

Raíces Transformadas de Brócoli con el Gen I1 del HPV y Efecto de IAA/KIN sobre el Crecimiento de Raíces Transgénicas

Acerca de los autores...

^a Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, y

^b Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

^c Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. División Ingeniería Bioquímica, Posgrado en Ingeniería Bioquímica.

Juan Manuel Jiménez Antaño^a, María del Carmen Montes Horcasitas^a, Emma Gloria Ramos Ramírez^a, Fernando José Esparza García^a, Armando Ariza Castolo^b, Josefina Pérez Vargas^c, Octavio Gómez Guzmán^a, Graciano Calva Calva^a



Resumen

En este trabajo se presentan los resultados de la transformación de raíces de brócoli con el gen *L1* del HPV16; la comprobación de la transformación se llevó a cabo mediante tinción histoquímica con la prueba de β -glucuronidasa donde la coloración azul indicó el resultado positivo de la integración del gen *L1* al genoma de las raíces y este resultado se complementó por amplificación por PCR del gen *L1* en donde obtuvimos la banda del tamaño esperado de 1.6 kb. También evaluamos el efecto de los reguladores ácido indol acético (IAA) y cinetina (Kin) sobre el crecimiento de raíces transformadas con pCAMBIA 1105, encontrando que se obtuvo un incremento de biomasa de raíces con base en el peso fresco y seco a concentraciones de 1 mg/L de IAA, y que el Kin disminuye el crecimiento hasta inhibirlo a 1 mg/L. En el análisis cuantitativo encontramos que el IAA a 1 mg/L incrementa el crecimiento cuatro veces, mientras que el crecimiento con Kin fue dos veces menor, comparado con el control de las que fueron raíces en medio sin reguladores de crecimiento.

Introducción

La biotecnología vegetal, particularmente el cultivo de raíces transformadas, es una alternativa viable para la producción de proteínas heterólogas [1]. Estas raíces son genéticamente estables y pueden propagarse indefinidamente en cultivos *in vitro* a nivel de matríz o biorreactores o regenerarse a plantas completas. No obstante, en los sistemas *in vitro* se puede manipular más fácilmente la composición del medio de cultivo para estudiar el efecto de los parámetros nutricionales y de proceso sobre la acumulación del producto transgénico [2]. Así, en este trabajo, se pretende mostrar el uso de cultivos de raíces transformadas de *Brassica oleracea* como modelo de expresión de la proteína L1 del virus del papiloma humano 16 (VPH16). Esta planta presenta ciclos de vida cortos, es fácil de manipular y cultivar *in vitro*. El HPV16 es el causante principal del cáncer cervicouterino en México [3]. La proteína L1 es el componente principal y antigénico de su cápside [4-6] y tiene la capacidad de autoensamblarse en cápsides vacías, conocidas como partículas semejantes a virus (VLPs). Por estas propiedades antigénicas se han desarrollado vacunas usando sistemas de expresión como levaduras, virus-células de insecto, y plantas completas.

Con la finalidad de establecer un método de producción alternativo, en estudios previos hemos reportado el establecimiento de cultivos de raíces transformadas con el gen *L1*. Al respecto se reportan los resultados del efecto de varios reguladores del crecimiento vegetal sobre el crecimiento y la generación de líneas transformadas con el gen *L1* pero truncado en la señal de localización nuclear presente en el gen silvestre completo, porque se ha reportado que de esta forma se aumenta la eficiencia de formación de VLP *in vitro* [7]. Se modificó el medio de cultivo para buscar promover la elongación celular mediante auxinas (IAA) [8] y la división celular con citocininas (Kin).

Metodología

Construcción del plásmido pCAMHPV16L1

Se obtuvo mediante la clonación del gen *L1* completo en pCAMBIA 1105.1. Se amplificó el gen *L1* y después se digirió con NcoI y BglIII. Con estas mismas enzimas se cortó al plásmido pCAMBIA 1105.1 obteniéndose así sitios cohesivos complementarios; después se realizó la ligación de *L1* en pCAMBIA.

Estas construcciones se clonaron en *Agrobacterium rhizogenes* mediante electroporación que después se utilizó para la transformación de plántulas de brócoli.

Ensayo de β -glucuronidasa

Cortes de raíces de 1 cm se colocan en tubos Eppendorf de 600 Ql conteniendo 250 Ql de solución de tñido GUS (100 mM de fosfato de sodio pH 7, 10mM EDTA pH 8, 0.1% Tritón X-100, 2 mM X-Gluc). Los tubos abiertos se colocaron en un desecador al vacío por 10 minutos; en seguida se liberó lentamente el vacío y se repitió el proceso dos veces más. Después de los ciclos de infiltración, los tubos se incubaron por 10 horas a 37 °C.

Evaluación del efecto de IAA y Kin

Se realizó un diseño experimental factorial 2⁴ (tabla I) con dos factores a cuatro niveles, siendo los factores el ácido indol acético (IAA) y la citocinina (Kin) a las concentraciones de 0, 0.05, 0.25, y 1.0 mg/L. El experimento se realizó empleando explantes de raíces de 1 cm en medio MS con 3% de sacarosa. Las variables de respuesta para la producción de biomasa fueron peso fresco y peso seco.

Medio MS (3% sacarosa, 1.8 g/L fitagel)		IAA (Auxina) mg/L			
		0	0.05	0.25	1.0
Kin (CITOCINA) mg/L	0	1	2	3	4
	0.05	5	6	7	8
	0.25	9	10	11	12
	1.0	13	14	15	16

Resultados

Establecimiento de raíces transformadas y confirmación de transformación

Se han obtenido líneas de raíces de brócoli transformadas con el gen *ll* completo (Figura 1). Mediante el ensayo de β -glucuronidasa se confirmó que *Agrobacterium rhizogenes* transfirió exitosamente el T-DNA del plásmido pCAMBIA con el gen *ll* por la observación de la coloración azul en las líneas de raíces probadas en concordancia con el control positivo de raíces transformadas con pCAMBIA y en contraste con el control negativo de raíces no transformadas (Figura 1), resultados similares a los de [9, 10]. También

Tabla 1

Diseño experimental para evaluar las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento

la transformación se comprobó por la amplificación del gen *II* usando como templado DNA genómico de raíces transformadas, obteniendo la banda del tamaño esperado de 1.6 kb (Figura 1-B carril 1), la cual fue similar al tamaño de la banda del control positivo (Figura 1-B carril 2) en el que se utilizó DNA plasmídico como templado de una construcción previamente caracterizada, y como control se utilizó amplificación de DNA genómico de raíces no transformadas (Figura 1-B carril 3)

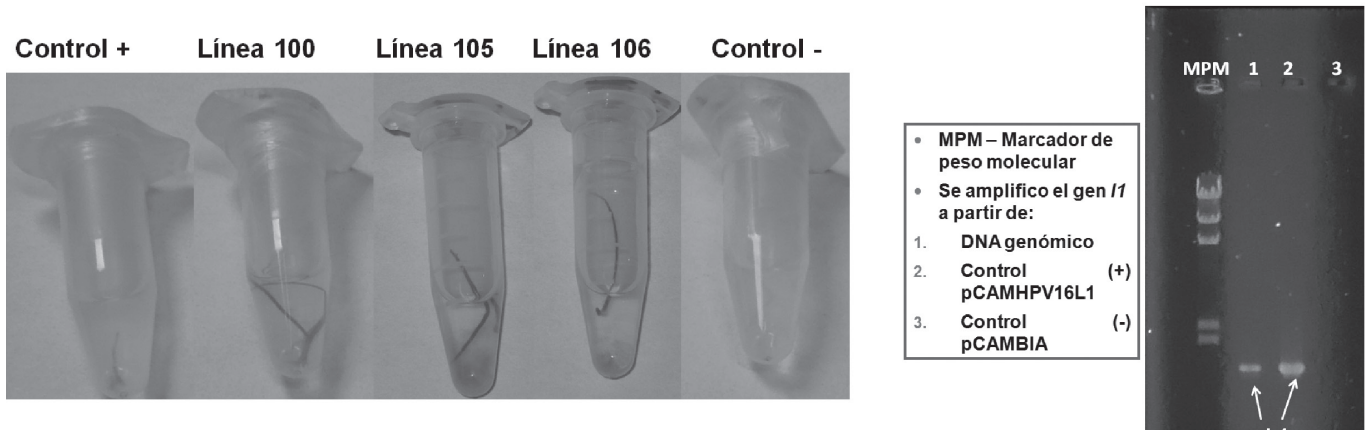


Figura 1

Prueba de β -glucuronidasa A). Se obtuvieron líneas de raíces transformadas con el gen *II* completo (100, 105 y 106) positivas a la tinción histoquímica de β -glucuronidasa el resultado positivo similar al control que son raíces transformadas con pCAMBIA y en contraste con el control negativo que son raíces no transformadas. La transformación también se comprobó por la amplificación del gen *II* B) carril 1



Efecto de IAA/Kin sobre el crecimiento de las raíces transformadas

Después de tres semanas de cultivo (Figura 2) se encontró que el mejor tratamiento para el crecimiento de raíces fue el 4 con 1 mg/L de IAA y 0 mg/L de Kin. Debe observarse que mientras 1 mg/L de IAA favorece el incremento, con 0.25 mg/L de Kin se disminuye, y con 1 mg/L se inhibe completamente.

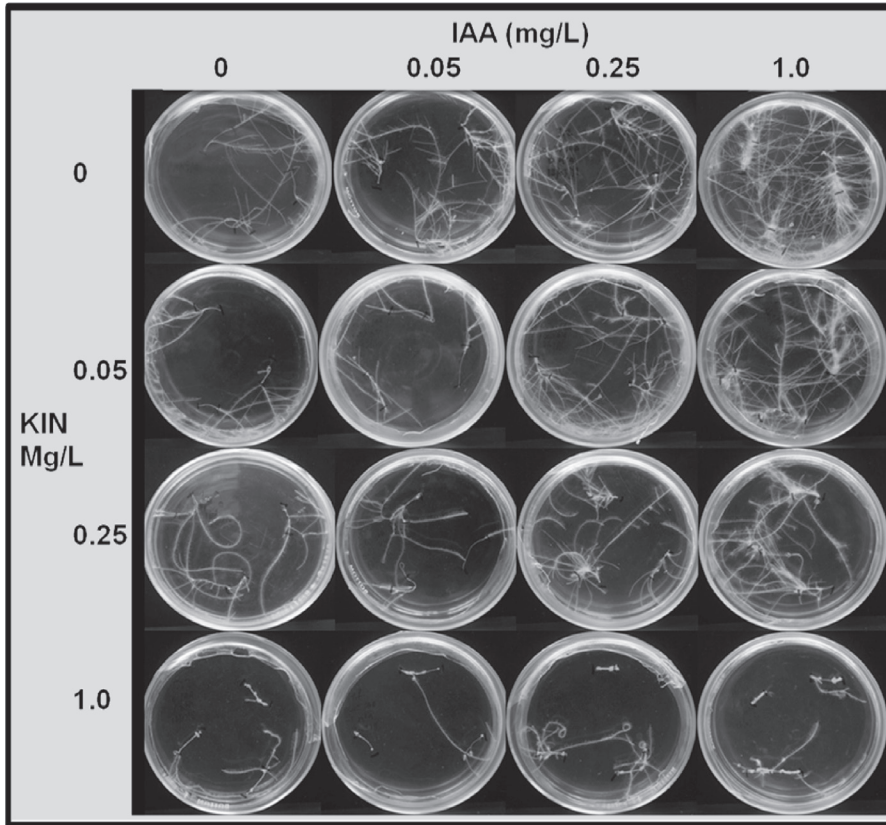


Figura 2

Efecto de reguladores de crecimiento. El tratamiento con 1 mg/L de IAA fue donde se observó una mayor elongación y ramificación de raíces transformadas.

Análisis cuantitativo del efecto de los reguladores de crecimiento

En el análisis de varianza empleando como variables de respuesta el peso fresco y el peso seco, con un nivel de confianza de 95%, se encontró que los valores para IAA, Kin y la interacción de IAA con Kin son significativos.

El análisis de peso fresco demostró que en la medida que se aumenta la concentración de IAA se incrementa la cantidad de biomasa, hasta obtener un valor cuatro veces mayor al control, al utilizar la máxima concentración de IAA que fue de 1 mg/L, mientras que en la medida que se incrementa la concentración de Kin, la cantidad de biomasa disminuye hasta dos veces menos que el control en la máxima concentración de 1 mg/L

Los tratamientos con mayor producción de biomasa fueron los que se encontraban en la región de las concentraciones mayores de IAA (Figuras 3 y 4) mientras que los tratamientos con las concentraciones más altas de Kin fue en los que hubo poco crecimiento o su inhibición.

Figura 3

Gráfica de dispersión de peso fresco. La mayor producción de biomasa está en las concentraciones más altas de IAA, y las concentraciones altas de Kin inhiben el crecimiento de las raíces.

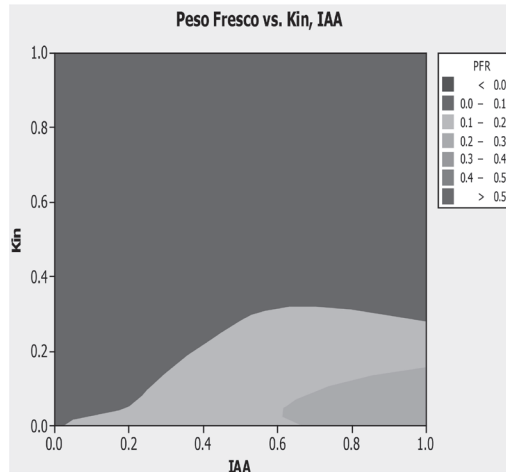
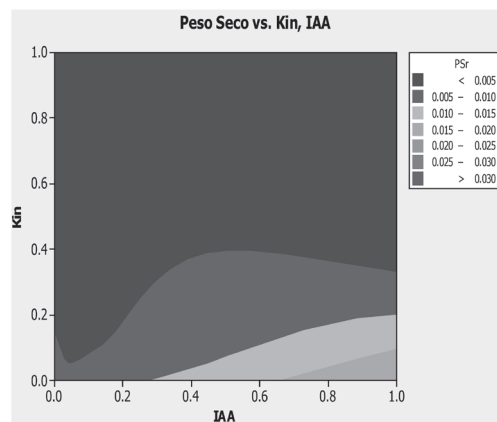


Figura 4

Gráfica de dispersión de peso seco. Se observó el mismo efecto que en el peso fresco, un mejor crecimiento con IAA e inhibición con valores altos para Kin.



Conclusiones

Se obtuvieron líneas de raíces transformadas de brócoli con pCAMBIA 1105.1 y con la construcción pCAMHPV16L1, demostrado mediante la tinción histoquímica de glucuronidasa y por amplificación por PCR del gen *l1*.

Los reguladores de crecimiento afectan la producción de biomasa de raíces transformadas; la utilización de IAA a una concentración de 1 mg/L favorece el incremento de biomasa y las concentraciones utilizadas de Kin disminuyen e inhiben el crecimiento.

Referencias

Sunil Kumar, G.B., et al., "Expression of hepatitis B surface antigen in potato hairy roots". *Plant Science*, 2006. 170(5): p. 918-925.

Wu, C.H., et al., "Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*". *Journal of Plant Biology*, 2006. 49(3): p. 193-199.

Rodríguez, O., et al., "Estudio de la patología citológica del cérvix". *Perinatal Reprod Hum*, 2009. 23(1): p. 12-17.

Ishii, Y., K. Tanaka, and T. Kanda, "Mutational analysis of human papillomavirus type 16 major capsid protein L1: the cysteines affecting the intermolecular bonding and structure of L1-capsids". *Virology*, 2003. 308(1): p. 128-136.

Garcea, R.L. and X. Chen, *5 Papillomavirus Structure and Assembly*, 2007. p. 69-88.

Chen, X.S., et al., Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J. Mol. Biol.*, 2001. 307(1): p. 173-182.

Webb, E., J. Cox, and S. Edwards, "Cervical Cancer-causing Human Papillomaviruses

have an Alternative Initiation Site for the L1 Protein". *Virus Genes*, 2005. 30(1): p. 31-35.

George, E.F., M.A. Hall, and G.-J.D. Klerk, *Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors, in Plant Propagation by Tissue Culture*, E.F. George, M.A. Hall, and G.-J.D. Klerk, Editors. 2008, Springer Netherlands. p. 175-204.

Jefferson, R., "Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system". *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1987. 5(4): p. 387-405.

Karcher, S., "Blue Plants: Transgenic Plants With The Gus Reporter Gene". *ABLE*, 2002. 23: p. 29-42.



GOBIERNO DEL
ESTADO DE MÉXICO



GENTE QUE TRABAJA Y LOGRA
enGRANDE

