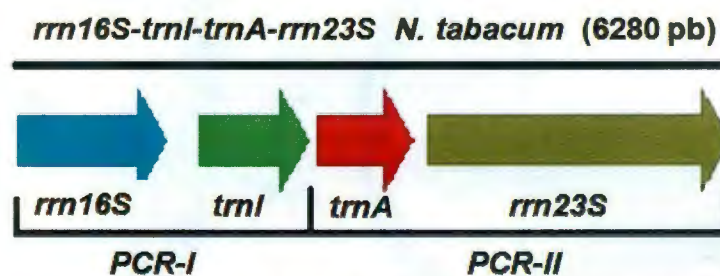


Figura 2.1 Representación esquemática de las regiones que se pretenden amplificar del plastoma de cedro rojo. Se muestra el tamaño total de la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* en tabaco los cuatro marcos de lectura y las secuencias que se desean amplificar.

Utilizando el fragmento de ~923 pb del gen *rrn23S* (de roble) se realizó una búsqueda de secuencias homólogas, en la base de datos GeneBank. Utilizando la herramienta BLAST (por sus siglas en inglés, Basic Local Alignment and Search Tool) de nucleótidos (blastn) (Zheng *et al.*, 2000), se seleccionaron las secuencias homólogas en 10 especies (cuadro 3.1) cuya identidad estuvo entre el 98% y 99% con respecto a la secuencia de roble. Después se aislaron *in silico* las regiones *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* de las 10 especies seleccionadas y finalmente se realizó un alineamiento utilizando el software Sequencher® versión 4.1.4 (Gene Codes, USA). Del alineamiento se obtuvo una secuencia consenso

que sirvió para hacer un mapa de restricción *in silico* de la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* y para diseñar los oligonucleótidos (cuadro 3.2) a los cuales se les adicionaron sitios de restricción, cuidando que esos sitios no se encontraran en las secuencias *rrn16S-trnI* y *trnA-rrn23S* ni en el vector pUC19. Estos sitios de restricción fueron utilizados para poder insertar los fragmentos en pUC19. Después de que los fragmentos de la región *rrn16S-trnI* (PCR-I) y *trnA-rrn23S* (PCR-II) de cedro fueron amplificados, se insertaron en pUC19, con esto se obtuvieron dos construcciones, las cuales se nombraron pCBL-1 para el fragmento de PCR-I (figura 2.2 a) y pCBL-3 para el fragmento PCR-II (figura 2.2 b).

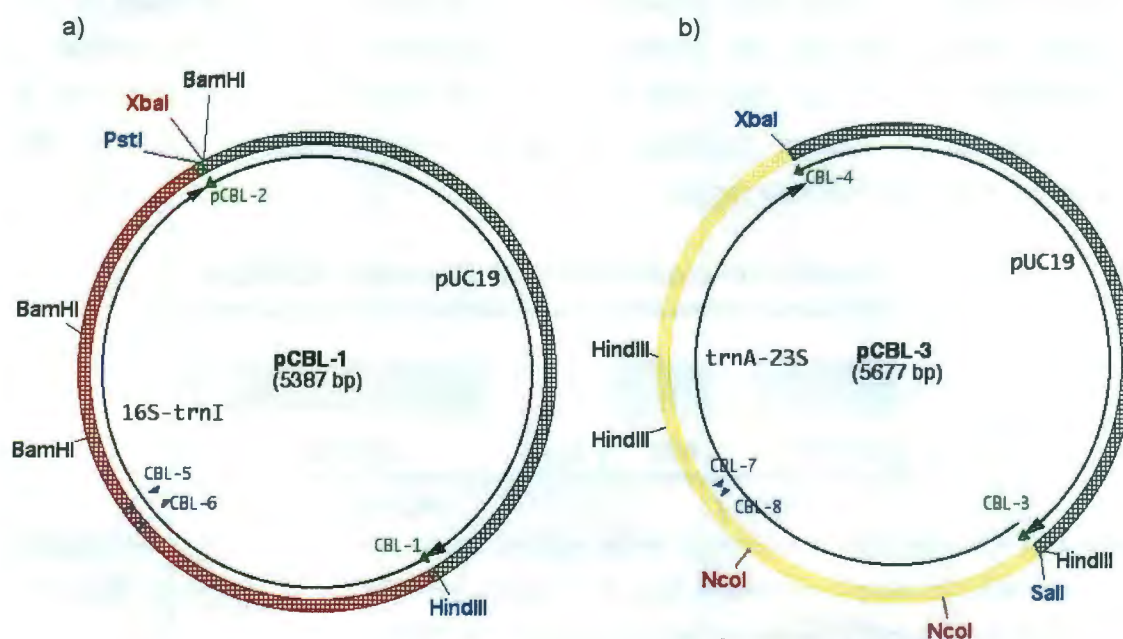


Figura 2.2 Estructura esquemática de pCBL-1 y pCBL-3. a) *rrn16S-trnI* (PCR-I) insertado en pUC19, b) PCR-II insertado en pUC19 (pCBL-3). Las flechas representan el sentido de los marcos de lectura *rrn16S-trnI* y *trnA-rrn23S*. Se indican los sitios de restricción y las posiciones de los oligonucleótidos utilizados para verificar las construcciones y la secuenciación.

Después de que se obtuvieron pCBL-1 y pCBL-3, se clonó el fragmento *trnA-rrn23S* de pCBL-3 en pCBL-1 y se obtuvo pCBL-4 el cual contiene ambos fragmentos de cedro (*rrn16S-trnI* o PCR-I y *trnA-rrn23S* o PCR-II). El pCBL-4 (figura 2.3), se diseñó de tal

modo que incluyera un sitio de restricción *NotI* en la región intergénica, que fue utilizado para insertar el casete de expresión.

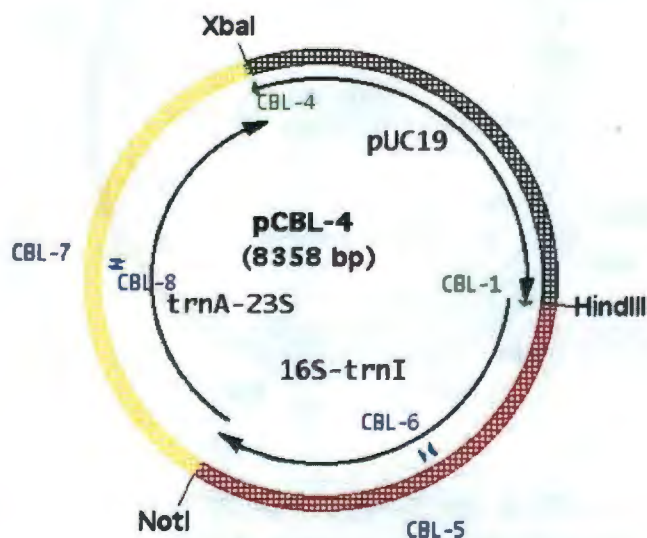


Figura 2.3 Esquema de pCBL-4. Las flechas representan el sentido de los marcos de lectura *rm16S-trnI* y *trnA-rm23S*. Se indican los sitios de restricción y las posiciones de los oligonucleótidos utilizados para verificar las construcciones.

El casete de expresión fue diseñado *in silico* a partir de secuencias codificantes y regulatorias reportadas en la base de datos del GeneBank (cuadro 13). El casete contiene el gen reportero *gfp* y el gen marcador de selección *aadA*, los cuales están bajo el control de las secuencias reguladoras del promotor del *rm16S* y las secuencias no traducibles (5'UTR y 3'UTR) que se indican en la figura 2.4. Se adicionaron los sitios de restricción *NotI* flanqueando al casete, para insertar el casete de expresión en pCBL-4, y obtener pCBL-5 (figura 2.4), el cual es el vector para la transformación de cloroplastos de cedro rojo.

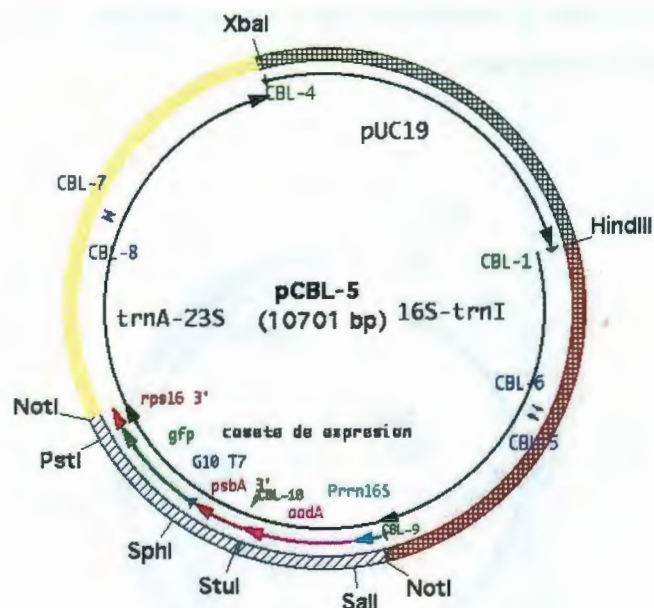


Figura 2.4 Esquema de pCBL-5. Las flechas representan el sentido de los marcos de lectura *rrn16S-trnI* y *trnA-rrn23S* y del cassette de expresión. Se indican los sitios de restricción y las posiciones de los oligonucleótidos utilizados para verificar la construcción.

2.2 EXTRACCIÓN DE DNA DE CLOROPLASTO (cpDNA)

Para aislar el cpDNA se utilizaron 5 g de hojas maduras de cedro rojo previamente incubadas en oscuridad por 48 h, estas hojas fueron maceradas utilizando 20 mL del amortiguador STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA), posteriormente la mezcla fue filtrada con una malla (gasa) y el líquido resultante se centrifugó a 2000 rpm por 20 min, se recuperó el sobrenadante y se desechó el precipitado. Esta nueva fase líquida fue centrifugada a 6000 rpm por 20 min. Se descartó el sobrenadante, el precipitado fue resuspendido en 20 mL de amortiguador STE (la resuspensión debe de realizarse lo más delicadamente posible) y nuevamente se centrifugó a 6000 rpm/ 20 min. Posteriormente se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 200 µL de amortiguador ST (400 mM sacarosa, 50 mM Tris pH 7.8, 0.1% seroalbúmina) al que se le adicionaron 0.5 U de DNasa A (Invitrogen) dejándose incubar 30 min a 37 °C (mezclando periódicamente). Para detener la reacción de la DNasa A se agregó EDTA a una concentración final de 0.2 M. Para limpiar los organelos de la DNasa se adicionaron 50

mL de amortiguador NETF (1.25 M NaCl, 50 mM Tris pH 8, 50 mM EDTA, 50mM NaF). Esta mezcla fue centrifugada a 6000 rpm por 20 min, al final de la centrifugación se descartó el sobrenadante y se conservó el precipitado a -20 °C. Posteriormente, se resuspendió en 600 µL de amortiguador TEN (100 mM NaCl, 100 mM Tris pH 7.2, 50 mM EDTA, 0.2% β-Mercaptoetanol) a 0 °C y también fueron adicionados 30 mL de SDS al 20%. Después de la lisis se adicionó a la muestra un volumen de fenol equilibrado en el amortiguador TRIS 1M pH 8.0 y se mezcló intensamente por 5 min, para que después fuera centrifugada a 13000 rpm a 4 °C. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo al cual se le agregó un volumen de una solución (1:1 V/V) de fenol: cloroformo, se mezcló intensamente y se centrifugó 10 min a 13000 rpm a 4 °C (este paso se repitió una vez más), posteriormente se adicionó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 V/V) después de mezclar intensamente se centrifugó por 10 min a 13000 rpm a 4 °C. El DNA se precipitó con un décimo de volumen de acetato de amonio 5 M y un volumen de isopropanol, se incubó toda la noche a 4 °C y se centrifugó por 10 min a 13000 rpm. Posteriormente, se desechó el sobrenadante, y el precipitado fue lavado con 1 mL de etanol al 70 %. Por último se centrifugó 5 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla para posteriormente ser resuspendida en 20 µL de amortiguador TE y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

2.3 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN *rrn16S-trnI* (PCR-I)

Una vez extraído el cpDNA de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.), se procedió a realizar la PCR del fragmento *rrn16S-trnI* (PCR-I), para ello se partió de 20 ng de cpDNA al cual se le adicionaron 20 picomoles de los oligonucleótidos CBL-1 10X y CBL-2 10X del cuadro 3.2, 1µL de los dNTPs 10X (10mM de cada dNTP), 10 µL de amortiguador 5X, 2 µL de MgCl₂ y 0.5 unidades de la DNA polimerasa iProof™ (BIO-RAD) y agua ultrapura para alcanzar un volumen final de 50 µL. Las condiciones del PCR fueron: un ciclo de desnaturalización a 95 °C por 4 min, 34 ciclos de 95 por 30 s, 59 °C por 1 min, 72 °C por 3 min, y un ciclo final de 72 °C por 10 min. Como resultado se esperaba que el producto amplificado fuera de ~ 2480 pb según lo encontrado en tabaco, sin embargo de acuerdo a lo reportado por Rodríguez-López (2010) este fragmento en cedro es de ~ 2700 pb.

2.4 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN *trnA-rrn23S* (PCR-II)

La región *trnA-rrn23S* se amplificó por PCR, como templado se utilizaron 20 ng de cpDNA, 20 pmoles de los oligonucleótidos CBL-3 y CBL-4 (cuadro 3.2), 1 µL de los dNTPs 10X (10mM de cada dNTP), 10 µL de amortiguador 5X, 2 µL de MgCl₂ y por último 0.5 unidades de DNA polimerasa iProof™ (BIO-RAD), la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL. Las condiciones del PCR fueron: un ciclo de desnaturalización a 95 °C por 4 min, 34 ciclos de 95 por 30 s, 58.4 °C por 1 min, 72 °C por 3 min, y un ciclo final de 72 °C por 10 min. para esta PCR se esperaba que el amplicón fuese de ~ 3000 pb.

2.5 PREPARACIÓN DEL VECTOR pUC19 Y DE LOS INSERTOS

Para realizar la clonación de la región *rrn16S-trnI* (PCR-I) se utilizó el vector de clonación pUC19 (figura 2.5), el cual dentro de su sitio de clonación múltiple contiene los sitios *HindIII* y *PstI*, que fueron utilizados debido a que no cortan la región *rrn16S-trnI* (PCR-I) y por tanto los oligonucleótidos utilizados para amplificar el PCR-I adicionan estos sitios de restricción. Se realizó una doble digestión del vector pUC19 y el producto de PCR-I primero se digirieron con *HindIII* según la reacción que se muestra en la cuadro 2.1.

Cuadro 2.1 Reacciones de digestión utilizando *HindIII* para preparar el vector pUC19 y el inserto PCR-I

Reactivos	Vector pUC19	Inserto PCR-I
DNA	5 µL (~1 µg)	20 µL (~800 ng)
Amortiguador (E) 10X	4 µL	5 µL
BSA 10X	4 µL	5 µL
Enzima (<i>HindIII</i>) 37 °C	1.5 U	1 U
H ₂ O	25.5 µL	19 µL
Volumen final	40 µL	50 µL

Posteriormente se realizó la digestión con la enzima *PstI*, para lo cual el producto de la digestión con *HindIII* se precipitó adicionando 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto, se dejó incubar a -80 °C por 1 h para después centrifugar por 30 min a 13000 rpm. Por último se decantó el sobrenadante y se realizaron

2 lavados con etanol al 70%. Se dejó secar la pastilla, la cual se resuspendió y digirió como se muestra en la cuadro 2.2.

Cuadro 2.2 Reacciones de digestión utilizando *Pst*I para preparar vector pUC19 e inserto PCR-I

Reactivos	Vector pUC19	Inserto PCR-I
DNA	Pastilla resuspendida	Pastilla resuspendida
Amortiguador (NEBs 3) 10X	4 µL	5 µL
BSA 10X	4 µL	5 µL
Enzima (<i>Pst</i> I) 37 °C	1.5 U	1 U
H ₂ O	30.5 µL	31 µL
Volumen final	40 µL	40 µL

Una muestra de los productos de ambas digestiones se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% para corroborar la integridad del DNA y verificar que se haya llevado a cabo la digestión total del vector.

Para clonar la región *trnA-rm23S* (PCR-II) en pUC19, se utilizaron los sitios de restricción *Sall* y *Xba*I, la estrategia utilizada fue realizar una doble digestión del vector y del inserto como ya se describió para clonar la región *rm16S-trnI*

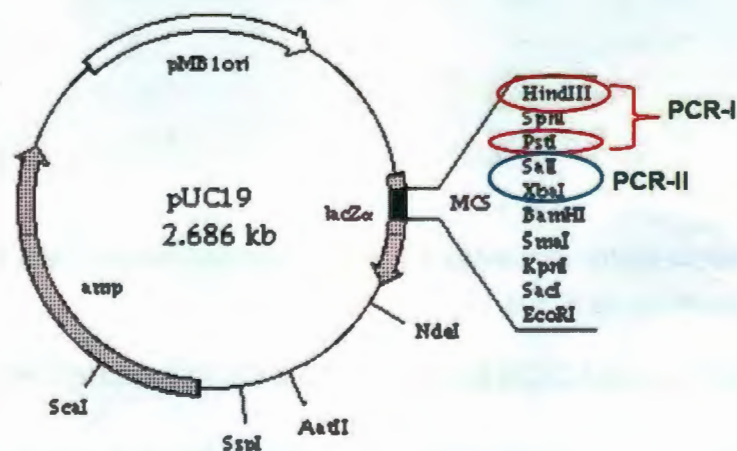


Figura 2.5 Vector pUC19. En este diagrama se muestra como está estructurado el esqueleto del vector de clonación utilizado en este trabajo. Se señalan las enzimas que se encuentran en el sitio de clonación múltiple y en círculos se indican las enzimas que se emplearon para clonar PCR-I (rojo) y PCR-II (azul).

2.6 LIGACIÓN DE LAS REGIONES *rrn16S-trnI* Y *trnA-rrn23S* En pUC19

La ligación de cada inserto (regiones *rrn16S-trnI* y *trnA-rrn23S*) en pUC19 se realizó de acuerdo a los parámetros que se muestran en los cuadros 2.3 y 2.4.

Cuadro 2.3 Condiciones para realizar la ligación pUC19 + PCR-I

Reactivos	3:1	6:1	Control	Control
Amortiguador 10X	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
pUC19 (<i>HindIII</i> + <i>PstI</i>)	5 µL (50 ng)	5 µL (50 ng)	5 µL	5 µL
PCR-I (<i>HindIII</i> + <i>PstI</i>)	3 µL (150 ng)	6 µL (300 ng)	---	---
T4 DNA ligasa	1 U	1 U	1 U	---
H ₂ O	6 µL	3 µL	9 µL	10 µL
Volumen final	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

Cuadro 2.4 Condiciones para realizar la ligación pUC19 + PCR-II

Reactivos	3:1	6:1	Control	Control
Amortiguador 10X	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
pUC19 (<i>Sall</i> + <i>XbaI</i>)	5 µL (50 ng)	5 µL (50 ng)	5 µL	5 µL
PCR-II (<i>Sall</i> + <i>XbaI</i>)	3 µL (150 ng)	6 µL (300 ng)	---	---
T4 DNA ligasa	1 U	1 U	1 U	---
H ₂ O	6 µL	3 µL	9 µL	10 µL
Volumen final	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

Las ligaciones fueron incubadas a 4 °C durante toda la noche para posteriormente realizar la transformación de *E. coli*.

2.7 TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* CON LOS PRODUCTOS DE LIGACIÓN

Para llevar a cabo la transformación de la cepa DH5α de *E. coli* se prepararon placas con medio LB suplementado con 100 µg mL⁻¹ de ampicilina, a las cuales se les agregaron 47 µL de una mezcla total de 160 µL de un stock de X-gal a una concentración de 20 mg mL⁻¹ y 28 µL de un stock 0.1 M de IPTG, esto se hizo con la finalidad de seleccionar colonias blancas, en las cuales no se llevó a cabo la complementación α de la β-galactosidasa y

por tanto fueran posibles clonas positivas. Para realizar la transformación de *E. coli*, se descongelaron en hielo 100 μL de células quimiocompetentes preparadas por el método de cloruro de rubidio, posteriormente se agregaron 10 μL de la reacción de ligación.

La mezcla se incubó por 30 min, posteriormente las células se sometieron a un choque térmico (1 min a 42 °C) para rápidamente ser transferidas e incubadas en hielo durante 5 min. Posteriormente se adicionaron 900 μL de medio LB líquido sin antibiótico y se incubó por 1.5 h a 37 °C con agitación a 150 rpm. Posteriormente se plaquearon 100 μL del cultivo bacteriano en medio selectivo (con ampicilina), los restantes 900 μL se centrifugaron durante 2 min a 13000 rpm, el precipitado resultante se resuspendió en 100 μL de medio LB líquido sin antibióticos y también fue plaqueado. Por último se dejaron incubando a 37 °C toda la noche.

2.8 EXTRACCIÓN DE DNA DE PLÁSMIDO POR EL MÉTODO DE LISIS ALCALINA

Para la discriminación de las posibles clonas positivas con inserto se utilizó el método por coloración azul -blanco [complementación α en presencia de *X-gal* (Sanbrook y Russell, 2001)]. Como clonas positivas se seleccionaron colonias blancas, como control negativo o de religación del vector se tomó una colonia azul. Se extrajo el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina como se describe a continuación: con un palillo de madera estéril se picaron las colonias seleccionadas con las que se inocularon 3 mL de medio LB líquido con 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina. Este cultivo se incubó toda la noche en un agitador orbital a 37 °C a 250 rpm, las células fueron colectadas centrifugando cada cultivo en un tubo eppendorf de 1.5 mL a 13000 rpm por 2 min a 4 °C, posteriormente se desechó el sobrenadante y el precipitado celular se resuspendió en 100 μL de la solución Birboim I (Sanbrook y Russell, 2001) [glucosa 50 mM, Tris (pH 8) 25 mM, EDTA (pH 8) 10 mM] y se agitó vigorosamente en el vórtex, para después agregar 200 μL de la solución Birboim II (Sanbrook y Russell, 2001) [NaOH 0.2 M, SDS 1% (p/v)] agitando los tubos gentilmente. Posteriormente fueron agregados 150 μL de la solución Birboim III (Sanbrook y Russell, 2001) (acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial, H_2O) a 4 °C. Las muestras fueron incubadas en hielo por 5 min, después se centrifugó la mezcla a 13000 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo en donde se precipitó el DNA adicionando un volumen de isopropanol a temperatura ambiente e incubando por 2 min,

CAPÍTULO II

por último el DNA fue colectado por centrifugación a 13000 rpm por 5 min a 4 °C, retirando el sobrenadante y lavando la pastilla con etanol al 70 %. Se dejó evaporar el etanol y la pastilla se resuspendió en 30 µl de TE 10:1 (Tris-EDTA) y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

2.9 DIGESTIONES PARA VERIFICAR LA INSERCIÓN DE LOS INSERTOS

Para verificar la ligación de los insertos en pUC19 se realizaron digestiones. Para cada enzima se utilizó el amortiguador y las condiciones recomendadas por el fabricante (New England Biolabs). Las digestiones se llevaron a cabo en un volumen final de 15 µL con 1 U de enzima por µg de DNA, durante al menos 3 h y a la temperatura óptima de cada enzima de restricción

2.10 ELECTROFORESIS DEL DNA

Para visualizar los resultados de las extracciones de DNA de las posibles clonas transformadas y digestiones, se utilizaron geles de agarosa al 0.8% y 1 % en un volumen de 40 mL. Para hacer los geles se utilizó amortiguador TAE (Tris 2M, ácido acético glacial 1M, 100 mM de EDTA pH 8) al cual se le añadió bromuro de etidio a una concentración final de 10 µg/mL. Para correr la electroforesis se utilizó una cámara BIORAD minisubcell^{MR} aplicando 90 V durante 60 min. El resultado se visualizó en un fotodocumentador marca BIORAD^{MR}.

2.11 SECUENCIACIÓN

Los plásmidos seleccionados que contienen *rrn16S-trnI* (pCBL-1) y *trnA-rrn23S* (pCBL-3) se enviaron a secuenciar a Clemson University Genomics Institute (CUGI). La secuenciación se llevó a cabo según el método de Sanger *et al.*, 1977, utilizando BigDye en un sistema automático. Para ello se purificó DNA plasmídico de las clonas 3 y 9 de pCBL-1 y pCBL-3 respectivamente por el método de lisis alcalina y columnas de sílica de QIAGEN QIAprep^{MR} miniprep. Este DNA sirvió para realizar las reacciones de secuenciación que consistieron en 50 ng de DNA y 1pmol de oligonucleótidos en un volumen final de 3 µL.

2.12 ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Para llevar a cabo los análisis *in silico* realizados en este trabajo se utilizó el software Sequencher® versión 4.1.4 (Gene Codes, USA). Las secuencias obtenidas de la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) fueron comparadas con las secuencias que se encuentran en la base de datos del GenBank, utilizando la herramienta BLAST de nucleótidos (blastn). Los alineamientos múltiples entre secuencias se realizaron utilizando el software ClustalW (Tompson *et al.*, 1994).

BIBLIOGRAFÍA

- Gregorio-Martínez. A. C. (2010). Aproximaciones biotecnológicas para la manipulación genética de caoba (*Swietenia macrophylla*) y primavera (*Tabebuia donell-smithii*). Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. 65 p.
- Rodríguez-López T. (2010). Clonación de regiones cloroplastídicas de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) para la elaboración de vectores de clonación. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. México. 53 p.
- Sambrook, J. and Russell, D.S. (2001). Molecular cloning. A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger F., Nicklen S and Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 74(12): 5463–5467.
- Sequencher® version 4.1.4 Sequence Analysis Software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA <http://www.genecodes.com>
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic acids research, 22 (22):4673-80.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L. and Miller W. (2000). "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol; 7(1-2):203-14.

CAPÍTULO III RESULTADOS

3.1 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Dado que la secuencia del cloroplasto de cedro rojo no se encuentra reportada, se obtuvieron secuencias homólogas de la región de interés en especies filogenéticamente cercanas. Tales secuencias fueron alineadas para poder diseñar oligonucleótidos que sirvieron para amplificar la región *rrn16S-trnI* y *trnA-23S* de cedro rojo. Para el análisis se tomó como referencia un segmento de ~ 923 pb que se obtuvo de la secuenciación de un fragmento de la región *rrn23S* de roble (Gregorio-Martínez, 2010). Se decidió utilizar esta secuencia por ser de una especie arbórea originaria de América y encontrarse distribuida geográficamente igual a cedro rojo. Tomando esta secuencia como base se procedió a realizar un BLAST de nucleótidos (blastn) (Zhang *et al.*, 2000) en la base de datos del GeneBank, seleccionando las 10 especies que mostraron el puntaje más alto (score) y el mayor porcentaje de identidad con la secuencia de roble, las especies seleccionadas se presentan en el cuadro 3.1.

Cuadro 3.1 Especies utilizadas para realizar el alineamiento y diseño de los oligonucleótidos usados en este trabajo.

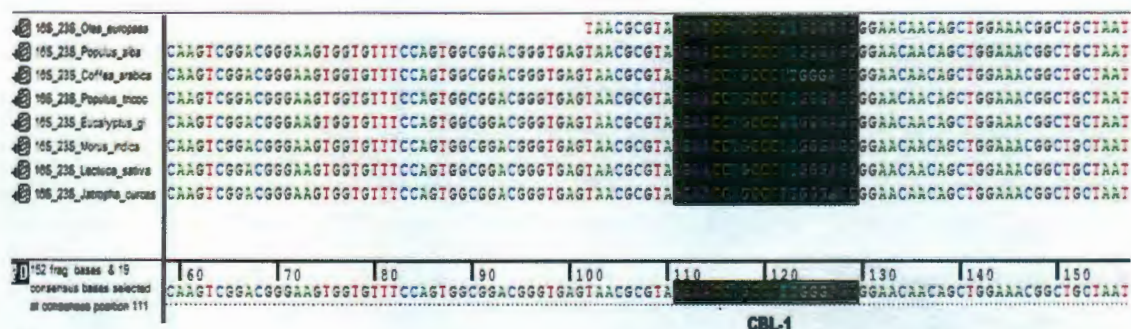
Especie	Número de Accesión	Score Máximo	Score total	Cobertura	Identidad
<i>Olea europaea</i>	GU228899.1	1652	3304	99%	99%
<i>Daucus carota</i>	DQ898156.1	1600	3200	98%	98%
<i>Lactuca sativa</i>	DQ383816.1	1600	3200	99%	98%
<i>Eucalyptus globulus</i>	AY780259.1	1600	3200	99%	98%
<i>Coffea arabica</i>	EF044213.1	1594	3189	99%	98%
<i>Jatropha curcas</i>	FJ695500.1	1589	3178	99%	98%
<i>N. tabacum</i>	Z00044.2	1589	3178	99%	98%
<i>Morus indica</i>	DQ226511.1	1583	3167	99%	98%
<i>Populus trichocarpa</i>	EF489041.1	1572	3145	99%	98%
<i>Pupulus alba</i>	AP008956.1	1572	3145	99%	98%

CAPÍTULO II

Posteriormente se delimitó en cada una de estas especies la secuencia de la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S*, con la cual se hizo un alineamiento utilizando el software Sequencher® versión 4.1.4 (Gene Codes, USA). Como resultado del alineamiento se obtuvo que solo 8 de las 10 secuencias alineaban entre sí, siendo *N. tabacum* y *Daucus carota* las especies que no alinearon. Para el diseño de los oligonucleótidos, solo se utilizaron las 8 secuencias que si alinearon, se seleccionaron secuencias de 18-20 nucleótidos con un 100 % de identidad que se encontraban flanqueando las regiones de interés, con un contenido de GC de 55–65%, evitando que hubiese interacción entre ellas mismas y que se hicieran bucles. Se comprobó que los oligonucleótidos tuvieran una Tm en el rango de 58 a 60 °C [calculada utilizando el algoritmo de "Nearest Neighbor" (Breslauer *et al.*, 1986)], los parámetros utilizados para hacer el cálculo fueron a una con contracción de sal de 50 mM y una concentración de DNA de 200 pM.

En la figura 3.1 se muestra parte del alineamiento y la región a partir de la cual se diseñaron los oligonucleótidos CBL-1 a CBL-4. De este mismo alineamiento se diseñaron los demás oligonucleótidos reportados en el cuadro 3.2.

a)



b)



c)



d)



Figura 3.1 Alineamientos de la región *rn16S-trnI-trnA-rn23S* del plastoma de 8 especies vegetales utilizados para el diseño de los oligonucleótidos del Cuadro 3.2. a) y b) corresponden a las secuencias flanqueantes de la región *rn16S-trnI* [sentido (CBL-1) y antisentido (CBL-2)] respectivamente. c) y d) secuencia flanqueantes de la región *trnA-rn23S* CBL-3 y CBL-4 (sentido y antisentido respectivamente).

CAPÍTULO II

Cuadro 3.2 Oligonucleótidos para amplificar la región *rrn16S-trnI* y *trnA-rrn23S* de *C. odorata* L.

Oligo.	Secuencia y características	TM °C	Amplicón
CBL-1	5' aaagctt AGAACCTGCCCTGGGAGG 3' FW- <i>rrn16S</i> (introduce un sitio <i>HindIII</i>)	61.6	~ 2700 pb Según la
CBL-2	5' ctgcagcgccgc TGGGCCATCCTGGACTTG 3' RV- <i>trnI</i> (introduce un sitio <i>PstI</i> y <i>NotI</i>)	58.4	secuencia de <i>O. europaea</i>
CBL-3	5' gtcgacgcgccgc GGGGATATAGCTCAGTTGGTAGAGC 3' FW- <i>trnA</i> (introduce un sitio <i>Sall</i> y <i>NotI</i>)	67.4	~ 3000 pb Según la
CBL-4	5' tctaga CGCTACCTTAGGACCGTTAT 3' RV- <i>rrn23S</i> (introduce un sitio <i>XbaI</i>)	58.4	secuencia de <i>O. europaea</i>
CBL-5	5' CCAGCTCCCATAGTGTGAC 3' RV interno de la región <i>rrn16S-trnI</i>	59.5	~ 1300 pb
CBL-6	5' ATCGCTAGTAATCGCCGGTC 3' FW interno de la región <i>rrn16S-trnI</i>	60.5	~ 1400 pb
CBL-7	5' GGTCCTTGCTGATTACAC 3' RV interno de la región <i>trnA-23S</i>	57.3	~ 1300 pb
CBL-8	5' CTCTGACCCGAGTAGCATG 3' FW interno de la región <i>trnA-23S</i>	59.5	~ 1700 pb
CBL-9	5' GGGCGAGGTCTCTGGTTC 3' FW extremo final del gen <i>trnI</i>	60.7	~ 1049 pb
CBL-10	5' GCCGACTACCTTGGTGATC 3' RV extremo final del gen <i>aadA</i> del casete de expresión	59.5	

* TM calculada mediante el algoritmo de "Nearest Neighbor" (Breslauer et al., 1986)

3.2 ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE LA REGIÓN *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S*

Como era necesario adicionar sitios de restricción (a los oligonucleótidos) para poder clonar los fragmentos de PCR en el vector pUC19. Se realizó un análisis de restricción *in silico* a la secuencia consenso obtenida del alineamiento mostrado en la figura 3.1 Con base en el análisis *in silico* se seleccionaron 5 enzimas de restricción que no cortaban la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* (*NotI*, *PstI*, *Sall*, *XbaI* y *StuI*), a su vez, se seleccionaron las enzimas *HindIII* y *SphI*, que de acuerdo al análisis deberían cortar la secuencia pero no interferir con la clonación de los productos de PCR-I y PCR-II. Se utilizó *HindIII* para clonar la región *rrn16S-trnI* en el vector pUC19.

Para comprobar que los sitios de restricción seleccionados del análisis *in silico* realmente funcionarían para clonar la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S*, se realizó la digestión del amplicón de 5.7 Kb de cedro, generado con los oligos 16S-F 5' ACGGGTGAGTAACGCGTAAG 3' e IRB23S 5' CGCTACCTTAGGACCGTTATAGTTAC

3' dirigidos contra tabaco, con las enzimas mencionadas. El resultado obtenido se muestra en la figura 3.2.

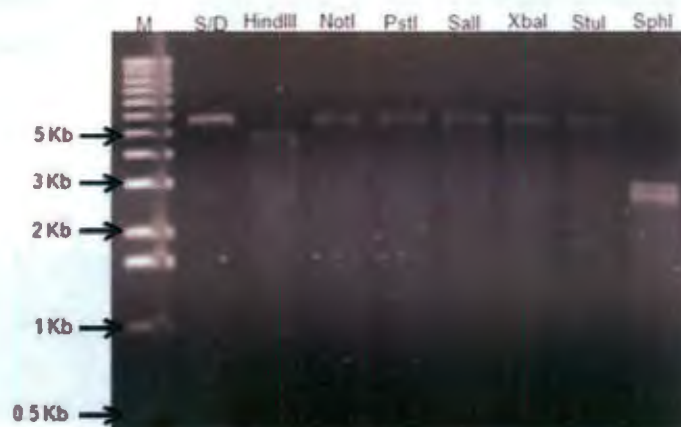


Figura 3.2 Digestión del amplicón de la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* de cedro rojo con las enzimas de restricción seleccionadas del análisis *in silico*. S/D, amplicón de 5.7 Kb sin digerir, cada carril corresponde a la digestión con una enzima de restricción. M, marcador de peso molecular 1 Kb (invitrogene).

Como se puede observar en la figura 3.2, la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* de cedro sin digerir (S/D) es de ~ 5.7 Kb (Rodríguez-López, 2010). Cuando se digirió con *HindIII* se observó una disminución en el tamaño del fragmento original (~ 5.7 Kb) obteniéndose una banda de ~ 4500 pb, lo que coincide con el análisis *in silico*. Cuando se digirió con *SphI* se obtuvo el resultado esperado, es decir, dos bandas de ~ 3000 pb y 2700 pb. Adicionalmente, se esperaba que las enzimas *NotI*, *PstI*, *SalI*, *XbaI*, *StuI* no cortaran la secuencia, esto basado en el análisis realizado utilizando el alineamiento de la sección anterior. Como se observa en la figura 3.2, cuando se digirió con estas enzimas se obtuvo que el producto de PCR no se corta con ninguna de esas enzimas indicando que la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* de cedro rojo, no contiene estos sitios de restricción lo cual coincidió con los análisis *in silico*. Estos resultados sugirieron que estas enzimas de restricción podían ser utilizadas en el diseño de los oligonucleótidos mostrados en el cuadro 3.2.

3.3 SECUENCIA *rrn16S-trnI* De CEDRO ROJO CLONADO EN pUC19 (pCBL-1)

Para amplificar la región *rrn16S-trnI* de cedro rojo se realizó la PCR-I utilizando el par de oligonucleótidos CBL-1/CBL-2 (cuadro 3.2). El resultado del PCR-I se muestra en la figura 3.3 a.

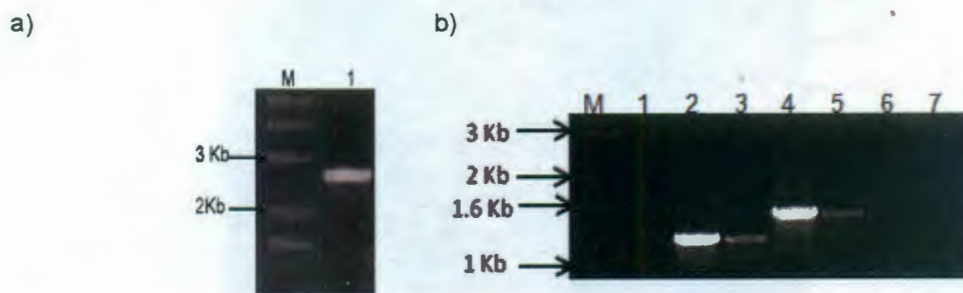


Figura 3.3 Análisis electroforético del amplicón *rrn16S-trnI* de cedro rojo. a) producto de PCR-I utilizando los oligonucleótidos CBL-1/CBL-2; b) carril 1, PCR-I reamplificado; carril 2, PCR utilizando los oligonucleótidos CBL-1/CBL-5 y como templado DNA del PCR-I; carril 3, PCR utilizando los oligonucleótidos CBL-1/CBL-5 y como templado DNA de cloroplasto de Cedro rojo; carril 4, PCR obtenido con los oligonucleótidos CBL-2/ CBL-6 y DNA del PCR-I como templado; carril 5, PCR obtenido con los oligonucleótidos CBL-2 – CBL-6 y DNA de cloroplasto de Cedro rojo como templado; carril 6, control negativo; carril 7, control del templado (misma cantidad de DNA utilizado como templado). M, corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogene).

Como resultado se obtuvo un amplicón de ~ 2700 pb, (figura 3.3 a), que corresponde al tamaño observado *in silico* en olivo (*O. europaea*) especie con la que se obtuvo mayor identidad en la secuencia de la región *rrn16S-trnI* con roble. Con la intención de verificar que los oligonucleótidos internos, diseñados a partir del alineamiento de las secuencias más cercanas al fragmento *rrn23S* de roble, amplificaran los fragmentos esperados en cedro y pudieran ser utilizados en pasos subsecuentes, se reamplificó utilizando como templado DNA del fragmento del PCR-I (*rrn16S-trnI*). Para realizar la reamplificación se utilizaron las combinaciones de oligonucleótidos CBL-1/CBL-5 y CBL-2/CBL-6 teniendo como control DNA de cloroplasto de cedro rojo. Como se puede observar en la figura 3.3 b, el producto de PCR-I pudo ser reamplificado con los oligonucleótidos CBL-1/CBL-2, se observó una banda tenue de ~ 2700 pb que corresponde al tamaño esperado (carril 1), con lo cual se corroboró que el amplicón obtenido inicialmente, efectivamente corresponde a la región *rrn16S-trnI*. Por otro lado, utilizando los oligonucleótidos CBL-

1/CBL-5 (carril 2) y CBL-2/CBL-6 (carril 4), se obtuvieron los fragmentos de los tamaños esperados, de ~ 1300 pb y ~ 1400 pb respectivamente, aunque el fragmento obtenido con los oligonucleótidos CBL-2/CBL-6 es mayor de ~ 1500 pb, esto puede deberse a que en cedro esta región es de un tamaño mayor. Cuando se utiliza como templado el DNA de cloroplasto de cedro, se obtiene el mismo número de bandas de tamaños equivalentes, con lo cual se concluyó que el fragmento obtenido correspondía a la región *rrn16S-trnI* de cedro rojo.

Para obtener pCBL-1 el vector pUC19 fue digerido con las enzimas *HindIII* y *PstI* mismas con las que fue digerido el fragmento de PCR-I correspondiente a la región del cloroplasto de cedro *rrn16S-trnI* (figura 3.4). Tanto el vector como el inserto fueron purificados y se preparó una reacción de ligación en una relación 3:1 inserto-vector. Se obtuvieron colonias que fueron analizadas por restricción con las enzimas *XbaI*, *BamHI* y *AatII*. *XbaI* lineariza el plásmido generando una banda de ~ 5387 pb; *BamHI* produce tres bandas de ~ 4218 pb, 791 pb y 378 pb, con *AatII* dos bandas de ~ 3203 pb y 2184 pb. Como se observa en la figura 3.5, al digerir la clona 3 se obtuvieron los patrones de restricción esperados por lo cual dicha clona era positiva.

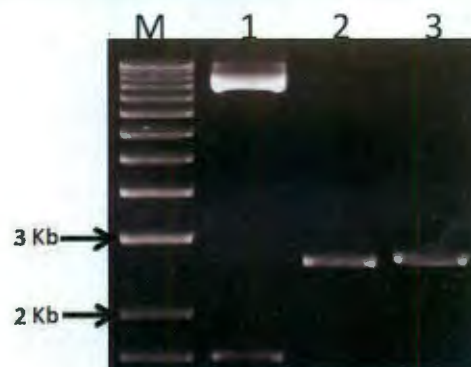
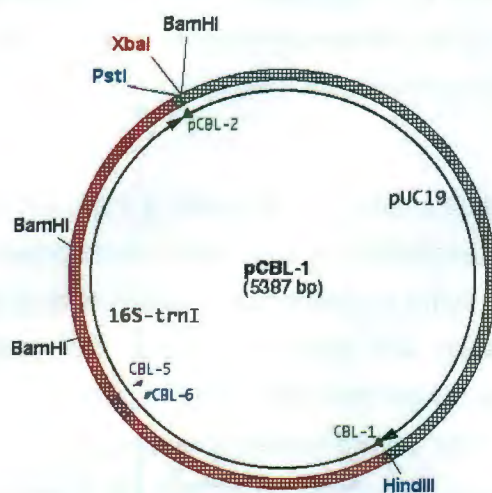


Figura 3.4 Preparación de inserto y vector para pCBL-1. Carril 1, vector pUC19 sin digerir; carril 2, vector pUC19 digerido con *HindIII* y *PstI*; carril 3, PCR-I digerido con *HindIII* y *PstI*. M, corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogene)

a)



b)

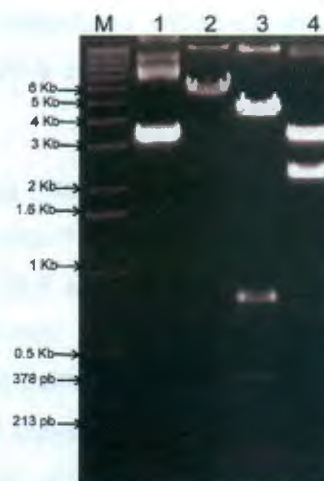


Figura 3.5 Análisis de restricción de pCBL-1. a) diagrama de la clona pCBL-1 y b) análisis de restricción; carril 1, pCBL-1 sin digerir; carril 2, pCBL-1 mas *XbaI*; carril 3, pCBL-1 mas *BamHI* y carril 4, pCBL-1 mas *AatII*. M, corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogene).

3.4 CLONACIÓN DE LA SECUENCIA *trnA-rn23S* pCBL-3

Se amplificó la región *trnA-rn23S* (PCR-II) de cedro rojo con los oligonucleótidos CBL-3/CBL-4 (cuadro 3.2), con un amplicón esperado de ~ 3000 pb (figura 3.6 a) de acuerdo a la secuencia de *Olea europaea*.

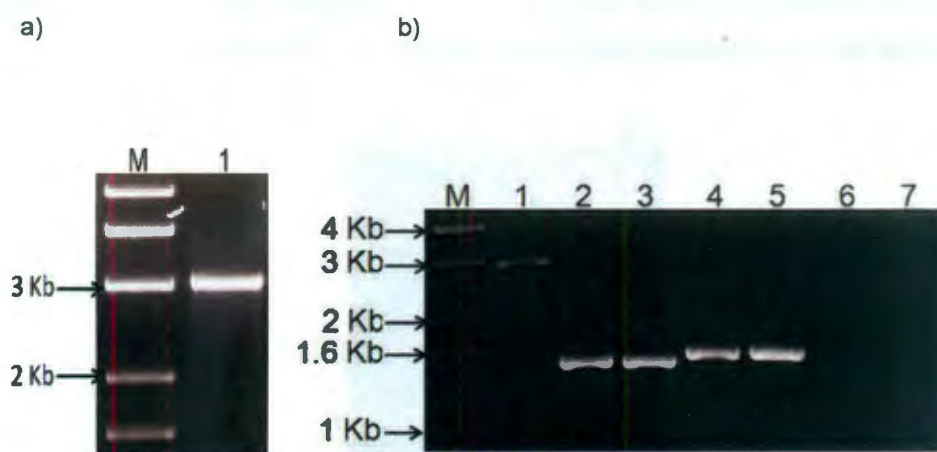


Figura 3.6 Análisis electroforético de la región *trnA-rn23S* de cloroplasto de cedro rojo. a) carril 1, producto de PCR-II utilizando los oligonucleótidos CBL-3/CBL-4, b) carril 1, PCR-II reamplificado; carril 2, PCR utilizando los oligonucleótidos CBL-3/CBL-7 y como templado DNA del PCR-II; carril 3, PCR utilizando los oligonucleótidos CBL-3/CBL-7 y como templado cpDNA de cedro rojo; carril 4, PCR obtenido con CBL-8/ CBL-4 y DNA utilizando como templado el PCR-II; carril 5, PCR obtenido CBL-8/CBL-4 y DNA de cloroplasto de cedro rojo como templado; carril 6, control negativo y carril 7, control del templado (misma cantidad de DNA utilizado como templado). M, corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogene).

Como resultado se obtuvo el amplicón esperado de ~ 3000 pb (figura 3.6 a). Al igual que la clona anterior se reamplificó el PCR-II utilizando los oligonucleótidos CBL-3/CBL-4, y para verificar que los oligonucleótidos internos fueran funcionales se probaron las combinaciones de oligonucleótidos CBL-3/CBL-7 y CBL-8/CBL-4 empleando como control DNA de cloroplasto de cedro rojo. Como se puede observar en la figura 3.6 b, al utilizar los oligonucleótidos CBL-3/CBL-4 para reamplificar el PCR-II, se observa una banda tenue de ~3000 pb (carril 1), con lo cual se corroboró que el amplicón obtenido inicialmente, efectivamente corresponde a la región *trnA-rn23S*. Por otro lado, utilizando

CAPÍTULO II

los oligonucleótidos CBL-3/CBL-7 (carril 2) y CBL-8/CBL-4 (carril 4), se obtuvieron dos fragmentos de ~ 1400 pb y ~ 1600 pb respectivamente, que corresponden a los tamaños esperados. Cuando se utilizó como templado el DNA de cloroplasto de cedro, se obtuvo el mismo número de bandas de tamaños equivalentes, con lo cual podemos concluir que el PCR-II corresponde a la región *trnA-rn23S* de cedro rojo.

Se digirieron el vector pUC19 y el PCR-II con las enzimas *Sall* y *XbaI*, posteriormente para verificar las digestiones se corrió un gel de agarosa al 0.8% (figura 3.7).

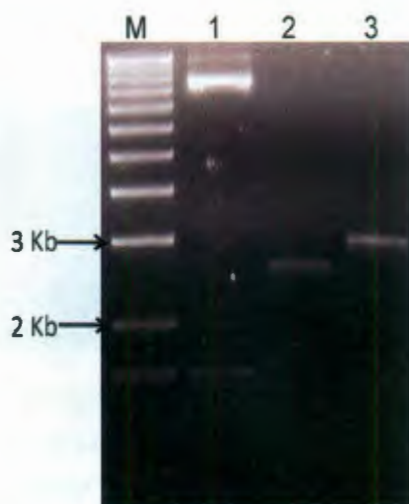


Figura 3.7 Purificación de la digestión con *Sall* y *XbaI* de pUC19 y PCR-II. Carril 1, vector pUC19 sin digerir; carril 2, vector pUC19 digerido con *Sall* y *XbaI*; Carril 3, PCR-II digerido con *Sall* y *XbaI*. M, corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogene).

Con los productos de digestión purificados se realizó una ligación en una relación 3:1 de inserto y vector, el producto de la ligación sirvió para transformar células competentes de *E. coli*. Dos colonias fueron seleccionadas para ver la presencia del inserto mediante digestión. *NcoI* debía generar dos bandas, de ~ 4895 pb y 782 pb, *HindIII* tres bandas (~ 3627 pb, 1779 pb y 271 pb) y *BamHI* una banda de ~ 5677 pb. Como se observa (figura 3.8 b) al digerir la clona 9 se obtuvieron los patrones de restricción esperados. Con *NcoI* (carril 1) se obtuvieron dos bandas del tamaño esperado (~ 4895 pb y 782 pb), el patrón de restricción con *HindIII* (carril 2) también correspondió a lo esperado (tres bandas de ~ 3627 pb, 1779 pb y 271 pb), sin embargo, con *BamHI* (carril 3) se observó un resultado distinto a lo esperado. Como se observa en la figura se obtuvieron 3 bandas de ~ 2980

pb, 2350 pb y 390 pb, aunque la clona pCBL-3 cl:9 no se descartó por esta razón, porque posiblemente en la secuencia de cedro rojo esté presente más de un sitio *Bam*HI. Recordando que se partió de la secuencia de olivo para realizar los análisis *in silico*, esta clona se envió a secuenciar.

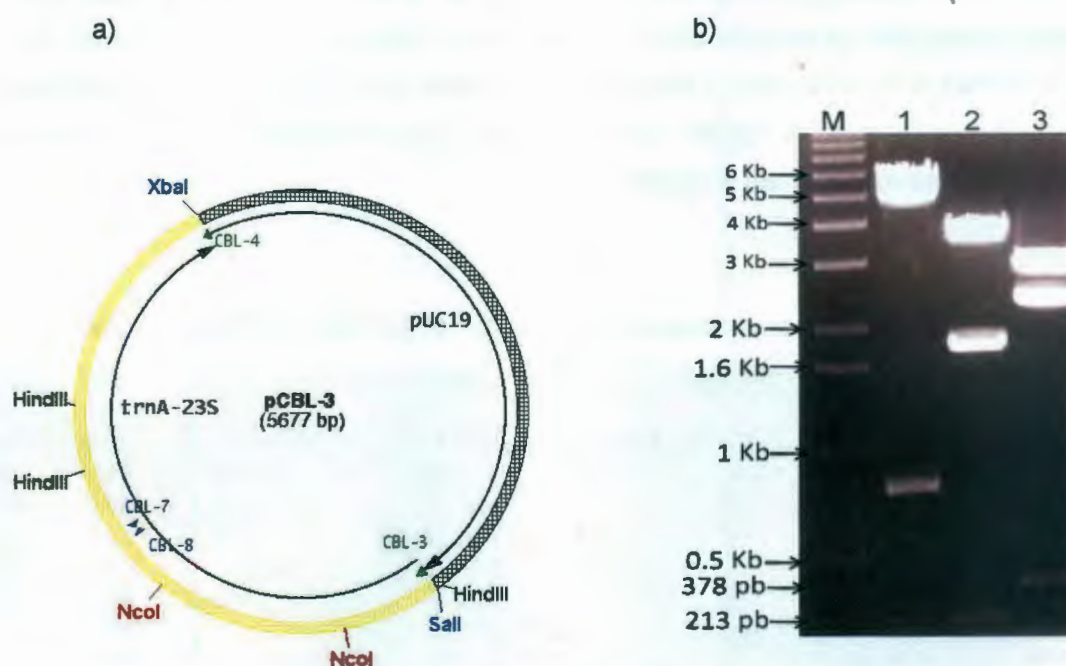


Figura 3.8 Análisis de restricción de pCBL-3. a) diagrama de pCBL-3 y b) análisis de restricción; carril 1, pCBL-3 mas *Nco*I; carril 2, pCBL-3 mas *Hind*III; carril 3, pCBL-3 mas *Bam*HI. M, corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogene).

3.5 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* DE CEDRO ROJO

Para secuenciar la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* de cedro rojo en principio se utilizaron los oligonucleótidos universal y reverso en conjunto con los oligonucleótidos internos CBL-5, 6, 7 y 8. Sin embargo, debido a que el tamaño de la secuencia es muy larga, estas primeras reacciones de secuenciación nos permitieron tener lecturas de fragmentos de ~ 800 pb, dichas secuencias fueron utilizadas para diseñar nuevos oligonucleótidos que nos permitieran secuenciar la región completa. Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación se muestran en el cuadro 3.3.

Cuadro 3.3 Oligonucleótidos para secuenciar la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* de *C. odorata* L.

Reacción	Oligo.	Sentido	Secuencia	Tm °C*	Tamaño pb
M1Uni	Universal	Fw	5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3'	70.4	24
M1Rev	Reverso	Rev	5' AGCGGATAACAATTTACACAGGA 3'	61.8	24
M1P5	CBL-5	Rev	5' CCAGCTCCCATAGTGTGAC 3'	59.5	19
M1P6	CBL-6	Fw	5' ATCGCTAGTAATCGCCGGTC 3'	60.5	20
M3Uni	Universal	Fw	5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3'	70.4	24
M3Rev	Reverso	Rev	5' AGCGGATAACAATTTACACAGGA 3'	61.8	24
M3P7	CBL-7	Rev	5' GGTCTTGCTGATTCACAC 3'	57.3	19
M3P8	CBL-8	Fw	5' CTCTGACCCGAGTAGCATG 3'	59.5	19
M1P27	CBL-27	Rev	5' TTCCCTCTGCCCTACCG 3'	60.7	18
M1P28	CBL-28	Fw	5' ACCCTCGTGCTTAGTTGCCA 3'	60.5	20
M1P29	CBL-29	Fw	5' GAGCACAGGTTTAGGTTCCG 3'	60.5	20
M3P30	CBL-30	Rev	5' TTCCAATTATTGAGCAGGGT 3'	56.4	20
M3P31	CBL-31	Fw	5' GGATGTCAGCGGTTTCGAGT 3'	59.5	19
M3P32	CBL-32	Rev	5' CATTTACCCCTAACCACAA 3'	56.4	20
M3P33	CBL-33	FW	5' GAGGGACGGAGGAGGCTA 3'	60.7	18

* Tm calculada mediante el algoritmo de "Nearest Neighbor" (Breslauer *et al.*, 1986)

3.6 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN *rrn16S-trnI* DE CEDRO ROJO EN pCBL-1

La secuenciación de pCBL-1 se realizó como se describe en la sección 2.11 de materiales y métodos, los oligonucleótidos utilizados para secuenciar en sentido fueron: reverso, CBL-28, CBL-6, CBL-29; y antisentido: universal, CBL-5 y CBL-27. Los oligonucleótidos se encuentran distribuidos a lo largo de la secuencia *rrn16S-trnI* como se muestra en la figura 3.9.

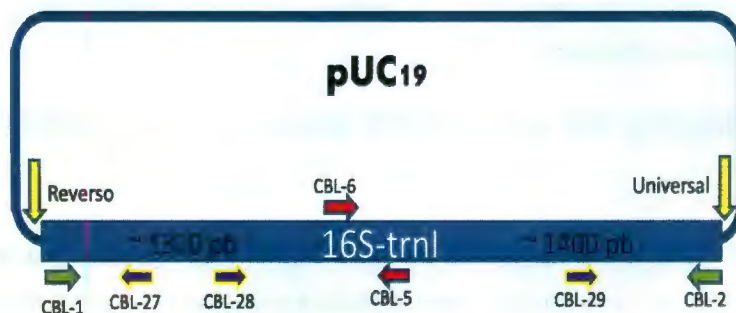


Figura 3.9 Estrategia utilizada para secuenciar la región *rrn16S-trnI* (pCBL-1). Forma en que se utilizaron los oligonucleótidos para amplificar el *rrn16S-trnI* de cedro rojo.

Como resultado de la secuenciación se obtuvieron fragmentos de secuencias que oscilaban entre ~ 800 pb y 950 pb. Para ensamblar la secuencia completa se realizaron alineamientos entre las regiones secuenciadas en sentido y antisentido, para ello se utilizó el software Sequencher® versión 4.1.4 (Gene Codes, USA). En la figura 3.10 se muestra el alineamiento, en el cual se observa un tamaño de secuencia total de ~2858 pb, sin embargo, posteriormente se eliminaron partes del vector pUC19 y sitios de restricción que se habían adicionado. Después de depurar las secuencias se obtuvo que la región *rrn16S-trnI* en cedro rojo es de ~ 2706 pb (anexo 1) aproximándose al tamaño de la secuencia de olivo, que fue la especie que dio el porcentaje de identidad más alto (99%) con respecto a la secuencia de roble.

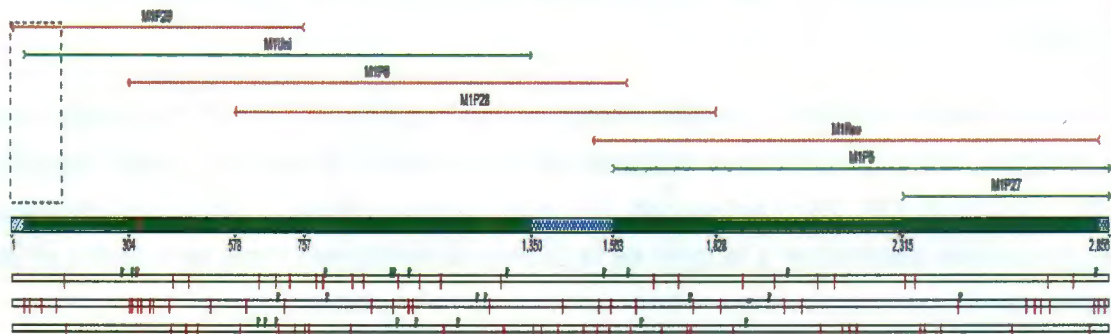


Figura 3.10 Alineamiento de las secuencias obtenidas en sentido y antisentido para ensamblar la región completa *rrn16S-trnI* de cedro rojo. Las flechas verdes representan secuencias obtenidas en sentido y las rojas en antisentido.

3.7 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN *trnA-rrn23S* DE CEDRO ROJO EN pCBL-3

La secuenciación de pCBL-3 se realizó de igual manera que pCBL-1, la posición de los oligonucleótidos utilizados en sentido y antisentido se muestran en la figura 3.11.

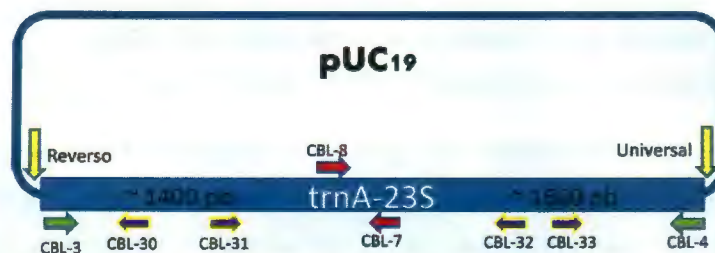


Figura 3.11 Estrategia para secuenciar la región *trnA-rrn23S* clonada en pCBL-3. Se utilizaron los oligonucleótidos para secuenciar en sentido: reverso, CBL-31, CBL-8, CBL-33; antisentido: universal, CBL-32, CBL-7, CBL-30 para amplificar la región *trnA-rrn23S* de cedro rojo.

Para ensamblar las lecturas obtenidas se realizó un alineamiento entre las secuencias obtenidas en sentido y antisentido (figura 3.12), para realizar esto se utilizó el software mencionado en la sección anterior. Como resultado del ensamblado de las secuencias y posteriormente de haberlas depurado se obtuvo que el tamaño de la región *trnA-rrn23S* en cedro rojo es de ~ 3026 pb (anexo 2) corroborando que este tamaño también concuerda con el de la secuencia de olivo, lo cual corrobora que cedro es más parecido a

olivo que a tabaco, esto considerado solo el tamaño de las secuencias.

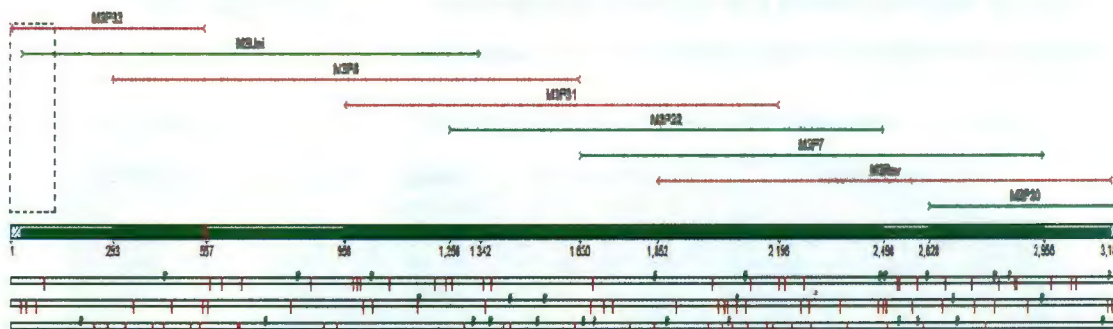


Figura 3.12 Alineamiento de las secuencias correspondientes a la región *trnA-rn23S* de cedro rojo. Las flechas verdes representan secuencias obtenidas en sentido y las rojas en antisentido.

3.8 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA *rrn16S-trnI-trnA-rn23S* DE CEDRO ROJO

Para tener la secuencia completa correspondiente a la región *rrn16S-trnI-trnA-rn23S* del cloroplasto de cedro rojo, se ensamblaron las secuencias obtenidas de la secuenciación de pCBL-1 y pCBL-3. El resultado obtenido fue que la región *rrn16S-trnI-trnA-rn23S* de cedro rojo es de un tamaño de ~ 5732 pb (sin considerar la región intergenica). Posteriormente esta secuencia se comparó contra las que se encuentran en la base de datos del GeneBank para poder identificar posibles genes ortólogos, para ello se realizó un análisis tipo BLAST de nucleótidos, utilizando megablast con las funciones predeterminadas (default) disponible en la página del NCBI (Zhang *et al.*, 2000), con el cual se obtuvo que el mayor puntaje (score) correspondió a *Mangifera indica* con un porcentaje de cobertura de 100% y una identidad del 99 % (cuadro 3.4), también hubo una alta identidad con *Theobroma cacao* y *Citrus sinensis* (del 99%) aunque el porcentaje de cobertura fue de 99%.

Con la secuencia obtenida de cedro rojo también se corroboró que efectivamente existen dos sitios de restricción *BamHI* en las posiciones 2999 y 3389, que no están presentes en la secuencia de olivo, con esto se validó el patrón de restricción obtenido en la figura 3.8 b carril 3.

Otra observación es que la secuencia *rrn16S-trnI-trnA-rn23S* (~ 5732) de cedro fue ~300 pb mayor que la secuencia de tabaco (~ 5400 pb) que se tomó como referencia para

diseñar los oligonucleótidos que utilizó Rodríguez-López en el 2010 y que sirvieron en un principio para obtener el amplicón de 5.7 Kb de cedro rojo.

Cuadro 3.4 Resultado del BLAST de la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* de cedro rojo

Especie	Número de Accesión	Score Máximo	Cobertura	Identidad
<i>Mangifera indica</i>	EF205595.2	5446	100%	99%
<i>Rhodoleia championi</i>	EF207455.1	5330	100%	98%
<i>Hamamelis japonica</i>	EF207445.1	5330	100%	98%
<i>Liquidambar styraciflua</i>	EF207449.1	5284	100%	98%
<i>Daphniphyllum sp.</i>	EF207444.1	5284	100%	98%
<i>Pterostemon rotundifolius</i>	EF207454.1	5280	97%	99%
<i>Ribes americanum</i>	EF207456.1	5262	96%	98%
<i>Heuchera micrantha</i>	EF207446.1	5256	100%	98%
<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	EF207443.1	5245	98%	98%
<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	EF207448.1	5186	100%	97%
<i>Ceratophyllum demersum</i>	AM712908.1	4946	100%	96%
<i>Citrus sinensis</i>	DQ864733.1	4900	99%	99%
<i>Theobroma cacao</i>	HQ244500.2	4687	99%	99%

3.8.1 ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* DE CEDRO ROJO CON TABACO, OLIVO Y ROBLE

Con base en la observación realizada al final de la sección anterior, para poder determinar a qué se debía la diferencia de tamaños entre las secuencias correspondientes al *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* de cedro y tabaco, se realizó un alineamiento entre estas secuencias, adicionando también las secuencias de olivo y roble, las cuales sirvieron de base para desarrollar la estrategia de este trabajo. Para lo anterior se utilizó la herramienta ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Como resultado se encontró que la diferencia en el tamaño entre las secuencias, se debió a indels (inserciones o deleciones) que presenta la secuencia de tabaco con respecto a la de cedro. En la figura 3.13 se muestra esquemáticamente el alineamiento donde se observa que entre los nucleótidos 2179-2418 y 3401-3504 de tabaco existen indels de 239 pb y 103 pb respectivamente (existiendo otras de menor tamaño). Además hay un indel de 37 pb entre los nucleótidos 3351-3388 en la secuencia de *C. odorata* L. la región intergénica se ubica entre los nucleótidos 2727-2790, estos 63 pb no se encuentran en el vector pCBL-5, ya que en esa región se encuentra insertado el casete de expresión.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
O. europaea	TATCGCTAGAACCTGCCCTTGGAGGGGACACAGCTGGAAACGGCTGCTATATCCCGTAGGCTGAGGAGCAAAAGGAGGATCCGCCGAGGAGGGGCTGCCTCTGATTAGCTAGTGGTGAAG													
C. odorata	AGAACCTGCCCTTGGAGGGGACACAGCTGGAAACGGCTGCTATATCCCGTAGGCTGAGGAGCAAAAGGAGGATCCGCCGAGGAGGGGCTGCCTCTGATTAGCTAGTGGTGAAG													
M. tabacum	AGAACCTGCCCTTGGAGGGGACACAGCTGGAAACGGCTGCTATATCCCGTAGGCTGAGGAGCAAAAGGAGGATCCGCCGAGGAGGGGCTGCCTCTGATTAGCTAGTGGTGAAG													
T. rosea	AGAACCTGCCCTTGGAGGGGACACAGCTGGAAACGGCTGCTATATCCCGTAGGCTGAGGAGCAAAAGGAGGATCCGCCGAGGAGGGGCTGCCTCTGATTAGCTAGTGGTGAAG													
Consensus	agaacctgcccttggagggggaacaacagctggaacagctgctaat.accccgtaggctgaggagcaaaaggaggaaatccgccgaggaggggct.gcgtctgattagctagtgtgtgagg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
O. europaea	CATTAGCTTACCAAGGCATGATCAGTAGCTGGTCCGAGAGGATGATCAGCCACTGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGAGGACAGAGTGGGGATTTTCCGCAATGGCGAAGGCTGAC													
C. odorata	CATTAGCTTACCAAGGCATGATCAGTAGCTGGTCCGAGAGGATGATCAGCCACTGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGAGGACAGAGTGGGGATTTTCCGCAATGGCGAAGGCTGAC													
M. tabacum	CATTAGCTTACCAAGGCATGATCAGTAGCTGGTCCGAGAGGATGATCAGCCACTGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGAGGACAGAGTGGGGATTTTCCGCAATGGCGAAGGCTGAC													
T. rosea	CATTAGCTTACCAAGGCATGATCAGTAGCTGGTCCGAGAGGATGATCAGCCACTGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGAGGACAGAGTGGGGATTTTCCGCAATGGCGAAGGCTGAC													
Consensus	caatagcttaccaggc.atgatcagtagctggctcagagagatgatcagccactgggactgagacacggccagactcctacggaggagcagctgggaaatttccgcaatggcgaaagcctgac													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
O. europaea	GGAGCATGCCGCTGGAGGTAGAGGGCCACGGGCTGTAACCTTTTCCCGAGAGAGAGCAATGACGGTATCTGGGGATAGCATCGGCTAATCTGTGACAGACACCGGATAGAGAGAGGAT													
C. odorata	GGAGCATGCCGCTGGAGGTAGAGGGCCACGGGCTGTAACCTTTTCCCGAGAGAGAGCAATGACGGTATCTGGGGATAGCATCGGCTAATCTGTGACAGACACCGGATAGAGAGAGGAT													
M. tabacum	GGAGCATGCCGCTGGAGGTAGAGGGCCACGGGCTGTAACCTTTTCCCGAGAGAGAGCAATGACGGTATCTGGGGATAGCATCGGCTAATCTGTGACAGACACCGGATAGAGAGAGGAT													
T. rosea	GGAGCATGCCGCTGGAGGTAGAGGGCCACGGGCTGTAACCTTTTCCCGAGAGAGAGCAATGACGGTATCTGGGGATAGCATCGGCTAATCTGTGACAGACACCGGATAGAGAGAGGAT													
Consensus	ggagcaatgccgctggaggtagaaggccacgggctgtaactcttltcccgagagagcaatgacgctatctgggaaatagcagcagctgaactctgtgcagcagccgctga.acaggagat													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
O. europaea	GCAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCTAAGAGCTGTAGTGGTGGCTTTTAAAGTCCCGCTCAATCCAGGGCTCAACCTGGACAGGCGGTGGAACTACCAAGCTGGAGTACGGTGGGGAGAGAG													
C. odorata	GCAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCTAAGAGCTGTAGTGGTGGCTTTTAAAGTCCCGCTCAATCCAGGGCTCAACCTGGACAGGCGGTGGAACTACCAAGCTGGAGTACGGTGGGGAGAGAG													
M. tabacum	GCAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCTAAGAGCTGTAGTGGTGGCTTTTAAAGTCCCGCTCAATCCAGGGCTCAACCTGGACAGGCGGTGGAACTACCAAGCTGGAGTACGGTGGGGAGAGAG													
T. rosea	GCAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCTAAGAGCTGTAGTGGTGGCTTTTAAAGTCCCGCTCAATCCAGGGCTCAACCTGGACAGGCGGTGGAACTACCAAGCTGGAGTACGGTGGGGAGAGAG													
Consensus	gcaagcgttaccgaatgattgggctaaagcgtctgtagtggtctttaaagctccgcgtcaaatccagggtcaacctggacagcgtggaactaccaagctggagtagcgtggggcagagg													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
O. europaea	GAATTTCCGGTGGAGCGGTGAATGCTAGAGATCCGAAAGACACACAGCGCGAAGACCTTCTGGGCGACACTGACACTGAGAGACAGAACTAGGAGAGCAATGGGATTTAGATACCCAGTGA													
C. odorata	GAATTTCCGGTGGAGCGGTGAATGCTAGAGATCCGAAAGACACACAGCGCGAAGACCTTCTGGGCGACACTGACACTGAGAGACAGAACTAGGAGAGCAATGGGATTTAGATACCCAGTGA													
M. tabacum	GAATTTCCGGTGGAGCGGTGAATGCTAGAGATCCGAAAGACACACAGCGCGAAGACCTTCTGGGCGACACTGACACTGAGAGACAGAACTAGGAGAGCAATGGGATTTAGATACCCAGTGA													
T. rosea	GAATTTCCGGTGGAGCGGTGAATGCTAGAGATCCGAAAGACACACAGCGCGAAGACCTTCTGGGCGACACTGACACTGAGAGACAGAACTAGGAGAGCAATGGGATTTAGATACCCAGTGA													
Consensus	gaatttccggtggagcgtgaatgctagagatcggaagacacacggcggaagacactctgctggcgacactgacactgagagacgaagctaggggcgagactgggttagataccagtag													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
O. europaea	TCTAGCGTTAAGCGATGATAGGCTAGGCGCTGTGCTATCAGCCGTGAGTGTCTGATAGCGCTTAAATATCCCGCTGGGGATAGCTTCGAGAGATGAATCTCAGAGATTTAGCGGGGCC													
C. odorata	TCTAGCGTTAAGCGATGATAGGCTAGGCGCTGTGCTATCAGCCGTGAGTGTCTGATAGCGCTTAAATATCCCGCTGGGGATAGCTTCGAGAGATGAATCTCAGAGATTTAGCGGGGCC													
M. tabacum	TCTAGCGTTAAGCGATGATAGGCTAGGCGCTGTGCTATCAGCCGTGAGTGTCTGATAGCGCTTAAATATCCCGCTGGGGATAGCTTCGAGAGATGAATCTCAGAGATTTAGCGGGGCC													
T. rosea	TCTAGCGTTAAGCGATGATAGGCTAGGCGCTGTGCTATCAGCCGTGAGTGTCTGATAGCGCTTAAATATCCCGCTGGGGATAGCTTCGAGAGATGAATCTCAGAGATTTAGCGGGGCC													
Consensus	tcttagcgttaaacgatggtactagcgctgtcgctatcgaccctgcagctgctgctgctaacgcttaagtatcccgctggggagtagcttgcgaagaaatgaactcaaggaaatgacggggccc													
	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
O. europaea	GCACAGCGGTGGAGCTGTGGTTTATTCGATGCAAGCGAAGACCTTACCGGGCTGACACTGCCGCAATCTCTTGAAGAGAGGGGTGCTTCGGAGACCGGACACAGGTGGTGCATGGCTGT													
C. odorata	GCACAGCGGTGGAGCTGTGGTTTATTCGATGCAAGCGAAGACCTTACCGGGCTGACACTGCCGCAATCTCTTGAAGAGAGGGGTGCTTCGGAGACCGGACACAGGTGGTGCATGGCTGT													
M. tabacum	GCACAGCGGTGGAGCTGTGGTTTATTCGATGCAAGCGAAGACCTTACCGGGCTGACACTGCCGCAATCTCTTGAAGAGAGGGGTGCTTCGGAGACCGGACACAGGTGGTGCATGGCTGT													
T. rosea	GCACAGCGGTGGAGCTGTGGTTTATTCGATGCAAGCGAAGACCTTACCGGGCTGACACTGCCGCAATCTCTTGAAGAGAGGGGTGCTTCGGAGACCGGACACAGGTGGTGCATGGCTGT													
Consensus	gcacaagcgtggagcgtggtttaaactgactgaagcggaagaaacttaccagggttgacactgccggaactcctcttgaagagggggtgcttcgggaacggacacaggtgctgcatggctgt													
	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
O. europaea	CCTAGCTCGTCCGTAGGCTGTGGTTTATTCGATGCAAGCGAAGACCTTACCGGGCTGACACTGCCGCAATCTCTTGAAGAGAGGGGTGCTTCGGAGACCGGACACAGGTGGTGCATGGCTGT													
C. odorata	CCTAGCTCGTCCGTAGGCTGTGGTTTATTCGATGCAAGCGAAGACCTTACCGGGCTGACACTGCCGCAATCTCTTGAAGAGAGGGGTGCTTCGGAGACCGGACACAGGTGGTGCATGGCTGT													
M. tabacum	CCTAGCTCGTCCGTAGGCTGTGGTTTATTCGATGCAAGCGAAGACCTTACCGGGCTGACACTGCCGCAATCTCTTGAAGAGAGGGGTGCTTCGGAGACCGGACACAGGTGGTGCATGGCTGT													
T. rosea	CCTAGCTCGTCCGTAGGCTGTGGTTTATTCGATGCAAGCGAAGACCTTACCGGGCTGACACTGCCGCAATCTCTTGAAGAGAGGGGTGCTTCGGAGACCGGACACAGGTGGTGCATGGCTGT													
Consensus	cgtcagctcgtgcgttaaggtgttggttaagctcccgcaagcgacacacctgctg.ttagtgcca.cttgagtttgaacctga.cagactgccgctgataagcggaggagaggtgagagtagc													
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
O. europaea	TCATGTCATCATGCCCTTATGCCCTGGGCGACACAGCTGCTACATATGGCGGAGCAAGGGTGCAGCTCCCGAGGGTGAGCTACCCCAAAACCCGCTCCTAGTTCGATTCAGAGCTGACACTCG													
C. odorata	TCATGTCATCATGCCCTTATGCCCTGGGCGACACAGCTGCTACATATGGCGGAGCAAGGGTGCAGCTCCCGAGGGTGAGCTACCCCAAAACCCGCTCCTAGTTCGATTCAGAGCTGACACTCG													
M. tabacum	TCATGTCATCATGCCCTTATGCCCTGGGCGACACAGCTGCTACATATGGCGGAGCAAGGGTGCAGCTCCCGAGGGTGAGCTACCCCAAAACCCGCTCCTAGTTCGATTCAGAGCTGACACTCG													
T. rosea	TCATGTCATCATGCCCTTATGCCCTGGGCGACACAGCTGCTACATATGGCGGAGCAAGGGTGCAGCTCCCGAGGGTGAGCTACCCCAAAACCCGCTCCTAGTTCGATTCAGAGCTGACACTCG													
Consensus	tcaagtcacatgcccttatagccctggcgacacagctgctacactggcgaggacaaagggtgcgactccgcagggtgagctaac.ccaaaaaccgctcctcagtcggatgacaggtgcaactcg													
	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
O. europaea	CCTGATGAGCCGGAATGCTAGTATCCCGGTAGGCTACGGCGGTGAATCGTCCCGGGCTTGTACACACCGGCTACACTATGGAGCTGGCCATGGCCGAGTGGTACCTTACCCGCA													
C. odorata	CCTGATGAGCCGGAATGCTAGTATCCCGGTAGGCTACGGCGGTGAATCGTCCCGGGCTTGTACACACCGGCTACACTATGGAGCTGGCCATGGCCGAGTGGTACCTTACCCGCA													
M. tabacum	CCTGATGAGCCGGAATGCTAGTATCCCGGTAGGCTACGGCGGTGAATCGTCCCGGGCTTGTACACACCGGCTACACTATGGAGCTGGCCATGGCCGAGTGGTACCTTACCCGCA													
T. rosea	CCTGATGAGCCGGAATGCTAGTATCCCGGTAGGCTACGGCGGTGAATCGTCCCGGGCTTGTACACACCGGCTACACTATGGAGCTGGCCATGGCCGAGTGGTACCTTACCCGCA													
Consensus	cctgcatgaagcgggaatgctagtaacgcggctcagccactacggcggtgaattcgttccgggctctgtacacacggccgctcaactatgggagctggcaatgcccgaagctgcttaactaaacgca													
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
O. europaea	AGAGGGGGGATGCCAGGCGAGGCTAGTACTGAGTGAAGTCTGATACAGGTAGGCTACTGAGAGGTGCGGCTGGATACCTCCTTTTCAGGAGAGCTTATGCTTATGGATTTTGGTTTGA													
C. odorata	AGAGGGGGGATGCCAGGCGAGGCTAGTACTGAGTGAAGTCTGATACAGGTAGGCTACTGAGAGGTGCGGCTGGATACCTCCTTTTCAGGAGAGCTTATGCTTATGGATTTTGGTTTGA													
M. tabacum	AGAGGGGGGATGCCAGGCGAGGCTAGTACTGAGTGAAGTCTGATACAGGTAGGCTACTGAGAGGTGCGGCTGGATACCTCCTTTTCAGGAGAGCTTATGCTTATGGATTTTGGTTTGA													
T. rosea	AGAGGGGGGATGCCAGGCGAGGCTAGTACTGAGTGAAGTCTGATACAGGTAGGCTACTGAGAGGTGCGGCTGGATACCTCCTTTTCAGGAGAGCTTATGCTTATGGATTTTGGTTTGA													
Consensus	aggaggggg.lggcgaaggcagggtgtagtactggagtagagctgtaacagctagccactgtagaggtgaggtgagctgaactccttltcaggagagc.aatgcttgggtatlttggttggca													
	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
O. europaea	CCTGCTTCACACCCCAAAACAAAGAGAGGAGCTACGCTGTGGTTATACCTGGAGATGAGGATCTCTTCTTGCTTTTCGACGCTGTGAGTAGAGACAGCTCATGAGCTTATTTACTAGTTCGAGACAGT													
C. odorata	CCTGCTTCACACCCCAAAACAAAGAGAGGAGCTACGCTGTGGTTATACCTGGAGATGAGGATCTCTTCTTGCTTTTCGACGCTGTGAGTAGAGACAGCTCATGAGCTTATTTACTAGTTCGAGACAGT													
M. tabacum	CCTGCTTCACACCCCAAAACAAAGAGAGGAGCTACGCTGTGGTTATACCTGGAGATGAGGATCTCTTCTTGCTTTTCGACGCTGTGAGTAGAGACAGCTCATGAGCTTATTTACTAGTTCGAGACAGT													
T. rosea	CCTGCTTCACACCCCAAAACAAAGAGAGGAGCTACGCTGTGGTTATACCTGGAGATGAGGATCTCTTCTTGCTTTTCGACGCTGTGAGTAGAGACAGCTCATGAGCTTATTTACTAGTTCGAGACAGT													
Consensus	c.gcttcacaccc.aa.....agaag.gagctacg.ctgagt.aaacttggagatggaagcttcttct.tttctcgagc.tgaagtagaagcagc.calgagcttattctaatggtcggaacagct													
	1561	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690
O. europaea	TGATAGGATCCCCCTTTTATGCTCCCAATGTCCTCCCGGTGTCGACATGGGGGCAAAAGAGAGAGAGAGGAGTGGGTTTCTCTGCTTTTGGCATAGCGGGCCCCAGGTGGGAGGCTCGACAGA													
C. odorata	TGATAGGATCCCCCTTTTATGCTCCCAATGTCCTCCCGGTGTCGACATGGGGGCAAAAGAGAGAGAGAGGAGTGGGTTTCTCTGCTTTTGGCATAGTGGGCCCCAGGTGGGAGGCTCGACAGA													
M. tabacum	TGATAGGATCCCCCTTTTATGCTCCCAATGTCCTCCCGGTGTCGACATGGGGGCAAAAGAGAGAGAGAGGAGTGGGTTTCTCTGCTTTTGGCATAGTGGGCCCCAGGTGGGAGGCTCGACAGA													
T. rosea	TGATAGGATCCCCCTTTTATGCTCCCAATGTCCTCCCGGTGTCGACATGGGGGCAAAAGAGAGAGAGAGGAGTGGGTTTCTCTGCTTTTGGCATAGTGGGCCCCAGGTGGGAGGCTCGACAGA													
Consensus	tgatagga.cccc.tttt.atg.ccccatgct.at.cc.c.....gaaat.ggaaggggc.aaaaagaaagagagagatgggtttctctgctgttttggcatag.aggccccag.gagagcc.cgcacga													

1691 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820

O. europaea
C. odorata
N. tabacum
T. rosea
Consensus

1821 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950

O. europaea
C. odorata
N. tabacum
T. rosea
Consensus

1951 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080

O. europaea
C. odorata
N. tabacum
T. rosea
Consensus

2081 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200 2210

O. europaea
C. odorata
N. tabacum
T. rosea
Consensus

2211 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320 2330 2340

O. europaea
C. odorata
N. tabacum
T. rosea
Consensus

2341 2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470

O. europaea
C. odorata
N. tabacum
T. rosea
Consensus

2471 2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600

O. europaea
C. odorata
N. tabacum
T. rosea
Consensus

2601 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730

O. europaea
C. odorata
N. tabacum
T. rosea
Consensus

2731 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860

O. europaea
C. odorata
N. tabacum
T. rosea
Consensus

2861 2870 2880 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990

O. europaea
C. odorata
N. tabacum
T. rosea
Consensus

2991 3000 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120

O. europaea
C. odorata
N. tabacum
T. rosea
Consensus

3121 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240 3250

O. europaea
C. odorata
N. tabacum
T. rosea
Consensus

3251 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380

O. europaea
C. odorata
N. tabacum
T. rosea
Consensus

Figure 1. Multiple sequence alignment of the 5' region of the *hsp70* gene from *D. europaea*, *C. odorata*, and *N. tabacum*. The alignment is shown in blocks of 100 nucleotides, with the position of the start codon (ATG) indicated by a vertical line. The consensus sequence is shown at the bottom of each block. The alignment is based on the following accession numbers: *D. europaea* (U00001.1), *C. odorata* (U00001.1), and *N. tabacum* (U00001.1).

CAPÍTULO II

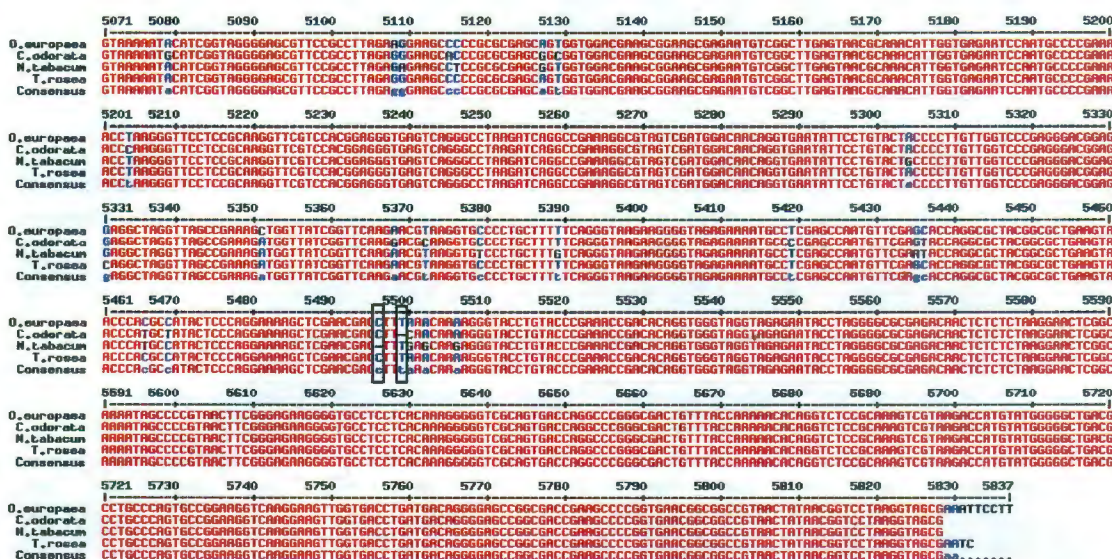


Figura 3.13 Alineamiento múltiple de las secuencias *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* de cedro rojo con tabaco, olivo y roble. La secuencia *rrn16S-trnI* se encuentra del nucleótido 10-2726, la región intergenica *trnI-trnA* del 2727-2790 y *trnA-rrn23S* del 2791-5828. Los símbolos (-) dentro de los rectángulos indican indels en algunas de las secuencias alineadas. Color azul: representa identidad entre tres secuencias y rojo: identidad entre las cuatro secuencias.

Como se muestra en la figura 3.13, a partir del nucleótido 4910 a 5832 la secuencia de ~ 923 pb correspondiente al *rrn23S* de roble alineó con las otras tres secuencias. A partir de este alineamiento se obtuvieron los porcentajes de identidad entre la secuencia de cedro y roble que fue de 98 %, y de de cedro con respecto a olivo y tabaco (cuadro 3.5). Entre cedro y tabaco existe 97 % de identidad, sin embargo, el porcentaje de cobertura es de 91 %. En contraste entre cedro y olivo también existe 97 % de identidad pero el porcentaje de cobertura es del 100 % esto se puede explicar porque existe un número mayor de nucleótidos idénticos entre cedro y porque existe un indel en la secuencia de tabaco.

Cuadro 3.5 Porcentajes de identidad y cobertura de la secuencia de cedro vs tabaco, olivo y roble

Secuencias alineadas	<i>rrn16S-trnI</i>		<i>trnA-rrn23S</i>	
	% de identidad	% de cobertura	% de identidad	% de cobertura
Cedro vs Tabaco	97 %	91 %	97 %	95 %
Cedro vs Olivo	97 %	100 %	97 %	100 %
Olivo vs Tabaco	99 %	91%	98 %	100 %

3.9 CLONACIÓN DE LA REGIÓN *trnA-rrn23S* EN pCBL-1 PARA OBTENER pCBL-4

Para obtener pCBL-4, se utilizó como vector pCBL-1, cuyo inserto ya había sido secuenciado, el cual fue digerido con las enzimas de restricción *XbaI* y *NotI*. El inserto se tomó de la clona 9 de pCBL-3 que al ser digerida con las enzimas antes mencionadas debía liberar una banda de ~ 3000 pb que corresponde a la secuencia *trnA-rrn23S* de cedro rojo (figura 3.14). Esta secuencia se clonó en pCBL-1 (clona 3) para obtener la región completa *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* del cloroplasto de cedro rojo, a este plásmido se le dio el nombre de pCBL-4.

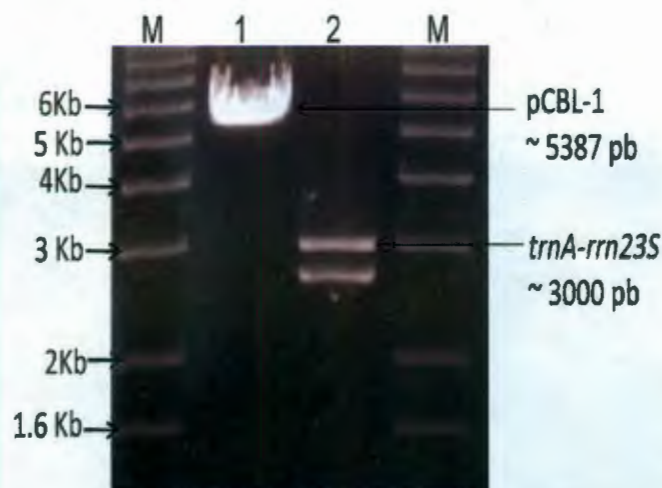


Figura 3.14 Doble digestión de pCBL-1 y pCBL-3 con *XbaI* y *NotI*. Carril 1, pCBL1 digerida con *XbaI* y *NotI*; carril 2, pCBL-3 digerida con *XbaI* y *NotI*. M, corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogene).

Después de digerir el vector y el inserto con *XbaI-NotI* (figura 3.14), se purificaron del gel, después al vector se le dio un tratamiento con fosfatasa alcalina (CIP) para evitar religación, y posteriormente se llevó a cabo la ligación en una relación inserto-vector 3:1 utilizando ligasa T4. De esta reacción se seleccionaron 15 clonas que fueron analizadas por ensayos de restricción y PCR.

El ensayo de restricción consistió en un principio en utilizar una enzima que linearizara las clonas, para ello se utilizó la enzima *XbaI*. De este primer ensayo de restricción se seleccionaron 10 clonas que al ser linearizadas daban el tamaño esperado, el cual era de

~ 8358 pb. Posteriormente se seleccionaron 2 clonas para un segundo análisis de restricción utilizando la enzima *NotI* (la cual solo debía linearizar la construcción ya que debía ser un sitio único) esperando obtener una banda de ~ 8358 pb. También se realizó una doble digestión con las enzimas *XbaI* y *NotI* que fueron utilizadas para la clonación, de la cual se esperaban obtener dos bandas de ~ 5367 pb y 2991 pb. Adicionalmente se utilizó la enzima *BamHI* con la cual se esperaba un patrón de restricción de 5 bandas (de ~ 4218 pb, 2300 pb, 1115 pb, 378 pb y 398 pb). Por último se utilizó la enzima *AatII* con la cual se esperaban obtener dos bandas (de ~ 5155 pb y 3203 pb), el resultado de estas digestiones se muestra en la figura 3.15.

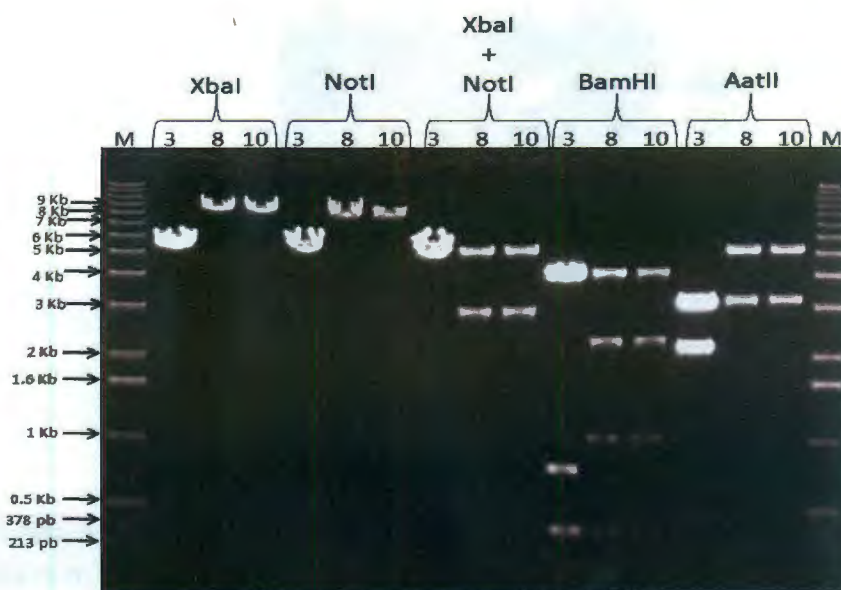
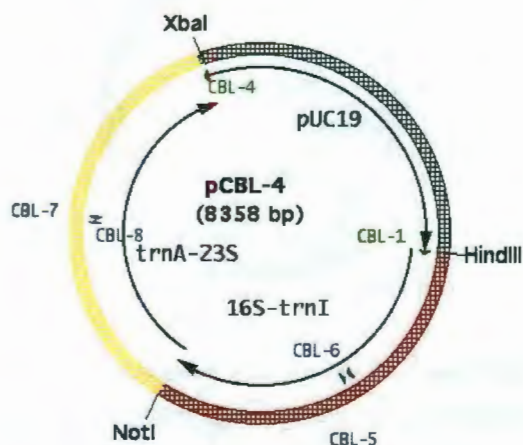


Figura 3.15 Ensayo de restricción de las clonas pCBL-4. Carriles 3, clona 3 de pCBL-1; carriles 8 y 10, posibles clonas pCBL-4. M, corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogene).

Como se observa en la figura 3.15 las dos posibles clonas seleccionadas 8 y 10 al ser analizadas por digestión mostraron el patrón de restricción esperado como un control se utilizó DNA de la clona 3 de pCBL-1. Para estar totalmente seguros de tener la región *rm16S-trnI-trnA-rm23S* se realizó una prueba de PCR utilizando los oligonucleótidos CBL-6/CBL-7 este par de oligonucleótidos debería producir un amplicón de ~3000 pb, la PCR podía solo funcionar únicamente si se tenía la región completa. Como se puede observar en la figura 3.16 b cuando se utilizó la clona 10 de pCBL-4 como templado para la PCR se obtuvo el amplicón del tamaño esperado. Con este resultado y después de haber

realizado el ensayo de restricción podemos concluir que se logró clonar la región completa de *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* de cedro rojo.

a)



b)



Figura 3.16 Análisis por PCR de pCBL-4. a) posición de los oligonucleótidos CBL-6/CBL-7 dentro de la construcción pCBL-4 y b) PCR utilizando los oligonucleótidos CBL-6/CBL-7, carril 1, Vector pUC19; carril 2, clona 3 de pCBL-1; carril 3, clona 9 de pCBL-3; carril 4, clona 10 de pCBL-4 y carril 5, control negativo. M corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen).

3.10 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL CASETE DE EXPRESIÓN

Se diseñó un casete de expresión monocistrónico que contiene dos genes, uno de ellos es el gen de selección *aadA* que se encuentra bajo el control del promotor del RNA ribosomal 16S (*Prrn16S*) junto con su secuencia 5' UTR, además del terminador del gen *psbA* junto con su secuencia 3' UTR. El otro gen es el de la proteína verde fluorescente *gfp* el cual se encuentra regulado por el promotor *G10* del fago *T7* y como terminador el gen *rps16*, ambos con su secuencia 5' UTR y 3' UTR respectivamente. En la figura 3.17 a se pueden observar de forma esquemática la estructura del casete y los sitios de restricción incluidos para poder escindir los genes *aadA* o *gfp*, en caso de ser necesario. También se muestra la posición de los sitios *NotI*, que se utilizaron para insertar el casete de expresión dentro del vector pCBL-4.

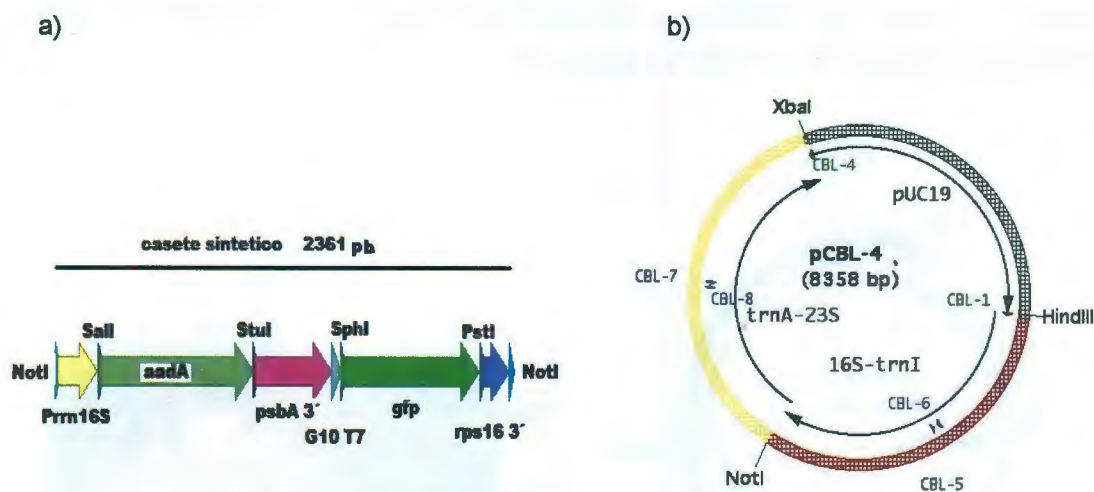


Figura 3.17 Casete de expresión. a) Componentes del casete, el casete está flanqueado por dos sitios *NotI* en los extremos 5' y 3', el gen *aadA* está flanqueado por los sitios *SalI* y *StuI*; el gen *gfp* por *SphI* y *PstI*, b) pCBL-4 muestra el sitio único *NotI* utilizado para clonar el casete de expresión.

El casete de expresión se diseñó a partir de secuencias ya reportadas en la base de datos del GeneBank, para ello se realizó una búsqueda minuciosa de los componentes que debía llevar. Todas estas secuencias ya habían sido utilizadas en otros vectores de transformación de plástidos (cuadro 3.6).

Cuadro 3.6 Secuencias, número de accesión y tamaño de las secuencias utilizadas para construir el casete de expresión.

Secuencia	Número de accesión	Tamaño en pb	Referencia
<i>Prrn16S</i> 5' UTR	EU520587	117	Ferran <i>et al.</i> , 2008
Gene <i>aadA</i>	AY895148	795	Dufourmantel <i>et al.</i> , 2005
<i>TpsbA</i> 3' UTR	AY895148	394	Dufourmantel <i>et al.</i> , 2005
<i>Pg10 T7</i> 5' UTR	EU450674	50	Oey <i>et al.</i> , 2009
Gene <i>gfp</i>	AB199889	756	Tomizawa <i>et al.</i> , 2005
<i>Trps16</i> 3'UTR	EU520589	149	Ferran <i>et al.</i> , 2008

Después de haber ensamblado los fragmentos *in silico* se obtuvo una secuencia de ~ 2361 pb, la cual se mandó a sintetizar a la empresa BIOMATIC quien envió la secuencia clonada en el vector pBMH (figura 3.18). Para corroborar que dicho vector contenía el casete expresión, se decidió analizarlo por restricción utilizando la enzima *SphI*, la cual linearizaría el vector y con *NotI*, la cual liberaría el casete de expresión.

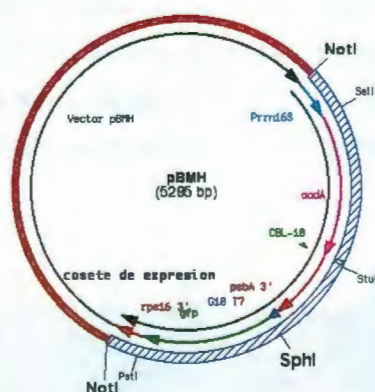


Figura 3.18 Mapa del vector pBMH. Las flechas representan el sentido de los marcos de lectura. Se indican los sitios de restricción y las partes que constituyen el casete de expresión.

Al digerir el vector pBMH con *SphI* el vector se linearizó (figura 3.19, carril 2) dando una banda de ~ 5295 pb correspondiente al tamaño esperado, al digerir con *NotI* se liberó un fragmento de un tamaño de ~2361 pb (figura 3.19, carril 3) que correspondía al casete de expresión, el cual fue purificado y posteriormente clonado en pCBL-4.

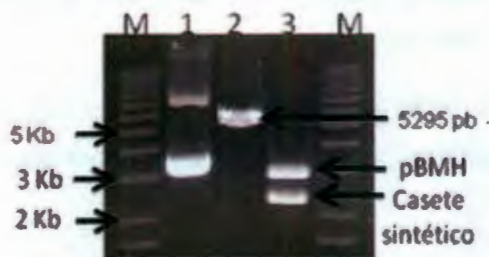


Figura 3.19 Análisis de restricción del casete de expresión. Carril 1) vector pBMH + casete de expresión sin digerir, Carril 2) vector pBMH digerido con *SphI*, Carril 3) pBMH digerido con *NotI*. M marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogene).

3.11 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR FINAL DE TRANSFORMACIÓN DE CLOROPLASTO DE CEDRO ROJO (pCBL-5)

Antes de iniciar la construcción del vector final de transformación de cloroplasto para cedro rojo (pCBL-5) se realizó un análisis de restricción de la clona pCBL-4, para lo cual se utilizaron las enzimas *Pst*I, *Sall*, *Stu*I y *Sph*I, esto se hizo para demostrar que estos sitios de restricción son únicos en el casete de expresión y no están presentes en pCBL-4 (figura 3.20, carriles 3, 4, 5 y 6). Como control se utilizó la clona pCBL-3 digerida con la enzima *Pst*I, este sitio de restricción debería estar presente en la clona 9 de pCBL-3 pero no en pCBL-4



Figura 3.20 Ensayo de restricción de pCBL-4 con enzimas presentes solo en el casete de expresión. Carril 1, pCBL-3 digerida con *Pst*I; carril 2, pCBL-4 sin digerir; Carril 3, pCBL-4 con *Pst*I; carril 4, pCBL-4 con *Sall*; carril 5, pCBL-4 con *Stu*I y carril 6, pCBL-4 digerida con *Sph*I. M marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogene).

Posteriormente se digirió pCBL-4 con *Not*I, este sitio fue introducido en la región intergénica de *trnI-trnA*, la digestión con *Not*I se utilizó para clonar el casete de expresión (figura 3.21).

Como resultado de la digestión de pCBL-4 se obtuvo una banda de ~ 8358 pb (figura 3.21 b, carril 1) esto se debe a que *Not*I es un sitio único, en el carril 2 se muestra la banda que corresponde al casete de expresión. Después se realizó la ligación entre el casete de expresión y el vector; como resultado se obtuvieron ~ 300 colonias de las cuales se seleccionaron 46 para realizar análisis de restricción.

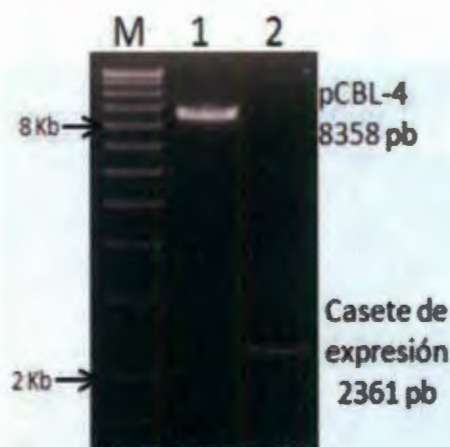


Figura 3.21 Construcción de pCBL-5. a) Forma esquemática de la construcción de la clona pCBL-5. b) carril 1, pCBL-4 cl: 10 digerida con *NotI* y carril 2, casete de expresión digerido con *NotI*. M marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogene).

Se extrajo DNA plasmídico de las 46 clonas seleccionadas, al ser observado en un gel de agarosa se seleccionaron 6 que migraban diferente al perfil electroforético de pCBL-4, estas clonas se sometieron a un análisis de restricción utilizando a la enzima *NotI*, ya que si al digerir estas clonas con esta enzima se liberaba un fragmento de ~2361 pb era porque se había logrado clonar el casete de expresión. Las 6 clonas seleccionadas liberaron una banda de ~ 2361 pb por lo cual se pudo concluir que todas contenían el casete de expresión (figura 3.22, carril 2-7). Era necesario determinar que el casete de expresión se hubiese insertado en el sentido correcto, por lo cual se realizó un análisis de restricción utilizando las enzimas *XbaI* y *PstI* las cuales son únicas en pCBL-5. Si el casete de expresión se había clonado en forma correcta se deberían liberar dos bandas (de ~7561 pb y 3140 pb), si el casete se había clonado en la dirección contraria entonces se liberarían dos bandas de ~5528 pb y 5173 pb. Cuatro de las 6 clonas pCBL-5 analizadas por digestión presentaban el patrón de restricción esperado de dos bandas de ~7561 pb y 3140 pb (figura 3.23, carriles 2, 3, 4, 6) con lo cual se concluyó que contenían el casete de expresión en el sentido correcto. Adicionalmente se realizó un PCR utilizando el par de oligonucleótidos CBL-9/CBL-10, los cuales debían de producir un fragmento de ~ 1048 pb. Como resultado de la PCR utilizando como templado DNA de las cuatro clonas seleccionadas, de pCBL-5 se obtuvo un amplicón de ~ 1048 pb (figura 3.24b, carril 1-4) con lo cual se demostró que el casete de expresión se encuentra en sentido correcto.

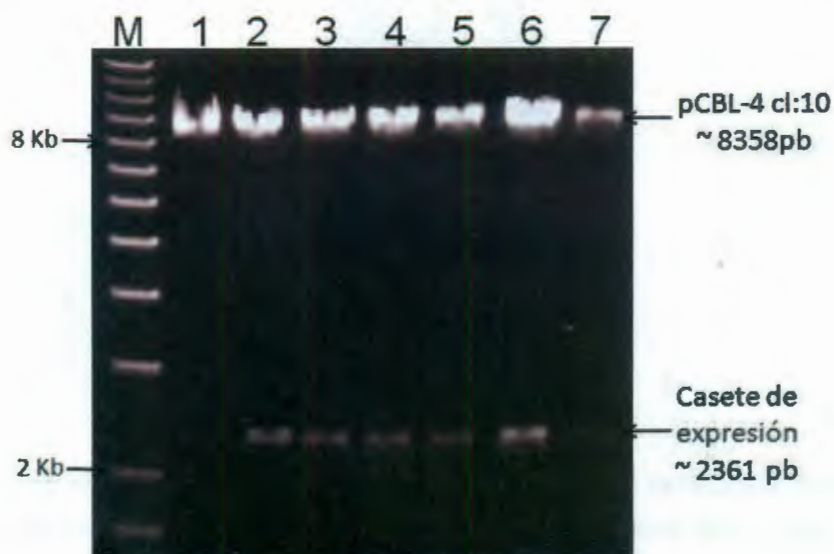
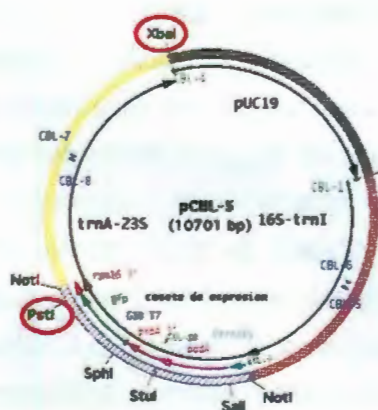


Figura 3.22 Análisis de restricción de las posibles clonas positivas de pCBL-5. Carril 1, clona 10 de pCBL-4 digerida con *NotI*; carriles 2-4) posible clona pCBL-5 digerida con *NotI*. M marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogene).

a)



b)

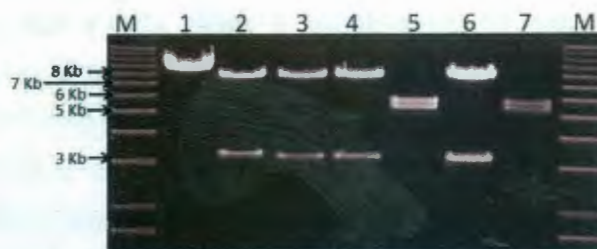


Figura 3.23 Análisis de restricción para verificar la inserción correcta del casete de expresión. a) posición de las enzimas *XbaI* y *PstI* en la construcción pCBL-5. b) carril 1 clona pCBL-4 cl: 10, carril 2-7 clonas pCBL-5. M, marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogene).

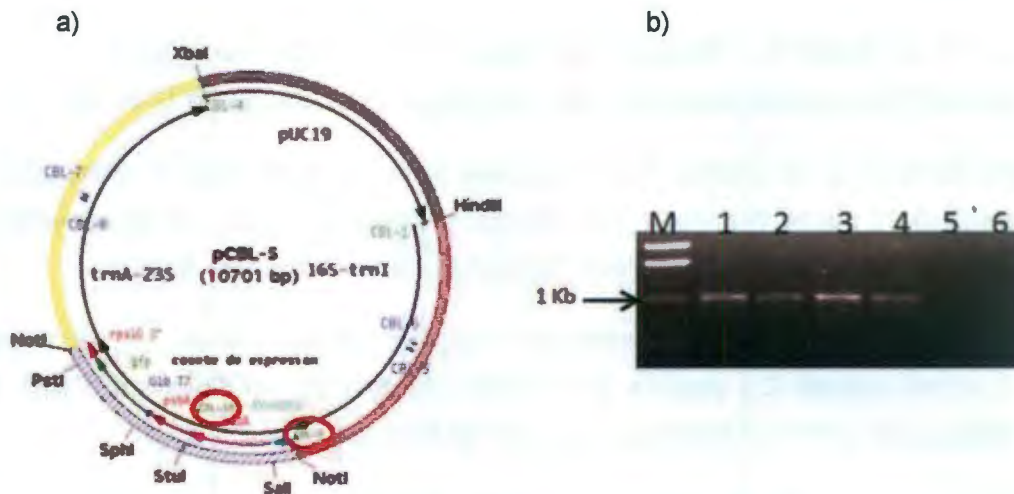


Figura 3.24 Análisis por PCR de la orientación del casete en las clonas pCBL-5 con los oligonucleótidos CBL-9/CBL-10. a) Posición de los oligonucleótidos CBL-9/CBL-10 (encerrados en el círculo rojo) en pCBL-5, b) PCR de las clonas pCBL5, Carril 1-4) clonas pCBL-5 con casete de expresión en sentido correcto, Carril 5) clona pCBL-5 con casete de expresión en sentido incorrecto, Carril 6) control negativo. M, marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogene).

Con base en estos resultados se concluye que se logró construir un vector de transformación plasmídica para cedro rojo, el cual tiene como secuencias flanqueantes de recombinación la región *16S-trnI* y *trnA-23S*. La estructura del vector se muestra esquemáticamente en la figura 3.24 a y en el anexo 3 se muestra la secuencia y las partes que lo constituyen.

BIBLIOGRAFÍA

- Breslauer K. J., Frank R., Blöcker H. and Marky L. A. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83; 3746-3750.
- Gregorio-Martínez A. C. (2010). Aproximaciones biotecnológicas para la manipulación genética de caoba (*Swietenia macrophylla*) y primavera (*Tabebuia donell-smithii*). Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. 65 p.
- Rodríguez-López T., (2010). Clonación de regiones cloroplastídicas de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) para la elaboración de vectores de clonación. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. México. 53 p.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22 (22):4673-80.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L. and Miller W. (2000). "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol*; 7(1-2):203-14.

CAPÍTULO IV DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo se diseñó y construyó un vector de transformación genética para el cloroplasto de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.). La transformación del cloroplasto ofrece grandes ventajas sobre la transformación convencional del núcleo, entre ellas podemos mencionar los altos niveles de proteínas solubles totales –de hasta 46 % – cuando el transgén es insertado establemente (De Cosa *et al.*, 2001), se pueden introducir múltiples genes en un solo evento de transformación (Quesada Vargas *et al.*, 2005), se logra la contención de los transgenes debido a la estricta heredabilidad materna de los cloroplastos (Daniell *et al.*, 2002), no se ha reportado silenciamiento génico (De Cosa *et al.*, 2001), no existe el problema de efecto de posición (Daniell *et al.*, 2005) y no hay efectos pleiotrópicos debido a la compartimentalización sub-celular de los productos de los transgenes (Daniell *et al.*, 2001). Todas estas ventajas hacen vislumbrar un futuro prometedor para realizar la transformación de los cloroplastos de cedro rojo ya que uno de los mayores obstáculos para poder liberar organismos transgénicos es el riesgo del escape del transgén, la construcción de un vector de este tipo evitaría este problema, aunado a que también se podría obtener alta estabilidad y altos niveles de expresión del transgén, lo que sería esencial para expresar genes de resistencia a insectos y proporcionar una solución al problema del insecto barrenador *Hypsipyla grandella*.

Hasta el año 2002 la transformación de cloroplastos en plantas superiores solo había sido reportada en tabaco (Svab y Maliga, 1993), *N. plumbaginifolia* (O'Neil *et al.*, 1993), *A. thaliana* (Sikdar *et al.*, 1998), papa (Sidorov *et al.*, 1999), arroz (Khan y Maliga, 1999) y tomate (Ruf *et al.*, 2001). El primer reporte de transformación de un árbol fue realizado por Okumura *et al.* (2006) quienes lograron transformar cloroplastos de álamo blanco (*Populus alba*), obteniendo tres líneas homoplásticas. Este reporte abre la posibilidad de experimentar en otras especies de árboles como es el caso del cedro rojo.

Para que la transformación de plástidos sea eficiente es necesario tener un sistema eficiente de regeneración del tejido que se desea transformar. Recientemente se han reportado dos protocolos eficientes de propagación por medio de organogénesis (Peña-Ramírez *et al.*, 2010) y embriogénesis somática de cedro rojo (Peña-Ramírez *et al.*, 2011), por lo cual la regeneración no sería un problema para realizar la transformación de plástidos en esta especie forestal; también se necesita contar con un vector de

transformación que contenga secuencias de recombinación homóloga —de la especie que se desea transformar— que flanqueen al casete de expresión, el cual debe contener los genes de interés así como sus secuencias reguladoras, esto es necesario porque la inserción de genes dentro del genoma de los cloroplastos se lleva a cabo por un mecanismo de recombinación homóloga sitio-específica, entre el vector y el cpDNA (Stub y Maliga, 1992; Zoubenco *et al.*, 1994). Se ha observado que la eficiencia de la recombinación depende del porcentaje de identidad y del tamaño de las secuencias a recombinar, una recombinación eficiente implica que se logrará una transformación eficiente de los cloroplastos (Zoubenco *et al.*, 1994).

Daniell *et al.* (1998) propusieron utilizar un vector universal para la transformación de plástidos, este contenía secuencias de recombinación de tabaco, el vector fue utilizado exitosamente solo en plástidos de papa y tomate (Sidorov *et al.*, 1999; Ruf *et al.*, 2001). Sin embargo, se observó que la eficiencia de transformación se veía disminuida considerablemente aun siendo especies de la misma familia y teniendo 98 % de identidad entre sus secuencias (Fernandez-San Millan *et al.*, 2003). Esta misma reducción de eficiencia de transformación fue observada cuando se utilizaron secuencias de petunia para flanquear el casete de expresión y transformar tabaco (De Gray *et al.*, 2001). Debido a lo antes planteado podemos argumentar que el concepto de vector universal no es del todo cierto ya que aunque se lograron transformar otras especies (papa y tomate) utilizando las secuencias de tabaco, la disminución en la eficiencia de transformación hace ver que no es conveniente utilizar la secuencia de una especie para transformar otra. Esto se ha confirmado recientemente ya que los plastomas que se han secuenciado dan evidencia de la gran variabilidad que existe entre los genomas de plástidos (Kanamoto *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Daniell *et al.*, 2006). Por lo cual, para obtener una alta eficiencia de transformación de cloroplastos se requiere generar vectores de transformación especie-específica (Daniell *et al.*, 2006). Por estas razones para realizar la transformación de los cloroplastos de cedro rojo era necesario generar un vector con secuencias de recombinación homóloga propias del cloroplasto, por lo que, en este trabajo se propuso generar un vector de transformación para cloroplastos de cedro rojo utilizando como secuencias de recombinación homóloga, las secuencias de la región de los genes *rrn16S-trnI* y *trnA-rrn23S*.

Algunas regiones del cloroplasto se han propuesto como sitios de recombinación homóloga adecuados para flanquear los casetes de expresión y así lograr la inserción de transgenes entre sus regiones intergénicas, dos de ellas son: *trnV-rps12/7* (Zoubenco *et al.*, 1994; McBride *et al.*, 1995), y *trnI-trnA* (De cosa *et al.*, 2001). La región intergénica de los genes *trnI-trnA* ha sido utilizada con éxito para expresar varias proteínas de interés, obteniendo altos valores de expresión (Molina *et al.*, 2004, Viitanen *et al.*, 2004, De cosa *et al.*, 2001). McNutt (2006) realizó una caracterización de esta región entre 34 especies de plantas superiores encontrando que las secuencias tienen una identidad mayor al 95 %.

A diferencia de las secuencias *rbcL-accD* que se encuentran localizadas en la región grande de una sola copia (LSC), la cual fue utilizada por Okumura *et al.* (2006). En el presente trabajo se utilizaron como secuencias de recombinación homóloga las regiones *rrn16S-trnI* y *trnA-rrn23S* para flanquear el casete de expresión, ya que esta región se encuentra en los invertidos repetidos (IR) del cloroplasto y permite obtener hasta 20,000 copias del transgén por célula, lo cual se vería reflejado en una alta expresión de los transgenes, además de que esta secuencia facilitaría la replicación del vector dentro del cloroplasto debido a la existencia de un origen de replicación río abajo al gen *rrn23S* (Lugo *et al.*, 2004; Kunnimalaiyaan, 1997). Debido a estas observaciones, se esperaría obtener una alta eficiencia de transformación y una alta expresión de los transgenes al utilizar la región *rrn16S-trnI* y *trnA-rrn23S* al transformar cedro rojo con pCBL-5.

En relación a la estrategia empleada en este trabajo para amplificar la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* de cedro rojo, comúnmente se utilizan oligonucleótidos diseñados con la secuencia de tabaco para aislar las secuencias conservadas de los cloroplastos de las especies de las cuales se desconoce la secuencia del plastoma, los cuales permiten la amplificación en otras especies. Un ejemplo de éxito obtenido utilizando esta estrategia fue lograr amplificar la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* de algodón y zanahoria utilizando la secuencia de tabaco (Kumar *et al.*, 2004a; Kumar *et al.*, 2004b). Sin embargo, resultados previos utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de tabaco para amplificar la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* permitieron observar que entre las secuencias *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* de cedro y tabaco existen diferencias de tamaño de esta región. Según lo predicho *in silico* utilizando como base la secuencia de tabaco se esperaba un amplicón de ~ 4.5 Kb y se obtuvo uno de ~ 5.7 Kb (Rodríguez-López, 2010), lo cual implica que existen

indels entre la secuencia de tabaco y cedro. Por lo anterior, en este trabajo se planteó una estrategia diferente para amplificar la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* de cedro. Se partió de una secuencia de roble, una especie que se esperaba estuviera filogenéticamente más relacionada a cedro rojo por ser una especie arbórea originaria de América. Nuestro grupo de trabajo contaba con un fragmento de ~ 923 pb del gen *rrn23S* de roble, con el cual se realizaron alineamientos para obtener la secuencia consenso para el diseño de los oligonucleótidos. Los cuales funcionaron correctamente ya que se obtuvieron los productos de PCR-I (*rrn16S-trnI*) y PCR-II (*trnA-rrn23S*) del tamaño esperado ~ 2700 pb y ~ 3000 pb respectivamente (los cuales fueron clonados y secuenciados). Esto por lo tanto implica que la secuencia consenso obtenida de los alineamientos resultó adecuada para el diseño de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Con esto no se descarta la posibilidad de utilizar la secuencia de tabaco para el diseño de oligonucleótidos que puedan ser funcionales en otras especies, sin embargo según se mostró en este trabajo se puede utilizar una especie filogenéticamente más relacionada a la especie que se desea transformar, por las variaciones que presentan las secuencias de los genomas plásticos (Kanamoto *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Daniell *et al.*, 2006).

Al ensamblar las secuencias obtenidas de la secuenciación (2706 pb para el *rrn16S-trnI* y 3026 pb para el *trnA-rrn23S* del cloroplasto de cedro rojo) se obtuvo que la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* del cloroplasto de cedro rojo es de 5732 pb. El análisis BLAST dió como resultado que existe un 99 % de identidad entre la secuencia de cedro con otras especies de interés económico como Mango, Naranja y Cacao, lo cual abre la posibilidad de que el vector pCBL-5 pueda ser utilizado para la transformación genética de cloroplastos en estas especies.

El alineamiento realizado para comparar la secuencia obtenida de cedro con respecto a tabaco, olivo y roble (figura 3.13) reveló que las diferencias de tamaño entre el amplicón de cedro y el de tabaco se deben probablemente a indels en la secuencia de tabaco de 239 pb y 103 pb, y un indel en la de cedro de 37 pb. Aunque el orden de los genes en los cloroplastos es muy conservado, en las regiones espaciadoras existen secuencias variables las cuales son muy frecuentes causando diferencias de tamaño, a demás hay mutaciones las cuales se traducen en cambios en sitios de restricción (Heinze, 1998; Turkec *et al.*, 2006). En cedro se encontró que existe un sitio de restricción *BamHI* (figura 3.8 b carril 3) el cual podría ser efecto de una de estas mutaciones; según Palmer, en

1985, encontró que una de las razones más prominentes en cuanto a la variación en tamaño y estructura de esta región es debido a los intrones. Estas observaciones corroboran que es mejor utilizar vectores especie-específicos ya que como el mecanismo de integración es por recombinación homóloga y las variaciones en las secuencias disminuye la eficiencia de transformación.

Adicionalmente, la identidad entre las las secuencias de cedro y tabaco es del 97 % al igual que entre las secuencias de cedro y olivo (cuadro 3.5), sin embargo, el porcentaje de cobertura entre las secuencias de cedro y olivo es del 100 % mientras que entre cedro y tabaco es del 91 %. Esta variación en el porcentaje de cobertura se debe a los indels que existen entre las secuencias alineadas. Adicionalmente los porcentajes de identidad entre el *rm23S* de roble comparado con cedro, tabaco y olivo no son muy variables ya que el fragmento de ~ 923 pb corresponde a una secuencia codificante y estas están muy conservadas entre estas especies (figura 3.13, del nucleótido 4913 a 4828).

Los casetes de expresión para cloroplastos deben estar compuestos por un promotor, un marcador de selección y secuencias 5'3' UTR las cuales sirven para regular la eficiencia de transcripción y traducción de los genes insertados (Verma y Daniell, 2007). Dos de los principales problemas que había enfrentado la transformación de plástidos eran la pérdida de la expresión de los transgenes en plástidos no verdes (Bogorad, 2000) y la inhabilidad de generar plantas transplastómicas a partir de embriones somáticos. Sin embargo, Kumar *et al.*, 2004b lograron solucionar esta problemática utilizando secuencias regulatorias apropiadas para la expresión de los genes *aadA* y *badh*. Como existe un protocolo de regeneración de cedro rojo a partir de embriones somáticos (Peña-Ramírez *et al.*, 2011) sería buena opción utilizar estos embriones para realizar la transformación genética de los plástidos, por ello utilizando las secuencias reportadas por Kumar *et al.*, 2004b se construyó el casete de expresión que permitirá la transformación de embriones somáticos de cedro rojo. El casete de expresión contiene al promotor ribosomal 16S (*Prn16S*) el cual es un promotor constitutivo fuerte en cloroplastos (Shinozaki *et al.*, 1986) junto con su secuencia regulatoria 5' UTR, este promotor contiene los sitios de unión de las RNA polimerasas de cloroplasto y nuclear lo cual facilita la expresión en tejidos verdes y no verdes. El promotor *Prn16S* 5' UTR y el terminador *TpsbA* 3'UTR dirigen la expresión del gen *aadA* que confiere resistencia a espectinomicina (Goldschmidt-Clermont, 1991) aunque también pudo haberse utilizado el gen *neo*, que confiere

CAPÍTULO IV

resistencia a kanamicina, sin embargo, se ha reportado que la recuperación de plantas transformadas utilizando este agente de selección es muy baja (Carrer *et al.*, 1993). El promotor G10 T7 y su región 5'UTR es de origen viral pero ha funcionado bien en cloroplastos ya que también facilita la expresión en tejidos verdes y no verdes (Guda *et al.*, 2000; Staub *et al.*, 2000; Dingra *et al.*, 2004). Este promotor así como el terminador Trps16 3'UTR dirigieron la expresión del gen reportero *gfp*, el cual ha sido utilizado ampliamente para realizar transformación transitoria y estable (Hibberd *et al.*, 1998; Limaye *et al.*, 2006). Con las secuencias utilizadas en este trabajo para la construcción del casete de expresión se espera que sea posible tanto la transformación de embriones somáticos como de tejidos organogénicos aunque se corre el riesgo de obtener quimeras, las cuales no son útiles cuando se regeneran a plantas completas.

En este trabajo se describe la generación del vector pCBL-5 para la transformación de plástidos de *Cedrela odorata* L. el cual es el segundo trabajo que se realiza utilizando una especie forestal leñosa de interés económico (Lamb, 1968), siendo *Populus alba* la primera (Okumura *et al.*, 2006). Una de las ventajas de trabajar con esta especie es que se cuenta con protocolos eficientes para la regeneración tanto por organogénesis como por embriogénesis somática (Peña-Ramírez *et al.*, 2010; Peña-Ramírez *et al.*, 2011), lo cual es un punto importante para desarrollar estrategias de transformación. El vector pCBL-5 constituye una herramienta novedosa para aplicaciones biotecnológicas en cedro rojo. La tecnología de la transformación de plástidos no solo podría ser utilizada para realizar la inserción de genes de resistencia contra el barrenador *Hypsipyla grandella* como podría ser la integración de genes que codifican proteínas CRY1 (De Cosa *et al.*, 2001); realizar ingeniería metabólica (Madoka *et al.*, 2002). Además, con los resultados obtenidos del 99% de identidad de la secuencia de cedro con especies de interés económico como mango, naranja y cacao, se abre la posibilidad de utilizar este vector para realizar transformación de los cloroplastos de estas especies con todos los beneficios ya mencionados.

BIBLIOGRAFÍA

- Bogorad L. (2000) Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *Trends Biotechnol.* 18: 257–263.
- Carrer H, Hockenberry TN, Svab Z, Maliga P (1993) Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. *Mol Gen Genet.* 241: 49–56.
- De Cosa B, MoarW, Lee SB, Miller M, Daniell H (2001) Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol* 19: 71–74.
- DeGray, G., Kanniah, R., Franzine, S., John, S., and Daniell, H. (2001) Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiol.* 127, 852–862.
- Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe PO (2001) Expression of cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol*, 311:1001-1009.
- Daniell H, Khan M, Allison L (2002) Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci* 2002, 7:84-91.
- Daniell H, Kumar S, Duformantel N (2005) Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops. *Trends Biotechnol* 2005, 23:238-245.
- Daniell H, Lee SB, Grevich J, Saski C, Quesada-Vargas T, Guda C, Tomkins J, Jansen RK (2006) Complete chloroplast genome sequences of *Solanum bulbocastanum*, *Solanum lycopersicum* and comparative analyses with other Solanaceae genomes. *Theor Appl Genet* 112: 1503–1518.
- Daniell H, Datta R, Varma S, Gray S, Lee SB (1998) Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nat Biotechnol* 16: 345–348.
- Dhingra A, Portis AR Jr, Daniell H (2004) Enhanced translation of a chloroplast expressed RbcS gene restores SSU levels and photosynthesis in nuclear antisense RbcS plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6315–6320.

CAPÍTULO IV

- Fernandez-San Millan, A., Mingo-Castel, A., and Daniell, H. (2003) A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnol. J.* 1, 71–79.
- Goldschmidt-Clermont M. (1991). Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res.* 19:4083–4089.
- Guda C, Lee SB, Daniell H (2000) Stable expression of biodegradable protein based polymer in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Rep* 19:257–262.
- Heinze B. (1998). PCR-based chloroplast DNA assays for the identification of native *Populus nigra* and introduced poplar hybrids in Europe. *Forest Genetics.* 5:31-38.
- Hibberd JM, Linley PJ, Khan MS, Gray JC (1998) Transient expression of green fluorescent protein in various plastid types following microprojectile bombardment. *Plant J* 16: 627–632.
- Kanamoto H, Yamashita A, Okumura S, Hattori M, Tomizawa K (2005) The complete genome sequence of the *Lactuca sativa* (lettuce) chloroplast. Unpublished.
- Kim JS, Jung JD, Lee JA, Park HW, Oh KH, Jeong WJ, Choi DW, Liu JR, Cho KY (2006) Complete sequence and organization of the cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Baekmibaekdadagi) chloroplast genome. *Plant Cell Rep* 25:334–340.
- Khan MS and Maliga P (1999) Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nature Biotechnol.* 17: 910-915.
- Kumar S., Dhingra A., Daniell H. (2004a). Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgene. *Plant Mol. Biol.* 56:203-216.
- Kumar S., Dhingra A., Daniell H. (2004b). Plastid-Expressed Bataine Aldehyde Dehydrogenase Gene in Carrot Cultured Cells, Roots, And Leaves Confers Enhanced Salt Tolerance. *Plant physiology.* 136:2843-2854.

- Kunnimalaiyaan, M., Shi, F., and Nielsen, B. L. (1997). Analysis of the tobacco chloroplast DNA replication origin (oriB) downstream of the 23S rRNA gene. *J. Mol. Biol.* 268, 273–283.
- Lamb AFA (1968) *Fast growing timbers of the lowland tropics*, no. 2 *Cedrela odorata* L. Commonwealth Forestry Institute, University of Oxford, Oxford.
- Limaye A, Koya V, Samsam M, Daniell H (2006) Receptor-mediated oral delivery of a bioencapsulated green fluorescent protein expressed in transgenic chloroplasts into the mouse circulatory system. *FASEB J* 20:959–961.
- Lugo, S. K., Kunnimalayaan, M., Singh, N. K., and Nielsen, B. L. (2004). Required sequence elements for chloroplast DNA replication activity in vitro and in electroporated chloroplasts. *Plant Sci.* 166: 151–161.
- Madoka Y, Tomizawa K, Mizoi J, Nishida I, Nagano Y, Sasaki Y (2002) Chloroplast transformation with modified accD operon increases acetyl-CoA carboxylase and causes extension of leaf longevity and increase in seed yield in tobacco. *Plant Cell Physiol.* 43:1518–152.
- Quesada-Vargas T, Ruiz ON, Daniell H (2005) Characterization of heterologous multigene operons in transgenic chloroplasts: transcription, processing, translation. *Plant Physiol.* 138:1746–1762.
- Rodriguez L. T., (2010). Clonación de regiones cloroplastídicas de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) para la elaboración de vectores de clonación. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. México. 53 p.
- Ohme M, Kamogashira T, Shinozaki K, Sugiura M (1985), : Structure and cotranscription of tobacco chloroplast genes for tRNA^{Glu}(UUC), tRNA^{Tyr}(GUA) and tRNA^{Asp}(GUC). *Nucleic Acids Res* 13:1045–1056.
- Okumura S, Sawada M, Park YW, Hayashi T, Shimamura M, Takase H, Tomizawa K. (2006). Transformation of poplar (*Populus alba*) plastids and expression of foreign proteins in tree chloroplasts. *Transgenic Res* 15:637–646.

CAPÍTULO IV

- O'Neill C, Horvath GV, Horvath E, Dix PJ, Medgyesy P (1993) Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. *Plant J* 3: 729-738.
- Peña-Ramírez Y.J., García-Sheseña I., Hernández-Espinoza A., Domínguez-Hernández A., Barredo-Pool F.A., Gonzáles-Rodríguez J.A., Robert M.L. (2011) Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in the tropical timber tree Spanish red cedar [*Cedrela odorata* L. (Meliaceae)]. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 105:203-209.
- Peña-Ramírez Y.J., Juárez-Gómez J., Gómez-López L., Jerónimo-Pérez J.L., García-Sheseña I., Gonzáles-Rodríguez J.A., Robert M.L. (2010) Multiple adventitious shoot formation in Spanish red cedar (*Cedrela odorata* L.) cultured in vitro using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species. *In Vitro Cell.Dev.Biol* 46:149-160.
- Ruf S, Hermann M, Berger IJ, Carrer H and Bock R (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol* 19: 870–875.
- Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz PTJ, Staub JM and Nehra NS (1999) Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J* 19: 209–216.
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi Shinozaki K. (1986). The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J* 5: 2043–2049.
- Sikdar SR, Serino G, Chaudhuri S and Maliga P (1998) Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 18:20–24.
- Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PTJ, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll JA, Spatola L, et al (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol* 18: 333–338.

- Svab Z and Maliga P (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 913–917.
- Turkec A, Sayar M, Heinze B. (2006). Identification of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) and analysis of their genetic relationships by chloroplast sequence-characterised amplified regions (cpSCAR). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 53:1635-1641.
- Vera A, Sugiura M (1995) Chloroplast rRNA transcription from structurally different tandem promoters: an additional novel-type promoter. *Curr Genet* 27: 280–284.
- Verma D. y Daniell H. (2007). Chloroplast Vector Systems For Biotechnology Applications. Department of Molecular Biology and Microbiology, College of Medicine, University of Central Florida, Orlando Florida. *Plant Physiology*, December 2007, vol. 145, pp. 1129–1143.

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Partiendo de un fragmento de ~ 923 pb del gen *rrn23S* de roble (*T. roseae*) una especie arbórea originaria de América, al igual que *C. odorata*, se logró obtener una secuencia consenso que permitió el diseño de oligonucleótidos, para aislar las regiones *rrn16S-trnI* y *trnA-23S* de *C. odorata*.

Se aisló, clonó y secuenció un fragmento de ~ 2706 pb correspondiente a la región *rrn16S-trnI* del cloroplasto de *C. odorata* L., también se obtuvo otro fragmento correspondiente al *trnA-rrn23S* de ~ 3026 pb. El tamaño de la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* del cloroplasto de *C. odorata* L. es de ~ 5732 pb

La región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* de *C. odorata* L. comparte 99% de identidad con especies de interés económica como *Mangifera indica*, *Citrus sinensis* y *Theobroma cacao*

Se generó un vector de transformación para el cloroplasto de cedro rojo pCBL-5, utilizando como secuencias de recombinación homóloga las regiones *rrn16S-trnI* y *trnA-23S* de *C. odorata* para flanquear un casete de expresión que contiene el gen de selección a espectinomicina *aadA* y el gen reportero de la proteína verde fluorescente *gfp*.

La estrategia desarrollada para construir el vector de transformación pCBL-5 del cloroplasto de cedro rojo a partir de la secuencia de ~ 923 pb del fragmento del gen *rrn23S* de roble fue exitosa ya que todos los análisis realizados *in silico* fueron comprobados experimentalmente.

Una etapa importante en el diseño y construcción de los vectores para la transformación del cloroplasto, es comprobar su funcionalidad ya que esto permitiría evaluar la eficiencia de transformación así como la funcionalidad de los elementos reguladores utilizados para la construcción. Por lo cual sería necesario realizar eventos de transformación utilizando el vector pCBL-5 de *Cedrela odorata* L. en tejidos organogénicos o embriogénicos de cedro rojo y comprobar la inserción del casete de expresión en tejidos transformados.

Debido al diseño del casete de expresión el gen *gfp* está flanqueado por sitios de restricción que permiten sustituirlo por cualquier otro gen de interés y extender la aplicación del vector hacia otras áreas de interés.

El vector pCBL-5 podría ser patentado y ser utilizado en un futuro para la inserción de genes de resistencia contra *Hypsipyla grandella*, estos genes podrían ser los genes que codifican para proteínas *cry* de *Bacillus thuringiensis*. Este vector además podría ser utilizado para realizar la transformación de plástidos en *Mangifera indica*, *Citrus sinensis* y *Theobroma cacao*, debido al alto porcentaje de identidad (99 %) de la región *rrn16S-trnI-trnA-rrn23S* del plastoma de *C. odorata* con el de estas especies.

ANEXOS

1. Secuencia parcial correspondiente a la región *rrn16S-trnI* de *Cedrela odorata* L.

>*rrn16S-trnI*

AGAACCTGCCCTTGGGAGGGGAACACAGCTGGAACGGCTGCTAATACCCCGTAGGCTGAGGAGCAAAAGGA
GGAATCCGCCCGAGGAGGGGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGCAATAGCTTACCAAGGCGATGATCA
GTAGCTGGTCCGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATTTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATGCCCGCTGGAGGTAGAAGGCCACGGGTCTGTA
ACTTCTTTTCCCGGAGAAGAAGCAATGACGGTATCTGGGGAATAAGCATCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACAGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCTGTAGGTGGCTTTTAAAGTCC
GCCGTCAAATCCCAGGGCTCAACCTGGACAGGCGGTGGAACCTACCAAGCTGGAGTACGGTAGGGGAGAGG
GAATTTCCGGTGGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGAAAGAACACCAACGGCGAAAGCACTCTGCTGGGCCG
ACACTGACACTGAGAGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTTAGCCGTAAACGA
TGGATACTAGGCGCTGTGCGTATCGACCCGTGCGAGTGCTGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGT
ACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGA
TGCAAAGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCCGCGAATCCTCTTGAAAGAGAGGGGTGCCCTCGGGAAC
GCGGACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGCTCAGTCTGTCGCGTAAGGTGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCTCTGCTGCTTAGTTGCCACCGTTGAGTTTGGAAACCTGAGCAGACTGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGTG
AGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGCCCTGGGCGACACACGTGCTACAATGGCCGGGACAAAGGGTC
GCGATCCCGCGAGGGTGAGCTAACTCCAAAAACCCGTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCAT
GAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAGCCATACGGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGACACACCGC
CCGTCACTATGGGAGCTGGCCATGCCCGAAGTCGTTACCTTAACCGCAAGGAGGGGGTGCCGAAGGCAGG
GCTAGTGACTGGAGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAAGTGGGAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTTCAGGG
AGAGCGAATGCTTGTGGGTATTTTGGTTTGACACCGCTTACACCCAAAAAGAAGCGAGCTACGCTGAGTG
AACTTGGAGATGGAAGTCTTCTTTCGTTTCTCGACGGTGAAGTAAGACCAAGCCCATGAGCTTATTATCCTA
GGTCGGAACAAGTTGATAGGATCCCCCTTTTACGCCCCATGTGCGCCACACGGGAGGGACATGGGGCGTAAA
AAGGAAAGAGAGGGATGGGGTTTCTCTCGCTTTTGGCATAGTGGGCCCCAGCGGGAGGCCCGCACGACGGGC
TATTAGCTCAGTGGTAGAGCGCGCCCTGATAATTGCGTCTGTTGTGCTGGGCTGTGAGGGCTCTCAGCCACA
TGGATAGTTCAATGTGCTCATCAGCGCCTGACCCTGAGATGTGGATCATCCAAGGCACATTAGCATGGCGTAC
TTCTCCTGTTTCAACCGGGGGTTTGAACAACTCTCTCAGGAGGATAGATGGGGCGATTAGGTGAGAT
CCAATGTAGATCCAACCTTTCTATTCACTCGTGGGATCCGGCGGTCCGGGGGGGACCACCACGGCTCTCTCT
TCTCGATAATCCATACATCCCTTATCAGTGTATGGACAGCTATCTCTCGAGCACAGGTTTAGGTTTCGGCCTCA
ATGGGAAAAAATGGAGCACCTAACAACTATCTTACAGACCAAGAACTACGAGATCGCCCCTTTCATTTC
ATTCTGGGGTGACGGAGGGATCGTACCATTGAGCCTTTTTTTTTCATGCTTTTCCCGAGGTCTGGAGAAAGC
TGCAATCAATAGGATTTTCTTAATCCTCCCTTCCCGAAAGGAAGAACGTGAAATCTTTTTCTTTCTTTCTTC
CGCAGGGACCAGGAGATTGGATCTAGCCGTAAGAAGAAATGCTTGGCTGATAAATAACTCACTTCTTGGTCTTC
GACCCCTCAGTCACTACGAACGCCCCGATAGGTGCAATGGGATGTGTCTATTTATCTATCTCTTGACTCGA
AATGGGAGCAGGTTTGAAGAAAGGATCTTAGAGTGTCTAGGTTGGGCGGGAGGGTCTCTAACGCCCTTCATT
TTTCTTCTCATCGGAGTTATTTCCCAAATACTTGCCATGATAAGGAAGAAGGGGGGAACAAGCACACTTGGAG
AGCGCAGTACAACGGAGAGTTGTATGCTGCGTTCGGGAAGGATGAATCGCTCCGAAAAGGAATCCGTTGATT
CTCTCCCAATTGGTTGGACCGTAGGTGCGATGATTTACTTCACGGCGAGGTCTCTGGTTCAAGTCCAGGATG
GCCCCA

2. Secuencia parcial correspondiente a la región *trnA-rnr23S* de *Cedrele odorata* L.

>*trnA-rnr23S*

GGGGATATAGCTCAGTTGGTAGAGCTCCGCTCTTGCAATTGGGTCGTTGCGATTACGGGTTGGATGTCTAATT
GTCCAGGCGGTAATGATAGTATCTGTACCTGAACCGGTGGCTCACTTTTCTAAGTAATGGGAAGAGGACC
GAAACATGCCACTGAAAGACTCTACTGAGACAAAGATGGGCTGTCAAGAACGTAGAAGAGGTAGGATGGGCGG
TTGGTCAGATCTAGTATGGATCGTACATGGACGGTAGTTGGAGTCGGCGGCTCTCTTAGGGTTCCCTCATCTG
GGATCCCTGGGGAAGAGGATCAAGTTGGCCCTTGCGAACAGCTTGATGCACTATCTCCCTTCAACCCTTTGAG
CGAAATGCGACAAAAGGAAGGAAAATCCATGGACCGACCCCATCGTCTCCACCCCGTAGGAACACGAGATCA
CCCCAAGGACGCCTTCGGTATCCAGGGGTCGCGGACCGACCATAGAACCTGCTCAATAAGTGAATGCATTA
GCTGTCCACTCTCAGGTTGGGCAGTAAGGTCGGAGAAGGGCAATTACTCATTCTTAAACCTGCGGTGCGAG
AAGGAGCAATCACTCATCTTAAACACAGCATCTTAAGACCAAAGAGTGGGGGCGGAAAAGGGGGGAAAGCT
CTCCGTTCTGTTCTCTGTAGCTGGATCCTCCGGAACCACAAGAATTCTTAGTTAGAATGGGATTCCTCAACT
CAGCACCTTTTGAATTTTGAGAAGAGTTGCTCTTTGGAGAGCACAGTACGATGAAAGTTGTAAGCTGTGTTT
GGGGGGGAGTTATTGTCTATCGTTGGCCTCTATGGTAGAATCAGTGGGGGCTGAGAGGCGGTGGTTTACCCT
GTGGCGGATGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTATCTCCAACCTCGTGAACCTAGCCGATACAAAGCTATATGAATA
TGATAGCACCCAATTTTTCCGATTCCGGCAGTTCGATCTATGGTTTATTATTCATGGACGTTGATAAGATCCTT
CCATTTAGCAGCACCTTAGGATGGCATAGCCTTAAAGTCAAGTTAAGGGCGAGGTTCAAACAAGGAAAGGCTT
ACGGTGGATACCTAGGCACCCAGAGACGAGGAAGGGCGTAGTAAGCGACGAAATGCTTCGGGGAGTTGAAAAT
AAGCGTAGATCCGGAGATTCCCGAATAGGTCAACCTTTTCAACTGCTGCTGAATCCATGGGCAGGCAAGAGAC
AACCTGGCGAACTGAAACATCTTAGTAGCCAGAGGAAAAGAAAGCAAAAGCGATTCCCCTAGTAGCGGCGAGC
GAAATGGGAGCAGCCTAAACCGTGAACCGGGGTTGTGGGAGAGCAATACAAGCGTCTGTGCTGCTAGGCGAAG
CGGTGGAGTGCTGCACCCTAGATGGCGAGAGTCCAGTAGCCGAAAGCATCACTAGCTTACGCTCTGACCCGAG
TAGCATGGGCGACGTGGAATCCCGTGTGAATCAGCAAGGACACCTTGCAAGGCTAAATACTCCTGGGTGACC
GATAGCGAAGTAGTACCGTGAGGGAAGGGTGAAAAGAACCCCATCGGGGAGTGAAATAGAACATGAAACCGT
AAGCTCCCAAGCAGTGGGAGGAGCCCGGGGCTCTGACCGCGTGCCTGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTCATAG
GCAGTGGCTTGGTTAAGGGAACCCACCGAGCCGTAGCGAAAGCGAGTCTTCATAGGGCAATTGTCACTGCTT
ATGGACCCGAACCTGGGTGATCTATCCATGACCAGGATGAAGCTTGGGTGAAACTAAGTGGAGGTCCGAACCG
ACTGATGTTGAAGAATCAGCGGATGAGTTGTGGTTAGGGGTGAAATGCCACTCGAACCCAGAGCTAGCTGGTT
CTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCAGTTGACTGGACATCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCGGGCCGC
GAGAGCGGTACCAAATCGAGGCAAACCTGAATACTAGATATGACCTCAAATAACAGGGGTCAAGGTGCGCC
AGTGAGACGATGGGGGATAAGCTTCATCGTCGAGAGGGAAACAGCCCGGATCACCAGCTAAGGCCCTAAATG
ACCGCTCAGTGATAAAGGAGGTAGGGGTGCAGAGACAGCCAGGAGGTTTGCCTAGAAGCAGCCACCTTGAAA
GAGTGCGTAATAGCTCACTGATCGAGCGCTCTTGCGCCGAAGATGAACGGGGCTAAGCGATCTGCCGAAGCTG
TGGGATGTAAAAATGCATCGGTAGGGGAGCGTTCCGCCTTAGAGGGAAGCACCCGCGCGAGCGGCGGTGGACG
AAGCGGAAGCGAGAATGTGCGCTTGAGTAACGCAAACATTGGTGAGAATCCAATGCCCCGAAAACCCAAAGGT
TCCTCCGCAAGGTTCTGTCCACGGAGGGTGAGTCAGGGCCTAAGATCAGGCCGAAAGGCGTAGTCGATGGACAA
CAGGTGAATATCTCTGTACTACCCCTTGTGGTCCCGAGGGACGGAGGAGCTAGGTTAGCCGAAAGATGGTT
ATCGGTTCAAGGACGCAAGGTGCCCTTGCTTTTTTCAGGGTAAGAAGGGGTAGAGAAAATGCCCGAGCCAATG
TTCGAGTACCAGGCGCTACGGCGCTGAAGTAACCATGCTATACTCCAGGAAAAGCTCGAACGACCTTCAAC
AAAAGGTACCTGTACCCGAAACCGACACAGGTGGGTAGGTAGAGAATACCTAGGGGCGCGAGACAACTCTCT
CTAAGGAACTCGGCAAAATAGCCCGTAACCTCGGGAGAAGGGGTGCCTCTCACAAAGGGGGTCGCAGTGAC
CAGGCCCGGGCGACTGTTTACCAAAAACACAGGTCTCCGCAAAGTCGTAAGACCATGTATGGGGGCTGACGCC
TGCCCAGTGCCGAAGGTCAAGGAAGTTGGTGACCTGATGACAGGGGAGCCGGCGACCGAAGCCCCGGTGAAC
GGCGGCCGTAACATAACGGTCCTAAGGTAGCG

3. Secuencia del vector de transformación para cloroplastos de *Cedrela odorata* L. pCBL-5.

Nombre: pCBL-5

Tamaño de la secuencia: 10751 bp dsDNA circular

Definición: Vector de transformación para cloroplastos de cedro rojo *Cedrela odorata* L.

Localización de las secuencias que lo constituyen:

- 1..2234= Vector pUC19
2235..2240= Sitio de restricción *HindIII*
2241..4946= Secuencia de la región *rrn16S-trnI* de *Cedrela odorata* L.
4947..4954= Sitio de restricción *NotI*
4955..5165= *Prm16S*
5166..5171= Sitio de restricción *Sall*
5172..5966= Gene *aadA*
5967..5972= Sitio de restricción *StuI*
5973..6366= *TpsbA*
6367..6416= *Pg10T7*
6417..6422= Sitio de restricción *SphI*
6419..7135= Gene *gfp*
7136..7141= Sitio de restricción *PstI*
7142..7289= *Trps16*
7290..7297= Sitio de restricción *NotI*
7298..10323= Secuencia de la región *trnA-rrn23S* de *Cedrela odorata* L.
10324..10329= Sitio de restricción *XbaI*
10330..10751= Vector pUC19

Inicio

```
1      GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTTAA TGTCATGATA ATAATGGTTT
61     CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTTT
121    TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181    AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCTG TGTCGCCCTT ATTCCCTTTT
241    TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTTTGCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
301    CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA
361    TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC
421    TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC
481    ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541    GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601    ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTTG CACAACATGG
661    GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG
```

721	ACGAGCGTGA	CACCACGATG	CCTGTAGCAA	TGGCAACAAC	GTTGCGCAAA	CTATTAAGTG
781	GCGAACTACT	TACTCTAGCT	TCCCGGCAAC	AATTAATAGA	CTGGATGGAG	GCGGATAAAG
841	TTGCAGGACC	ACTTCTGCGC	TCGGCCCTTC	CGGCTGGCTG	GTTTATTGCT	GATAAATCTG
901	GAGCCGGTGA	GCGTGGGTCT	CGCGGTATCA	TTGCAGCACT	GGGGCCAGAT	GGTAAGCCCT
961	CCCGTATCGT	AGTTATCTAC	ACGACGGGGA	GTCAGGCAAC	TATGGATGAA	CGAAATAGAC
1021	AGATCGCTGA	GATAGGTGCC	TCAGTATTA	AGCATTGGTA	ACTGTCAGAC	CAAGTTTACT
1081	CATATATACT	TTAGATTGAT	TTAAAACTTC	ATTTTAAATT	TAAAAGGATC	TAGGTGAAGA
1141	TCCTTTTTGA	TAATCTCATG	ACCAAAATCC	CTTAACGTGA	GTTTTCTGTC	CACTGAGCGT
1201	CAGACCCCGT	AGAAAAGATC	AAAGGATCTT	CTTGAGATCC	TTTTTTTCTG	CGCGTAATCT
1261	GCTGCTTGCA	AACAAAAAAA	CCACCGTAC	CAGCGGTGGT	TTGTTTGCCG	GATCAAGAGC
1321	TACCAACTCT	TTTTCCGAAG	GTAAGTGGCT	TCAGCAGAGC	GCAGATACCA	AATACTGTCC
1381	TTCTAGTGTA	GCCGTAGTTA	GGCCACCACT	TCAAGAACTC	TGTAGCACCG	CCTACATACC
1441	TCGCTCTGCT	AATCCTGTTA	CCAGTGGCTG	CTGCCAGTGG	CGATAAGTCG	TGTCTTACCG
1501	GGTTGGACTC	AAGACGATAG	TTACCGGATA	AGGCGCAGCG	GTCGGGCTGA	ACGGGGGGTT
1561	CGTGACACAC	GCCCAGCTTG	GAGCGAACGA	CCTACACCGA	ACTGAGATAC	CTACAGCGTG
1621	AGCATTGAGA	AAGCGCCACG	CTTCCCAGAG	GGAGAAAGGC	GGACAGGTAT	CCGGTAAGCG
1681	GCAGGGTCGG	AACAGGAGAG	CGCACGAGGG	AGCTTCCAGG	GGGAAACGCC	TGGTATCTTT
1741	ATAGTCCTGT	CGGGTTTCGC	CACCTCTGAC	TTGAGCGTCG	ATTTTTGTGA	TGCTCGTCAG
1801	GGGGGCGGAG	CCTATGGAAA	AACGCCAGCA	ACGCGGCCCTT	TTTACGGTTT	CTGGCCCTTT
1861	CTGGGCCTTT	TGCTCACATG	TTCTTTCTCG	CGTTATCCCC	TGATTCTGTG	GATAACCGTA
1921	TTACCGCCTT	TGAGTGAGCT	GATACCGCTC	GCCGCAGCCG	AACGACCGAG	CGCAGCGAGT
1981	CAGTGAGCGA	GGAAGCGGAA	GAGCGCCCAA	TACGCAAACC	GCCTCTCCCC	CGCGGTGGGC
2041	CGATTCATTA	ATGCAGCTGG	CACGACAGGT	TTCCCGACTG	GAAAGCGGGC	AGTGAGCGCA
2101	ACGCAATTAA	TGTGAGTTAG	CTCACTCATT	AGGCACCCCA	GGCTTTACAC	TTTATGCTTC
2161	CGGCTCGTAT	GTTGTGTGGA	ATTGTGAGCG	GATAACAATT	TCACACAGGA	AACAGCTATG
2221	ACCATGATTA	CGCCAAGCTT	AGAACCTGCC	CTTGGGAGGG	GAACAACAGC	TGGAAACGGC
2281	TGCTAATACC	CCGTAGGCTG	AGGAGCAAAA	GGAGGAATCC	GCCCAGGAGG	GGGTCCCGT
2341	CTGATTAGCT	AGTTGGTGAG	GCAATAGCTT	ACCAAGGCGA	TGATCAGTAG	CTGGTCCGAG
2401	AGGATGATCA	GCCACACTGG	GACTGAGACA	CGGCCAGAC	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG
2461	GGGAATTTTC	CGCAATGGGC	GAAAGCCTGA	CGGAGCAATG	CCGCGTGGAG	GTAGAAGGCC
2521	CACGGGTCGT	GAACCTCTTT	TCCCGGAGAA	GAAGCAATGA	CGGTATCTGG	GGAATAAGCA
2581	TCGGCTAACT	CTGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	ATACAGAGGA	TGCAAGCGTT	ATCCGGAATG
2641	ATTGGGCGTA	AAGCGTCTGT	AGGTGGCTTT	TTAAGTCCGC	CGTCAAATCC	CAGGGCTCAA
2701	CCCTGGACAG	GCGGTGGAAA	CTACCAAGCT	GGAGTACGGT	AGGGGCAGAG	GGAATTTCCG
2761	GTGGAGCGGT	GAAATGCGTA	GAGATCGGAA	AGAACACCAA	CGGCGAAAGC	ACTCTGCTGG
2821	GCCGACACTG	ACACTGAGAG	ACGAAAGCTA	GGGGAGCGAA	TGGGATTAGA	TACCCAGTGA
2881	GCTTAGCCCG	TAAACGATGG	ATACTAGCGC	CTGTGCGTAT	CGACCCGTGC	AGTCTGTAG
2941	CTAACGCGTT	AAGTATCCCG	CCTGGGGAGT	ACGTTCCGAA	GAATGAAACT	CAAAGGAATT
3001	GACGGGGGCC	CGCACAAAGC	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGATGCAAAG	CGAAGAACCT
3061	TACCAGGGCT	TGACATGCCG	CGAATCCTCT	TGAAAGAGAG	GGGTGCCTTC	GGGAACGCGG
3121	ACACAGGTGG	TGCATGGCTG	TCGTGAGCTC	GTGCCGTAAG	GTGTTGGGTT	AAGTCCCGCA
3181	ACGAGCGCAA	CCCTCGTGCT	TAGTTGCCAC	CGTTGAGTTT	GGAACCTGA	GCAGACTGCC
3241	GGTGATAAGC	CGGAGGAAGG	TGAGGATGAC	GTCAAGTCAT	CATGCCCTTC	ATGCCCTGGG
3301	CGACACACGT	GCTACAATGG	CCGGGACAAA	GGGTCGCGAT	CCCGCGAGGG	TGAGCTAACT
3361	CCAAAACCTC	GTCCTCAGTT	CGGATTGCAG	GCTGCAACTC	GCCTGCATGA	AGCCGGAATC
3421	GCTAGTAATC	GCCGGTCAGC	CATACGGCGG	TGAATTCGTT	CCCGGGCCTT	GTACACACCG
3481	CCCGTACAC	TATGGGAGCT	GGCCATGCCC	GAAGTCGTTA	CCTTAACCGC	AAGGAGGGGG
3541	GTGCCGAAGG	CAGGGCTAGT	GACTGGAGTG	AAGTCGTAAC	AAGGTAGCCG	TACTGGAAGG
3601	TGCGGCTGGA	TCACCTCCTT	TTCAGGGAGA	GCGAATGCTT	GTTGGGTATT	TTGGTTTGAC
3661	ACCGCTTCAC	ACCCAAAAG	AAGCGAGCTA	CGCCTGAGTG	AAACTTGGAG	ATGGAAGTCT
3721	TCTTTCTGTT	CTCGACGGTG	AAGTAAGACC	AAGCCCATGA	GCTTATTATC	CTAGGTCCGA
3781	ACAAGTTGAT	AGGATCCCC	TTTTACGCCC	CCATGTCGCC	ACACGGGAGG	GACATGGGGG
3841	CGTAAAAGG	AAAGAGAGGG	ATGGGGTTTC	TCTCGCTTTT	GGCATAGTGG	GCCCCAGCG
3901	GGAGGCCCGC	ACGACGGGCT	ATTAGCTCAG	TGGTAGAGCG	CGCCCTGAT	AATTGCGTCG

3961 TTGTGCCTGG GCTGTGAGGG CTCTCAGCCA CATGGATAGT TCAATGTGCT CATCAGCGCC
4021 TGACCCTGAG ATGTGGATCA TCCAAGGCAC ATTAGCATGG CGTACTTCTC CTGTTCTGAAC
4081 CGGGGGTTTG AAAACAAACT CCTCCTCAGG AGGATAGATG GGGCGATTCA GGTGAGATCC
4141 AATGTAGATC CAACTTTCTA TTCACTCGTG GGATCCGGGC GGTCCGGGGG GGACCACCAC
4201 GGCTCCTCTC TTCTCGATAA TCCATACATC CCTTATCAGT GTATGGACAG CTATCTCTCG
4261 AGCACAGGTT TAGGTTCCGG CTCAATGGGA AAAAAATGG AGCACCTAAC AACGTATCTT
4321 CACAGACCAA GAACACGAG ATCGCCCTT TCATTTTATT CTGGGGTGAC GGAGGGATCG
4381 TACCATTGCA GCCTTTTTTT TCATGCTTTT CCCGGAGGTC TGGAGAAAGC TGCAATCAAT
4441 AGGATTTTCC TAATCCTCCC TTCCCGAAG GAAGAACGTG AAATTCTTTT TCCTTTTCTT
4501 TTCCGCAGGG ACCAGGAGAT TGGATCTAGC CGTAAGAAGA ATGCTTGGCT GATAAATAAC
4561 TCACTTCTTG GTCTTCGACC CCCTCAGTCA CTACGAACGC CCCCAGTAGG TGCAATGGGA
4621 TGTGTCTATT TATCTATCTC TTGACTCGAA ATGGGAGCAG GTTTGAAAAA GGATCTTAGA
4681 GTGTCTAGGG TTGGGCCGGG AGGGTCTCTT AACGCCTTCA TTTTCTTCT CATCGGAGTT
4741 ATTTCCCAA TACTTGCCAT GATAAGGAAG AAGGGGGGAA CAAGCACACT TGGAGAGCGC
4801 AGTACAACGG AGAGTTGTAT GCTGCGTTCC GGAAGGATGA ATCGCTCCCG AAAAGGAATC
4861 CGTTGATTCT CTCCAATTG GTTGGACCGT AGGTGCGATG ATTTACTTCA CGGGCGAGGT
4921 CTCTGGTTCA AGTCCAGGAT GGCCCAGCGG CCGCGGATCC TCCCTACAAC TAGTGATATC
4981 GCCCGGAGTT CGCTCCAGA AATATAGCCA TCCCTGCCCC CTCACGTCAA TCCCACGAGC
5041 CTCTTATCCA TTCTCATTGA ACGACGGCGA ATTGTATTGA TTGGTGAGCT AATCAATATC
5101 AAATATGAAA GGGAAATCGT TAAATTATTC AATTATTATC TAATTGAATA ATTTAAGAAT
5161 AATTAGTCGA CATGGATCCC GAAGCGGTGA TCGCCGAAGT ATCGACTCAA CTATCAGAGG
5221 TAGTTGGCGT CATCGAGCGC CATCTCGAAC CGACGTTGCT GGCCGTACAT TTGTACGGCT
5281 CCGCAGTGA TGGCGGCCTG AAGCCACACA GTGATATTGA TTTGCTGGTT ACGGTGACCG
5341 TAAGGCTTGA TGAAACAACG CGCGAGCTT TGATCAACGA CCTTTTGGA ACTTCGGCTT
5401 CCCCTGGAGA GACGAGATT CTCCGCGCTG TAGAAGTCAC CATTGTTGTG CACGACGACA
5461 TCATTCCGTG GCGTTATCCA GCTAAGCGCG AACTGCAATT TGGAGAATGG CAGCGCAATG
5521 ACATTCTTGC AGGTATCTTC GAGCCAGCCA CGATCGACAT TGATCTGGCT ATCTTGCTGA
5581 CAAAAGCAAG AGAACATAGC GTTGCCTTGG TAGGTCCAGC GGCAGAGGAA CTCTTTGATC
5641 CGGTTTCTGA ACAGGATCTA TTTGAGGCGC TAAATGAAAC CTTAACGCTA TGGAACTCGC
5701 CGCCCGACTG GGCTGGCGAT GAGCGAAATG TAGTGCTTAC GTTGTCCCGC ATTTGGTACA
5761 GCGCAGTAAC CGGCAAAATC GCGCCGAAG ATGTGCTGC CGACTGGGCA ATGGAGCGCC
5821 TGCCGGCCCA GTATCAGCCC GTCATACTTG AAGCTAGACA GGCTTATCTT GGACAAGAAG
5881 AAGATCGCTT GGCTCGCGC GCAGATCAGT TGAAGAATT TGTCCACTAC GTGAAAGGCG
5941 AGATCACCAG GGTAGTCGGC AAATAAAGGC CTGATCCTGG CCTAGTCTAT AGGAGGTTTT
6001 GAAAAGAAAG GAGCAATAAT CATTTTCTTG TTCTATCAAG AGGGTGCTAT TGCTCCTTTC
6061 TTTTTTCTT TTTATTTATT TACTAGTATT TTACTTACAT AGACTTTTTT GTTTACATTA
6121 TAGAAAAAGA AGGAGAGGTT ATTTTCTTGC ATTTATTCAT GATTGAGTAT TCTATTTTGA
6181 TTTTGTATTT GTTTAAATG GTAGAAATAG AACTTGTTTC TCTTCTTGCT AATGTTACTA
6241 TATCTTTTTG ATTTTTTTTT TCCAAAAAA AAATCAAATT TTGACTTCTT CTATCTCTT
6301 ATCTTTGAAT ATCTCTTATC TTTGAAATAA TAATATCATT GAAATAAGAA AGAAGAGCTA
6361 TATTCGCCAT GGGTATATCT CTTCTTAAA GTTAAACAAA ATTATTTCTA GGATCCGCAT
6421 GCGTAAAGGA GAAGAACTTT TCACTGGAGT TGTCCCAATT CTTGTTGAAT TAGATGGTGA
6481 TGTTAATGGG CACAAATTTT CTGTCACTGG AGAGGGTGAA GGTGATGCAA CATAAGGAAA
6541 ACTTACCCTT AAATTTATTT GCACTACTGG AAAACTACCT GTTCCATGGC CAACACTTGT
6601 CACTACTTTC GGTATGGTG TTCAATGCTT TGCGAGATAC CCAGATCATA TGAAACAGCA
6661 TGACTTTTTT AAGAGTGCCA TGCCCGAAG TTATGTACAG GAAAGAACTA TATTTTCAA
6721 AGATGACGGG AACTACAAGA CACGTGCTGA AGTCAAGTTT GAAGGTGATA CCCTTGTTAA
6781 TAGAATCGAG TTAAGAGGTA TTGATTTTAA AGAAGATGGA AACATTCCTG GACACAAATT
6841 GGAATACAAC TATAACTCAC ACAATGTATA CATCATGGCA GACAAACAAA AGAATGGAAT
6901 CAAAGTTAAC TTCAAAATTA GACACAACAT TGAAGATGGA AGCGTTCAAC TAGCAGACCA
6961 TTATCAACAA AATACTCCA TTGGCGATGG CCTGTCTT TTACCAGACA ACCATTACCT
7021 GTCCACACAA TCTGCCCTTT CGAAGATCC CAACGAAAAG AGAGACCACA TGGTCTTCT
7081 TGAGTTTGTA ACAGCTGCTG GGATTACACA TGGCATGGAT GAACTATACA AATAACTGCA
7141 GAAATTC AAT TAAGGAAATA AATTAAGGAA ATACAAAAAG GGGGGTAGTC ATTTGTATAT

7201	AAC TTTGTAT	GAC TTTTCTC	TTCTATTTT	TTGTATTTCC	TCCCTTTTCT	TTTCTATTTG
7261	TATTTTTTTA	TCATTGCTTC	CATTGAATTG	CGGCCGCGGG	GATATAGCTC	AGTTGGTAGA
7321	GCTCCGCTCT	TGCAATTGGG	TCGTTGCGAT	TACGGGTTGG	ATGTCTAATT	GTCCAGGCGG
7381	TAATGATAGT	ATCTTGTAAC	TGAACCGGTG	GCTCACTTTT	TCTAAGTAAT	GGGGAAGAGG
7441	ACCGAAACAT	GCCACTGAAA	GACTCTACTG	AGACAAAGAT	GGGCTGTCAA	GAACGTAGAA
7501	GAGGTAGGAT	GGGCGGTTGG	TCAGATCTAG	TATGGATCGT	ACATGGACGG	TAGTTGGAGT
7561	CGGCGGCTCT	CTTAGGGTTC	CCTCATCTGG	GATCCCTGGG	GAAGAGGATC	AAGTTGGCCC
7621	TTGCGAACAG	CTTGATGCAC	TATCTCCCTT	CAACCTTTTG	AGCGAAATGC	GACAAAAGGA
7681	AGGAAAATCC	ATGGACCGAC	CCCATCGTCT	CCACCCCGTA	GGAACCTACG	GATCACCCCA
7741	AGGACGCCTT	CGGTATCCAG	GGGTCGCGGA	CCGACCATAG	AACCTTGCTC	AATAAGTGGA
7801	ATGCATTAGC	TGTCCACTCT	CAGGTTGGGC	AGTAAGGGTC	GGAGAAGGGC	AATTACTCAT
7861	TCTTAAAACC	TGCGGTCGGA	GAAGGAGCAA	TCACTCATTC	TTAAAACCGA	CATTCTTAAG
7921	ACCAAAGAGT	GGGGGCGGAA	AAGGGGGGAA	AGCTCTCCGT	TCCTGGTTCT	CCTGTAGCTG
7981	GATCCTCCGG	AACCACAAGA	ATTCTTAGTT	AGAATGGGAT	TCCAACCTCAG	CACCTTTTGA
8041	GATTTTGAGA	AGAGTTGCTC	TTTGGAGAGC	ACAGTACGAT	GAAAGTTGTA	AGCTGTGTTT
8101	GGGGGGGAGT	TATTGTCTAT	CGTTGGCCTC	TATGGTAGAA	TCAGTGGGGG	CCTGAGAGGC
8161	GGTGGTTTAC	CCTGTGGCGG	ATGTCAGCGG	TTGAGTCCG	CTTATCTCCA	ACTCGTGAAC
8221	TTAGCCGATA	CAAAGCTATA	TGAATATGAT	AGCACCCAAT	TTTTCCGATT	CGGCAGTTCC
8281	ATCTATGGTT	TATTATTCAT	GGACGTTGAT	AAGATCCTTC	CATTTAGCAG	CACCTTAGGA
8341	TGGCATAGCC	TTAAAGTCAA	GTTAAGGGCG	AGGTTCAAAC	AAGGAAAGGC	TTACGGTGGA
8401	TACCTAGGCA	CCCAGAGACG	AGGAAGGGCG	TAGTAAGCGA	CGAAATGCTT	CGGGGAGTTG
8461	AAAATAAGCG	TAGATCCGGA	GATTCCCGAA	TAGGTCAACC	TTTCGAACTG	CTGCTGAATC
8521	CATGGGCAGG	CAAGAGACAA	CCTGGCGAAC	TGAAACATCT	TAGTAGCCAG	AGGAAAAGAA
8581	AGCAAAAGCG	ATTCCCCTAG	TAGCGGCGAG	CGAAATGGGA	GCAGCCTAAA	CCGTGAAAAC
8641	GGGGTTGTGG	GAGAGCAATA	CAAGCGTCGT	GCTGCTAGGC	GAAGCGGTGG	AGTGCTGCAC
8701	CCTAGATGGC	GAGAGTCCAG	TAGCCGAAAG	CATCACTAGC	TTACGCTCTG	ACCCGAGTAG
8761	CATGGGGCAC	GTGGAATCCC	GTGTGACATCA	GCAAGGACCA	CCTTGCAAGG	CTAAATACTC
8821	CTGGGTGACC	GATAGCGAAG	TAGTACCCTG	AGGGAAGGGT	GAAAAGAACC	CCCATCGGGG
8881	AGTGAAATAG	AACATGAAAC	CGTAAGCTCC	CAAGCAGTGG	GAGGAGCCCG	GGGCTCTGAC
8941	CGCGTGCCCTG	TTGAAGAATG	AGCCGGCGAC	TCATAGGCAG	TGGCTTGGTT	AAGGGAACCC
9001	ACCGGAGCCG	TAGCGAAAGC	GAGTCTTCAT	AGGGCAATTG	TCACTGCTTA	TGGACCCGAA
9061	CCTGGGTGAT	CTATCCATGA	CCAGGATGAA	GCTTGGGTGA	AACTAAGTGG	AGGTCCGAAC
9121	CGACTGATGT	TGAAGAATCA	GCGGATGAGT	TGTGGTTAGG	GGTGAAATGC	CACTCGAACC
9181	CAGAGCTAGC	TGGTTCCTCC	CGAAATGCGT	TGAGGCGCAG	CAGTTGACTG	GACATCTAGG
9241	GGTAAAGCAC	TGTTTCGGTG	CGGGCCGCGA	GAGCGGTACC	AAATCGAGGC	AAACTCTGAA
9301	TACTAAGATAT	GACCTCAAAA	TAACAGGGGT	CAAGGTCGGC	CAGTGAGACG	ATGGGGGATA
9361	AGCTTCATCG	TCGAGAGGGA	AACAGCCCGG	ATCACCAGCT	AAGGCCCTTA	AATGACCCTG
9421	CAGTGATAAA	GGAGGTAGGG	GTGCAGAGAC	AGCCAGGAGG	TTTGCCTAGA	AGCAGCCACC
9481	CTTGAAAGAG	TGCGTAATAG	CTCACTGATC	GAGCGCTCTT	GCGCCGAAGA	TGAACGGGGC
9541	TAAGCGATCT	GCCGAAGCTG	TGGGATGTAA	AAATGCATCG	GTAGGGGAGC	GTTCCGCCTT
9601	AGAGGGAAGC	ACCCGCGCGA	GCGGCGGTGG	ACGAAGCGGA	AGCGAGAATG	TCGGCTTGAG
9661	TAACGCAAAC	ATTGGTGAGA	ATCCAATGCC	CCGAAAACCC	AAGGGTTCCT	CCGCAAGGTT
9721	CGTCCACGGA	GGGTGAGTCA	GGGCCTAAGA	TCAGGCCGAA	AGGCGTAGTC	GATGGACAAC
9781	AGGTGAATAT	TCCTGTACTA	CCCCTTGTG	GTCCCGAGGG	ACGGAGGAGG	CTAGGTTAGC
9841	CGAAAGATGG	TTATCGGTTT	AAGGACGCAA	GGTGCCCTTG	CTTTTTCAGG	GTAAAGAGGG
9901	GTAGAGAAAA	TGCCCCGAGC	CAATGTTTCA	GTACCAGGCG	CTACGGCGCT	GAAGTAACCC
9961	ATGCTATACT	CCCAGGAAAA	GCTCGAACGA	CCTTCAACAA	AAGGGTACCT	GTACCCGAAA
10021	CCGACACAGG	TGGGTAGGTA	GAGAATACCT	AGGGGCGCGA	GACAACTCTC	TCTAAGGAAC
10081	TCGGCAAAAT	AGCCCCGTAA	CTTCGGGAGA	AGGGGTGCCT	CCTCACAAAG	GGGGTCGCAG
10141	TGACCAGGCC	CGGGCGACTG	TTTACCAAAA	ACACAGGTCT	CCGCAAAGTC	GTAAGACCAT
10201	GTATGGGGGC	TGACGCCCTG	CCAGTGCCGG	AAGGTCAAGG	AAGTTGGTGA	CCTGATGACA
10261	GGGGAGCCGG	CGACCGAAGC	CCCGGTGAAC	GGCGGCCGTA	ACTATAACGG	TCCTAAGGTA
10321	GCGTCTAGAG	GATCCCCGGG	TACCGAGCTC	GAATTCACTG	GCCGTCGTTT	TACAACGTCG
10381	TGACTGGGAA	AACCCCTGGC	TTACCCAAC	TAATCGCCTT	GCAGCACATC	CCCCTTTCGC

10441 CAGCTGGCGT AATAGCGAAG AGGCCCGCAC CGATCGCCCT TCCCAACAGT TGC GCAGCCT
10501 GAATGGCGAA TGGCGCCTGA TGCGGTATTT TCTCCTTACG CATCTGTGCG GTATTTTACA
10561 CCGCATATGG TGCACTCTCA GTACAATCTG CTCTGATGCC GCATAGTTAA GCCAGCCCCG
10621 ACACCCGCCA ACACCCGCTG ACGCGCCCTG ACGGGCTTGT CTGCTCCCGG CATCCGCTTA
10681 CAGACAAGCT GTGACCGTCT CCGGGAGCTG CATGTGTCAG AGGTTTTCAC CGTCATCACC
10741 GAAACGCGCG A//