



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA APLICADA



**GENERACIÓN DE UN SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN PARA LOS
MUSGOS *Bryum billarderi* SCHWÄGR Y *Pseudocrossidium
replicatum* (Taylor) R. H. ZANDER**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

PRESENTA:

FRET CERVANTES DÍAZ

DIRECTOR:

DR. MIGUEL ÁNGEL VILLALOBOS LÓPEZ

CO-DIRECTOR:

DR. ÁNGEL ARTURO GUEVARA GARCÍA

TEPETITLA DE LARDIZABAL, TLAX., ENERO DE 2012

RESUMEN

Los musgos *B. billarderi* and *P. replicatum* son especies de plantas que pueden tolerar la desecación, la salinidad y otros estreses abióticos. En este trabajo desarrollamos una estrategia para la transformación de estos musgos, con el propósito de desarrollar una tecnología que permita entender los mecanismos que les confieren esa tolerancia y explorar la oportunidad de producir proteínas recombinantes. Primero, generamos las condiciones para obtener y regenerar protoplastos a partir de tejido protonemal de ambas especies. En este punto, tuvimos que evaluar el efecto de diferentes concentraciones de driselasa (1, 2 y 3 %), tiempos de exposición (1, 1.5 y 2 horas) y la edad del protonema (5, 10 y 15 días) sobre el aislamiento y regeneración de los protoplastos únicamente de *B. billarderi*, debido a que tuvimos una gran variación en la cantidad de protoplastos obtenidos en esta especie (from 2.45×10^5 to 2.6×10^6 protoplastos ml^{-1}) y en *P. replicatum* siempre obtuvimos una gran cantidad de protoplastos (from 2.05×10^6 to 2.54×10^7 protoplastos ml^{-1}), por lo que no fue necesario realizar ese ensayo en este musgo. El mejor tratamiento para obtener protoplastos (5.35×10^6 protoplasts g^{-1}) fue: 10 días de edad, 2 % de concentración y 2 horas de exposición; sin embargo, la mejor tasa de regeneración (72.08 %) fue encontrada en: edad 5 días, 2 % de concentración y 1 hora de exposición. Segundo, usamos el plásmido pPGX8 para transformar ambas especies de musgos y el musgo modelo *P. patens* para comparar nuestros resultados. Colonias resistentes al antibiótico transitorias fueron recuperadas en una alta eficiencia de transformación (82 colonias μg^{-1} DNA linearizado) en el musgo *B. billarderi* obteniendo aproximadamente 1640 colonias por evento de transformación; sin embargo, solo obtuvimos 2 colonias resistentes al antibiótico transitorias en el musgo *P. replicatum*. Comparativamente, obtuvimos menos colonias resistentes al antibiótico transitorias en *P. patens* (4.66 colonias μg^{-1} DNA linearizado) que en *B. billarderi*; sin embargo, sólo obtuvimos líneas estables en *P. patens*. El plásmido pPGX8 fue construido para transformar *P. patens*, debido a que posee regiones homologas al genoma de este musgo, quizá por esta razón no obtuvimos líneas estables en *B. billarderi* y *P. replicatum*. Tercero, generamos la construcción pPGX8::CD43 para explorar la producción de la proteína humana CD43 en las

tres especies de musgos. Obtuvimos clonas únicamente de *B. billarderi* y *P. patens* usando la construcción pPGX8::CD43, pero todas las clonas de *B. billarderi* murieron después de un periodo de tiempo; sin embargo, obtuvimos 10 clonas de *P. patens*, de las cuales 4 fueron analizadas mediante PCR obteniendo que en todos los casos fue observada una banda correspondiente a CD43.

ABSTRACT

The mosses *B. billarderi* and *P. replicatum* are species of plants that can tolerate desiccation, salt and other abiotic stresses. In this work, we established a strategy to transform these mosses, with the purpose of developing a technology that allows to understand the mechanisms that confer that tolerance and to explore the opportunity to produce recombinant proteins. First, we developed the conditions to obtain and regenerate the protoplasts from protonema tissues of both species. At this point in *B. billarderi*, we evaluated the effect of different driselase concentrations (1, 2 and 3 %), exposure times (1, 1.5 and 2 hours) and protonema age (5, 10 and 15 days) on the amount of protoplast isolated and regenerated, this was done only in *B. billarderi* because we had a large variation in the yield of protoplasts obtained in this specie (from 2.45×10^5 to 2.6×10^6 protoplastos ml^{-1}) whereas in *P. replicatum* we obtained always a great yield of protoplasts (from 2.05×10^6 to 2.54×10^7 protoplastos ml^{-1}), so it wasn't necessary to make that assay in this moss. The best treatment to obtain protoplasts (5.35×10^6 protoplasts g^{-1}) was: age 10 days, concentration 2 % and exposition 2 hours; however, the best regeneration rate (72.08 %) was found at: age 5 days, concentration 2 % and exposition 1 hour. Second, we used the plasmid pPGX8 to transform both species of mosses and the model moss *P. patens* to compare our results. Transient antibiotic resistant colonies were recovered at high transformation efficiency (82 colonies μg^{-1} linearized DNA) in the moss *B. billarderi*, yielding approximately 1640 colonies per genetic transformation event; however, we have only obtained two transient antibiotic resistant colonies in the moss *P. replicatum*. Comparatively, we obtained less transient antibiotic resistant colonies in *P. patens* (4.66 colonies μg^{-1} linearized DNA) than in *B. billarderi*; nevertheless, we only obtained stable lines in *P. patens*. The plasmid pPGX8 was made to transform *P. patens*, because it has homologues regions at the genome of this moss, maybe for this reason we didn't obtain stables lines in *B. billarderi* and *P. replicatum*. Third, we generated the construction pPGX8::CD43 to explore the production of the human protein CD43 in the three species of mosses. We obtained clones only in *B. billarderi* and *P. patens* using the construction pPGX8::CD43, but all clones of *B. billarderi* died after a period of

time; however, we obtained 10 stable clones of *P. patens*, of which 4 were analyzed by PCR obtaining that in all cases it was observed a band correspondent to CD43.