

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

**TESIS QUE PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN BIOTECNOLOGÍA PRESENTA LA
M. EN C. IDALIA ANALI GAMEZ ESCOBEDO**

**"INHIBICIÓN DEL GEN DE LA TREHALASA POR
TRANSGENESIS DE RNA ANTISENTIDO Y SU
EFECTO EN EL PATRÓN DE CRECIMIENTO
DE PLANTAS DE TABACO"**

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

DICIEMBRE DEL 2003

TD
Z5320
FCB
2003
.G36



1020150697



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SISTEMA DE EDUCACIÓN POSTGRADO

TESIS QUE PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN BIOTECNOLOGÍA PRESENTA LA
MAGISTER EN CIENCIAS IDALIA ANALI GAMEZ ESCOBEDO

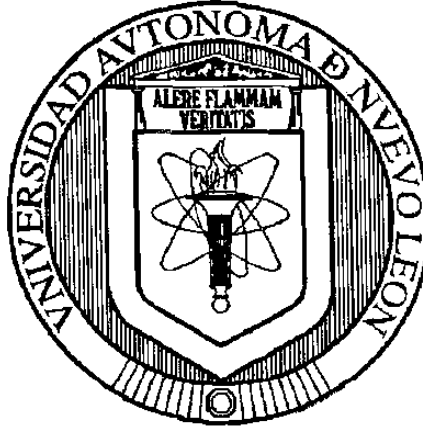
INHIBICIÓN DEL GEN DE LA TREHALASA POR
TRANSGENESIS DE RNA ANTISENTIDO Y SU
EFECTO EN EL PATRÓN DE CRECIMIENTO
DE PLANTAS DE TABACO

SAN NICOLÁS DE LOS GARZAS, N. L.
DICIEMBRE DEL 2002

9 77

TD
Z5320
F0B
20 3
.G36





Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

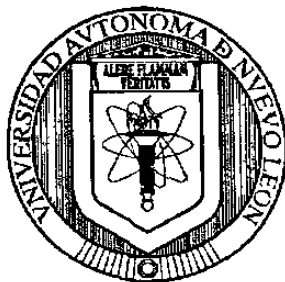
Subdirección de Postgrado

Tesis que para optar al grado de
Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología
presenta la M. en C. Idalia Analí Gámez Escobedo

**" Inhibición del gen de la trehalasa por transgénesis de RNA antisentido y
su efecto en el patrón de crecimiento de plantas de tabaco "**

San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

Diciembre del 2003



Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

Subdirección de Postgrado

Tesis que para optar al grado de
Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología
presenta la M. en C. Idalia Analí Gámez Escobedo

" Inhibición del gen de la trehalasa por transgénesis de RNA antisentido y su efecto en el patrón de crecimiento de plantas de tabaco "

COMITÉ DE TESIS

Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Presidente.-

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Secretario.-

Dr. Carlos Hernández Luna
Vocal.-

Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos
Vocal.-

Dra. Lydía Guadalupe Rivera Morales
Vocal.-

San Nicolás de los Garza, Nuevo León
Diciembre del 2003

**“Inhibición del gen de la trehalasa por transgénesis de RNA antisentido
y su efecto en el patrón de crecimiento de plantas de tabaco”**

Por

M.en C. Idalia Analí Gámez Escobedo

El presente trabajo se desarrolló en la Unidad de Manipulación Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Laboratorio de Transformación de Plantas del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados, Unidad Irapuato, bajo la asesoría del Dr. Roberto Montes de Oca Luna y el Dr. José Luis Cabrera Ponce, y la co-asesoría del Dr. Luis Rafael Herrera Estrella y el Dr. Carlos Hernández Luna.

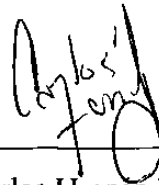
FIRMAS



Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Director Interno de Tesis

Dr. José Luis Cabrera Ponce
Director Externo de Tesis

Dr. Luis Rafael Herrera Estrella
Co-Director Externo de Tesis



Dr. Carlos Hernández Luna
Co-Director Interno de Tesis

San Nicolás de los Garza, N.L.

Diciembre del 2003

CONTENIDO

Portada	i
Comité de Tesis	ii
Dirección y localización del Trabajo	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Contenido	vii
Índice de Tablas	x
Índice de Figuras	xi
Abreviaturas y simbología	xii
RESÚMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
<i>La Alfalfa (Medicago sativa)</i>	4
Estrés abiótico y la respuesta en la expresión de genes	5
Ingeniería Genética de plantas para conferir características de importancia agronómica	5
Manipulación genética para inhibir la expresión de genes: RNA antisentido	6
Estrategias para inducir la expresión de un transgen en respuesta a estrés: el promotor rd29A	8
Regulación del metabolismo del carbono: detección, señalización y distribución	8
Trehalosa: metabolismo y función	10
Manipulación genética de la biosíntesis de trehalosa en plantas	11
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	15

MATERIALES Y MÉTODOS	16
Clonación y análisis del DNA complementario (cDNA) de la enzima trehalasa de alfalfa	17
Amplificación de la secuencia interna del cDNA de la trehalasa de alfalfa	17
Obtención del extremo 3' del cDNA de la trehalasa de alfalfa	18
Obtención del extremo 5' del cDNA de la trehalasa de alfalfa	19
Análisis estructural de la secuencia del cDNA de la trehalasa de alfalfa	20
Análisis de la expresión espacial del gen de la trehalasa de alfalfa	21
Clonación de la secuencia promotora rd29A de <i>Arabidopsis thaliana</i> en un vector de expresión en plantas	22
Amplificación de la secuencia promotora rd29A	22
Clonación del promotor rd29A en un vector de expresión en plantas	23
Clonación de la secuencia de la trehalasa en antisentido bajo el control de los promotores 35ScaMV y rd29A.	23
Amplificación de la secuencia trehalasa a utilizarse como antisentido	24
Clonación del fragmento de la secuencia trehalasa antisentido en los vectores de expresión en plantas	24
Obtención de plantas transgénicas de tabaco para las construcciones rd29:TREas y 35S:TREas, y sus respectivos controles (rd29:GUS y 35S:GUS)	
Preparación y bombardeo de micropartículas con DNA	25
Regeneración y cultivo de tejidos de plantas transformantes	26
Detección de los transgenes en las líneas transformantes.	26
Determinación de la actividad trehalasa en plantas.	27
Análisis del desarrollo, auxotrofia por sacarosa y comportamiento de azúcares de las Líneas transgénicas <i>in vitro</i> .	28
RESULTADOS	29
Clonación y análisis del DNA complementario (cDNA) de la enzima trehalasa de alfalfa	
Identificación y clonación de una secuencia conservada entre las trehalasas de plantas, a partir de alfalfa.	29
Obtención del extremo 3' del cDNA de la trehalasa de alfalfa	31

Obtención del extremo 5' del cDNA de la trehalasa de alfalfa	33
Análisis estructural de la secuencia del cDNA de la trehalasa de alfalfa	33
Análisis de la expresión espacial del gen de la trehalasa de alfalfa	35
Clonación del la secuencia promotora rd29A de <i>A. thaliana</i> y su funcionalidad en tabaco	
Amplificación y clonación del promotor rd29A de <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
Clonación del promotor rd29A de <i>A. thaliana</i> en un vector de expresión en plantas	38
Clonación del cDNA de la trehalasa en antisentido bajo el control del promotor rd29A (rd29A:TREas) y del promotor 35S CaMV (35S:TREas)	39
Obtención de plantas transgénicas de tabaco para las construcciones rd29A:TreAS y 35S:TreAS, y sus respectivos controles (rd29A:GUS y 35S:GUS)	41
Determinación de le presencia del transgen en las plantas transgénicas	42
Determinación de la actividad trehalasa en plantas	42
Análisis del desarrollo, auxotrofia por sacarosa y comportamiento de azúcares de las líneas transgénicas in vitro.	44
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXO I. MAPAS	67
ANEXO II. SECUENCIAS	80
ANEXO III. PROTOCOLOS	81

RESÚMEN

El desarrollo de variedades de cultivos agrícolas con una mejor capacidad de autodefensa a condiciones ambientales adversas y una mayor producción son algunos de los objetivos de la tecnología de manipulación genética de plantas. A mediados de los 90, se dio inicio a la obtención de plantas tolerantes a sequía, basados en incrementar por medio Ingeniería Genética la concentración del azúcar trehalosa, conocida como uno de los mejores osmoprotectores en la naturaleza. Actualmente la importancia de este azúcar es doble, ya que además de su capacidad de inducir tolerancia a estrés, también incrementa la capacidad fotosintética de la planta. Debido a que la actividad trehalasa endógena ha limitado los intentos por controlar esta ruta mediante transgénesis de plantas, en nuestro proyecto establecimos que al inhibir dicha actividad por medio de un antisentido para dicha enzima, el incremento de trehalosa provocado por ello, conduciría a los fenotipos reportados relacionados con un incremento en la productividad y la tolerancia a sequía.

Dirigiendo como punto final nuestra estrategia al cultivo de la alfalfa, clonamos la secuencia de su enzima trehalasa. En base a la homología entre otras trehalasas, se amplificó por PCR una región conservada a partir de la cual se obtuvo el cDNA completo mediante los protocolos de 3'RACE y GeneRacer. La caracterización de la misma por secuenciación, indica que el gen codifica para una proteína de 553 aminoácidos, con mayor homología a la secuencia de soya. A partir de este cDNA diseñamos una estrategia de inhibición por RNA antisentido que se probó en un modelo de tabaco. Las líneas transformantes obtenidas por biobalística, además de presentar una disminución promedio de 50% en su actividad de trehalasa, tuvieron también un mejor comportamiento en desarrollo y vigorosidad *in vitro*, aún en medio carente de sacarosa como fuente de carbono, lo cual indica una mejor capacidad fotosintética en estas plantas. Las líneas transgénicas control, fueron incapaces de desarrollarse normalmente y permanecer en medio carente de sacarosa. Las plantas con el antisentido, mostraron también un patrón diferente del comportamiento de azúcares, acumulando un exceso de glucosa, a diferencia de las plantas control. Estos resultados de incremento en la capacidad de desarrollo y la anulación de auxotrofia por sacarosa *in vitro*, nos indican que la inhibición de la enzima de tabaco con la secuencia de alfalfa es exitosa para la obtención de fenotipos mejorados en crecimiento y desarrollo. Además, representa una tecnología potencial para la selección de plantas transgénicas *in vitro*.