

Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de suspensiones celulares embriogénicas del cultivar híbrido de plátano FHIA 21(AAAB)

Borys Chong*, Dion Daniels, Rafael Gómez Kosky, Idalmis Bermúdez, Maritza Reyes, Bárbara Ocaña. * Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, C.P. 54830, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. Fax: (53-42) 281329, Tel: (53-42) 281693, 281257. e-mail: borys_chong@yahoo.es

RESUMEN

El mejoramiento genético de plátanos y bananos es de gran importancia por el nivel de consumo de estos en el ámbito mundial. La transformación genética constituye una vía alternativa para el mejoramiento genético y ha venido a complementar las metodologías tradicionales. En este trabajo se estudian mediante la expresión transitoria de la β -glucuronidasa algunos parámetros de la transformación genética de plátano cultivar híbrido FHIA-21 mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Se hace un estudio de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* AT-2260 y EHA-105, ambas con el plásmido pCambia-3301. Se realizó una comparación entre los tiempos de infección y tiempos de cocultivo. La cepa de mejor comportamiento fue la EHA-105. En el estudio de el tiempo de infección y de cocultivo la mejor combinación resultó ser la de dos horas de infección y seis días de cocultivo.

Palabras clave: At-2260, EHA-105, β -glucuronidasa, *Musa*

ABSTRACT

The genetic improvement of plantain and banana is of great importance for its level of consumption on a world-wide scale. Genetic transformation constitutes one alternative for genetic improvement and has complemented traditional techniques. In this work some parameters of genetic transformation of plantain were studied by means of transient expression of β -glucuronidase in the hybrid cultivar FHIA-21(AAAB) by *Agrobacterium tumefaciens*. A study with the β -*Agrobacterium tumefaciens* strains AT-2260 and EHA-105, both with the plasmid pCambia-3301 was done. A comparison between the time of infection and time of co-culture was studied. The strain of better behavior was EHA-105. In the study of the time of infection and co-culture, the best combination resulted to be the one with two hours of infection and six days of co-culture.

Key words: At-2260, EHA-105, β -glucuronidase, *Musa*

INTRODUCCIÓN

La producción mundial de bananos y plátanos (*Musa* spp.) se estima alrededor de 95.1 millones de toneladas anuales (FAO, 2000). Estos son los cultivos de más importancia en los países del trópico y subtropico, porque además de alimento, suministran empleo e ingreso a los miembros de estas comunidades. Hasta la fecha los programas de mejoramiento genético tradicionales se ven limitados debido a la baja fertilidad y la poca germinación de la semilla (Grapin 1995). Estas dificultades pueden superarse desarrollando alternativas de mejoramiento por medio de la biotecnología y la ingeniería genética. Mediante las técnicas de ingeniería genética se pueden introducir genes que mejoren las características agronómicas de esta especie.

Este trabajo tuvo como objetivo optimizar algunos parámetros de la transformación genética de plátano cultivar híbrido FHIA-21

mediante *Agrobacterium tumefaciens* estudiando la expresión del gen *gusA* en suspensiones celulares embriogénicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y medios de cultivo

Para la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* se emplearon suspensiones celulares de *Musa* spp., cv FHIA-21 (AAAB) obtenidas de estructuras embriogénicas originadas a partir de callos formados de fascículos nodales provenientes de flores masculinas inmaduras, en el medio de cultivo propuesto por Escalant *et al.* (1994).

Para establecer la metodología de transformación se utilizaron 150 μ l de células a una concentración del 33% de volumen de células sedimentadas (VCS). Las suspensiones tenían diez días de subcultivadas y se encontraban a 27°C de

temperatura, oscuridad y una velocidad de agitación de 90 rpm.

Cepas bacterianas y plásmido

En el experimento se utilizaron las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* AT-2260 y EHA-105 portando el plásmido pCAMBIA 3301, el cual contiene el gen *bar* (Thompson *et al.*, 1987) que codifica para la enzima fosfinotricina N-acetil transferasa que confiere resistencia a los herbicidas que contengan fosfinotricina como producto activo. Este gen se encuentra regulado por el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) y el terminador 35S poliadenilado del mismo virus y el gen reportero *gusA* (Jefferson *et al.*, 1987) que codifica para la enzima β -glucuronidasa y está regulado por el mismo promotor del gen *bar* y por la secuencia terminadora T-NOS poliadenilada de la enzima nopalina sintetasa de *Agrobacterium*.

Transformación de suspensiones celulares

Un primer experimento tuvo como objetivo determinar con que cepa de *Agrobacterium tumefaciens* y a qué densidad óptica (DO_{600}) se obtenía la mayor actividad transitoria de la enzima β -glucuronidasa. Para esto se probaron las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* AT-2260 y EHA-105.

Los cultivos bacterianos fueron previamente crecidos en medio de cultivo LB (10 g.l⁻¹ de triptona, 5 g.l⁻¹ de extracto de levadura, 10 g.l⁻¹ NaCl) durante 24 horas. Posteriormente se pasaron al medio de inducción (sales AB 1X, 2mM NaH₂PO₄, 30 mM MES, glucosa 1%, 200 iM acetosiringona). Se estudiaron dos densidades ópticas ($DO_{600}=0,5$ y $DO_{600}=1,0$) para cada cepa.

En un segundo experimento se estudió el tiempo de infección. Para ello se dejaron las cepas bacterianas infestando las células vegetales durante dos y seis horas, transcurrido estos tiempos las mismas se colocaron en medio de cultivo semisólido para el crecimiento celular suplementado con acetosiringona 200 iM.

Se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* con la que mejor resultado se obtuvo en el primer experimento.

Se realizó un tercer experimento en el cual se estudiaron dos tiempos de cocultivo en presencia de la cepa bacteriana.

Para esto se dejaron las células vegetales durante tres y seis días en medio de cultivo semisólido, oscuridad y 21°C.

A los datos obtenidos se le aplicó un análisis de varianza de clasificación simple y el grado de significación fue determinado mediante el test de rango múltiples de Duncan.

Para el procesamiento de los datos se empleó el paquete estadístico SPSS ver. 9.0.

Actividad transitoria GUS

El ensayo histoquímico GUS fue realizado acorde al protocolo propuesto por Jefferson (1987). La actividad GUS fue analizada después del cocultivo y luego de una incubación a 37 °C en la oscuridad durante 12-14 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia de puntos azules mostró la inserción y expresión del gen *gusA* en las células de plátano cultivar híbrido FHIA-21. El número de puntos azules varió considerablemente entre los tratamientos realizados.

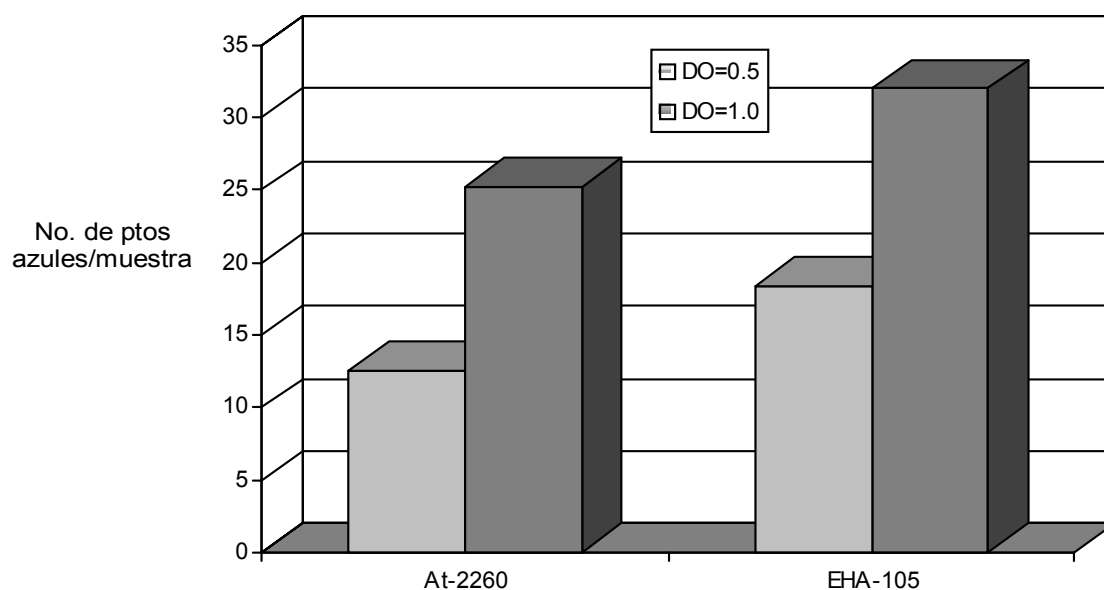
En el primer experimento los mejores resultados se obtuvieron con la cepa EHA-105 y densidad óptica $DO_{600}=1,0$ donde se visualizaron 32 puntos azules como promedio por cada 150 μ l de células al 33% de VCS (Figura 1).

Esta cepa es una derivada de la EHA-101 sin el gen de resistencia a kanamicina. Pérez (2000) refirió que la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA-101 fue la que mejor afinidad mostró con células de varios cultivares de banano durante experimentos de quimiotaxis y expresión transitoria de la β -glucuronidasa.

En el segundo experimento se utilizó la cepa EHA-105, en este no se observaron diferencias significativas entre los tiempos de infección utilizados (Figura 2).

En el tercer experimento se observó una diferencia marcada entre los dos tratamientos. El tiempo de cocultivo influyó notablemente en la expresión transitoria de la β -glucuronidasa, obteniéndose 85 puntos azules como promedio por cada 150 μ l de células al 33% de VCS cuando se dejó el cocultivo por seis días (Figura 3).

Las condiciones óptimas de cocultivo impidieron el crecimiento excesivo de la bacteria en los tiempos evaluados, por lo que no se afectaron las células vegetales. Al estar en contacto la bacteria un mayor tiempo con el tejido vegetal, hubo una mayor transferencia de ADN a las células y por consiguiente una mayor expresión del gen *gusA*.



Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente por Duncan para $p < 0.05$.

Figura 1. Comparación de la expresión transitoria después de tres días de cocultivo con las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* -- AT-2260 y EHA-105 y las densidades ópticas de estas de 0.5 y 1.0 en suspensiones celulares embriogénicas de plátano cultivar híbrido FHIA-21

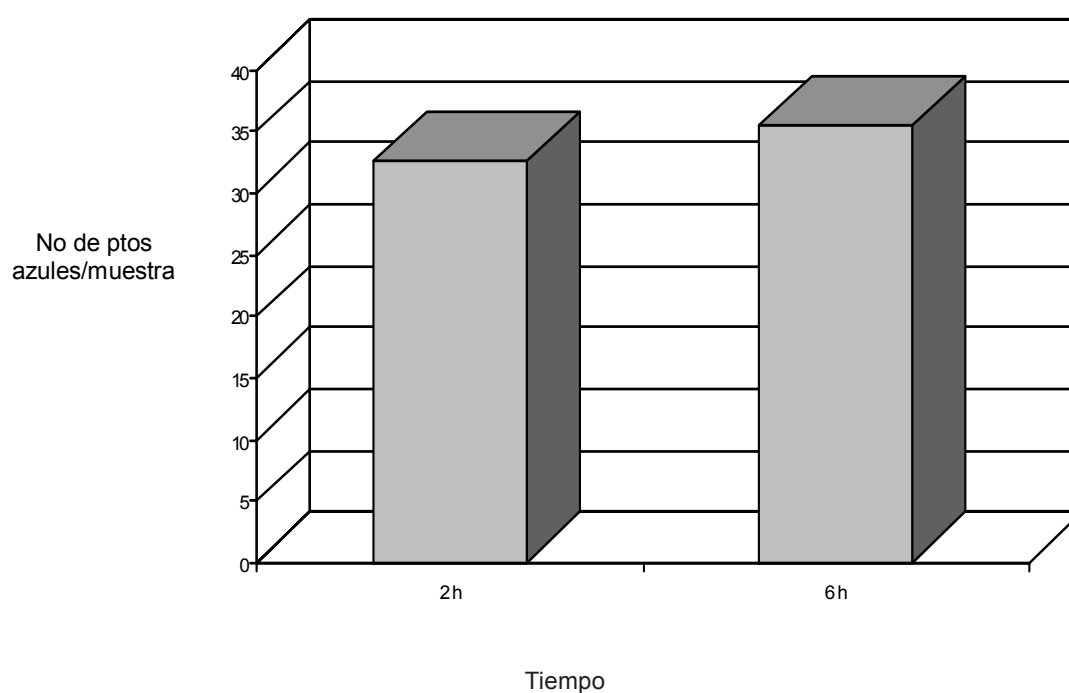
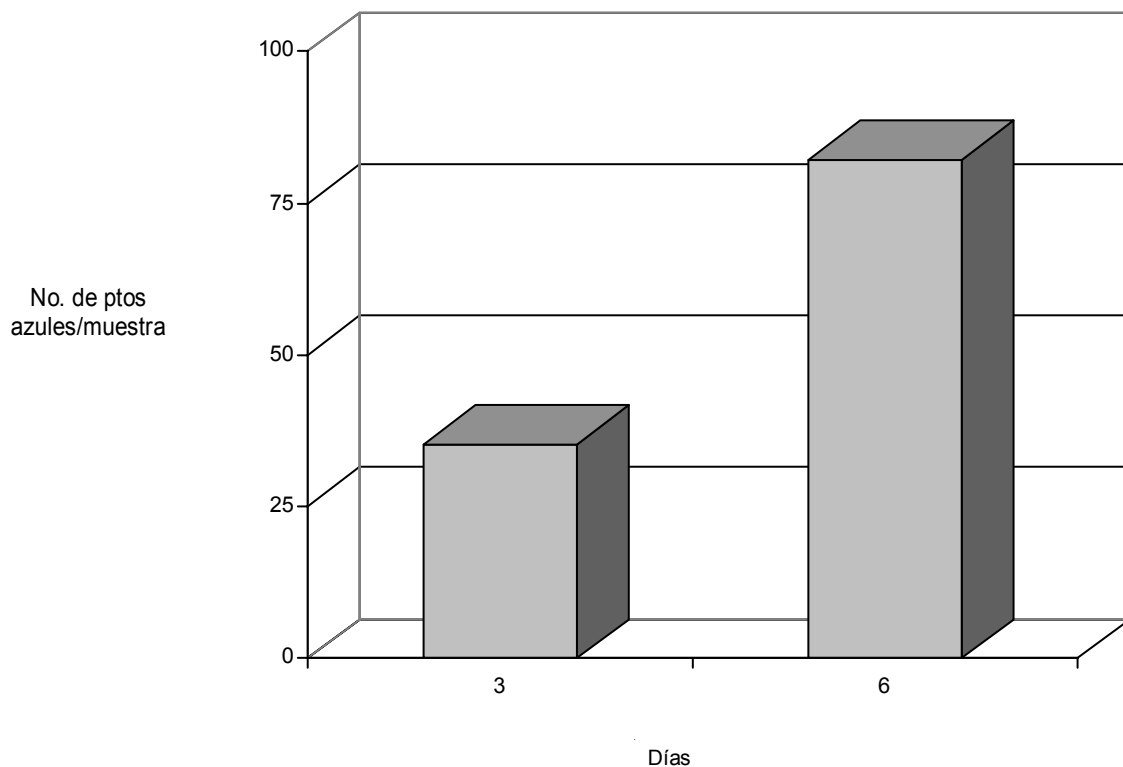


Figura 2. Influencia de los tiempos de infección con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA-105 sobre el número de puntos azules en suspensiones celulares embriogénicas de FHIA-21 después de tres días de cocultivo.



Letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$

Figura 3. Influencia de los tiempos de cocultivo con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA-105 sobre el número de puntos azules en suspensiones celulares embriogénicas de FHIA-21.

REFERENCIAS

Bieberach, C (1995) Embriogénesis somática y regeneración de plantas en cultivares de *Musa* spp. Tesis presentada en opción al grado científico de *Magister Scientiae*. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 86p

Escalant JV, Teisson, C y Cote, F (1994) Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro Cell Dev. Biol* 30:181-186

Jefferson RA 1987. Assaying chimeric genes in plants: The Gus gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5: 387-405

Jefferson, A, Kavavagh, A, y Bevan, M, (1987) GUS fusion: b-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6: 3901-3907

Pérez JB (2000) Development and application of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation to increase fungus-resistance in banana (*Musa* spp.). Doctoraatsproefschrift Nr. 442 aan de Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen van de K.U. Leuven

Thompson, C, Movva, R, Tizard, R, Cramer, i R, Davies, J, Lauwereys, M y Bottermann J (1987) Characterization of the herbicide resistance gene *bar* from *Streptomyces higroscopicus*. *EMBO J.* 9: 2519- 2523