

## Expresión transitoria de la $\beta$ -glucuronidasa en suspensiones celulares del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (AAAB)

Dion Daniels\*, Rafael Gómez Kosky, Boris Chong, Leticia Mas, Idalmis Bermúdez, Bárbara Ocaña Díaz, Maritza Reyes Vega, Carlos Pereira Marín. \*Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 $\frac{1}{2}$ . CP 54830. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: dion.daniels@belizemail.net

### RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de estudiar algunos parámetros que influyen en la expresión transitoria de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa en suspensiones celulares del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB). Se realizaron estudios de tres distancias y cuatro presiones de disparo. Los resultados en este experimento revelaron la importancia de la distancia y presión del bombardeo, siendo la más efectiva 12 cm y 140 psi, respectivamente con diferencia estadística con los demás tratamientos. También se estudiaron diferentes plásmidos y quedó demostrado que no todos se comportan de la misma manera. Los plásmidos bajo el control del promotor de la poliubiquitina del maíz mostraron mejores eficiencias que el promotor 35S CaMV. El factor biológico también fue de mucha importancia. Se confirmó que la edad fisiológica de las suspensiones celulares juega un papel fundamental en la eficiencia de la transformación con mejores resultados cuando se usaron suspensiones celulares de cinco a diez días después del subcultivo.

Palabras clave: micropartículas, *Musa* sp., pistola de genes, transformación genética

### ABSTRACT

This work was carried out with the objective of studying parameters that influence transient expression of the enzyme  $\beta$ -glucuronidase in cell suspensions of the plantain hybrid cultivar 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB). Studies were done with three distances and four pressures. Results of this experiment revealed the importance of the distance and pressure of bombardment, with the most effective being 12 cm and 140 psi respectively with statistical difference to the other treatments. Different plasmid constructs were also studied and it was demonstrated that they didn't have the same tendencies. The plasmid constructs under the control of the maize polyubiquitin promoter showed better efficiencies than the CaMV 35S promoter. The biological factor is also of great importance. The physiological age of the cell suspensions confirmed its fundamental role in transformation efficiencies with the best results obtained when cell suspensions of five to ten days after subculture were used.

Key words: gene gun, genetic transformation, microparticles, *Musa* sp.

### INTRODUCCIÓN

El plátano (*Musa* spp.) está entre los cultivos más importantes en los países del trópico y el subtropical. Junto a los bananos, constituye el cuarto lugar más importante a escala mundial después del arroz, trigo y maíz. La producción mundial de plátano en el año 2001 fue de 30.5 millones de toneladas (FAO, 2001). Las regiones de producción de plátano más grande en el mundo son África y América Latina, las cuales representan 74.2% y 22.5% de la producción mundial respectivamente, seguido por Asia con 3.3% (Rodríguez y Rodríguez, 2001).

El mejoramiento genético en el género *Musa*, utilizando métodos tradicionales, se ha visto obstaculizado por varios factores, entre ellos: la baja fertilidad, la esterilidad, los niveles de ploidía y la falta de variabilidad genética que muestran sus especies (May *et al.*, 1995); además del tiempo que se necesita para obtener clones mejorados por esta vía. Los métodos tradicionales no

cuentan con la facilidad de transferir características de resistencia a la planta.

La transformación genética es una estrategia potencial para desarrollar nuevos cultivares en un período de tiempo relativamente corto. Una ventaja de esta estrategia sobre el mejoramiento convencional se encuentra en la disponibilidad de fuentes de variabilidad genética. Mientras que los mejoradores convencionales están limitados a genes que existen en especies compatibles sexualmente, esta barrera no existe para la transformación genética (May *et al.*, 1995).

El objetivo de este trabajo fue estudiar y establecer algunos factores que influyen en la expresión transitoria de la  $\beta$ -glucuronidasa en agregados celulares del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB).

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se establecieron suspensiones celulares a partir de callos con estructuras embrionarias formados de las

flores masculinas inmaduras del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB) según la metodología propuesta por Daniels *et al.* (2002).

En estos ensayos se utilizaron suspensiones celulares embriogénicas de doce meses de edad después de haber sido establecidas. Se ajustó la suspensión celular en un tubo cónico de 15 ml de capacidad al 33% de volumen de células sedimentadas (VCS). Estas suspensiones llevaban 10 días después del subcultivo. En platos metálicos estériles, se colocó papel de filtro estéril, encima del cual se pusieron mallas de nylon de 1 cm<sup>2</sup>. Se homogenizó la suspensión y luego se depositaron 100  $\mu$ L de la suspensión celular sobre la malla de nylon, la cual retuvo las células y el papel de filtro absorbió el exceso de medio de cultivo. Cada una de estas mallas de nylon representó una repetición. Cada disparo se realizó colocando papel de filtro humedecido con medio de cultivo en placas de Petri estéril de 5 cm de diámetro donde se colocó la malla de nylon con las células. Se puso una malla de nylon de tamaño de poros de un mm<sup>2</sup> por encima de las células para impedir su dispersión tras el disparo. Los disparos se realizaron bajo  $-21$  pulgadas de Hg de vacío.

Se utilizó una pistola de genes casera de baja presión, la cual usa el argón como gas propulsor. La purificación de los plásmidos usados se realizó siguiendo el protocolo de lisis alcalina propuesto por Sambrook *et al.* (1989). La preparación de las micropartículas (tungsteno M-10) y el recubrimiento de las mismas con el ADN plasmídico se llevaron a cabo de acuerdo a lo propuesto por Sanford *et al.* (1993).

Se realizó un experimento donde se emplearon cuatro presiones (120, 130, 140 y 150 psi) y tres distancias de disparo (6, 9 y 12 cm). En este experimento se realizó un solo disparo de siete  $\mu$ L de micropartículas recubiertas con ADN plasmídico sobre los agregados celulares. En este ensayo se utilizó el plásmido pCambia3301 de 5.077 kb. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento.

Luego de determinar la mejor presión y distancia de disparo, se procedió a estudiar diferentes plásmidos. Se usaron en este experimento los plásmidos pAHC25 (9.7 kb), pBPF-A5-GUS (5.637 kb), pUGCI (6.86 kb), pCambia3301 (5.077 kb) y pBPF-Ü5 (6.37 kb). En este experimento se emplearon 12 repeticiones por cada tratamiento.

En otro experimento, se estudiaron agregados celulares con diferentes tiempos en días después del último subcultivo con los mejores parámetros establecidos en los experimentos anteriores. Se probaron agregados celulares provenientes del quinto, décimo y decimoquinto día después del último subcultivo. Se emplearon 15 repeticiones por tratamiento.

Luego del disparo en todos los ensayos, se colocaron las mallas de nylon con las células en placas de Petri de 9 cm de diámetro, las cuales contenían el medio de cultivo empleado para la multiplicación de la suspensión celular (Daniels *et al.*, 2002) solidificado con Phytigel a 2.3 g.l<sup>-1</sup>. Estas placas fueron selladas con *parafilm* y colocadas en la oscuridad total a una temperatura de  $27 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$  durante tres días. Al transcurrir este tiempo, la detección histoquímica de la actividad transitoria de la  $\beta$ -glucuronidasa se realizó transfiriendo las células a tubos Eppendorf de 1.5 ml y seguidamente se adicionó a los tubos 50  $\mu$ L del sustrato X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucurónico) (Jefferson, 1987). Luego de una incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad durante 48 horas, fue realizada la observación de la actividad GUS y el conteo de los puntos azules por un microscopio estereoscópico (OLYMPUS). El conteo de los puntos azules se hizo por cada repetición.

Se aplicó una lectura de las observaciones completamente aleatoria. Se realizó un análisis de varianza bifactorial (ANOVA) en el primer estudio en que se establecieron dos factores. Los grupos homogéneos y/o significativamente diferentes fueron hallados a partir de las pruebas de rangos múltiples Duncan y Dunnetts'C para tratamientos con varianzas homogéneas y no homogéneas respectivamente. El procesamiento estadístico de las variables en cada estudio fue posible a través del programa estadístico computacional SPSS/PC+ ver. 9.00, para Windows. El nivel de significación fijado para todas las pruebas fue del 99.5%, o sea,  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del primer experimento demostraron que la distancia y la presión jugaron un papel muy importante en la expresión de la  $\beta$ -glucuronidasa y fue imprescindible optimizar estos factores antes de establecer un protocolo para la transformación genética del plátano. A 6 cm, las células sufrieron mucho del daño causado por el impacto de las micropartículas. El mejor resultado obtenido en este ensayo fue con la presión de 140 psi a una distancia de 12 cm con diferencia significativa con los demás tratamientos (Tabla 1).

Más *et al.* (2000) obtuvieron mejores resultados al bombardear embriones somáticos del cultivar 'Gran Enano' (*Musa* sp. AAA) con una presión de 120 psi y una distancia de 8 cm. Sági *et al.* (1995a) utilizaron presiones de 43 a 87 psi y lograron expresión transitoria en el cultivar 'Bluggoe' (*Musa* sp. ABB). Los valores óptimos varían en dependencia de la especie vegetal y del diseño de la pistola (Rey *et al.*, 1996). Becker *et al.* (2000) seleccionaron para el bombardeo de suspensiones celulares en el cultivar 'Gran Enano' una distancia de 7.5 cm y una presión de 80 psi.

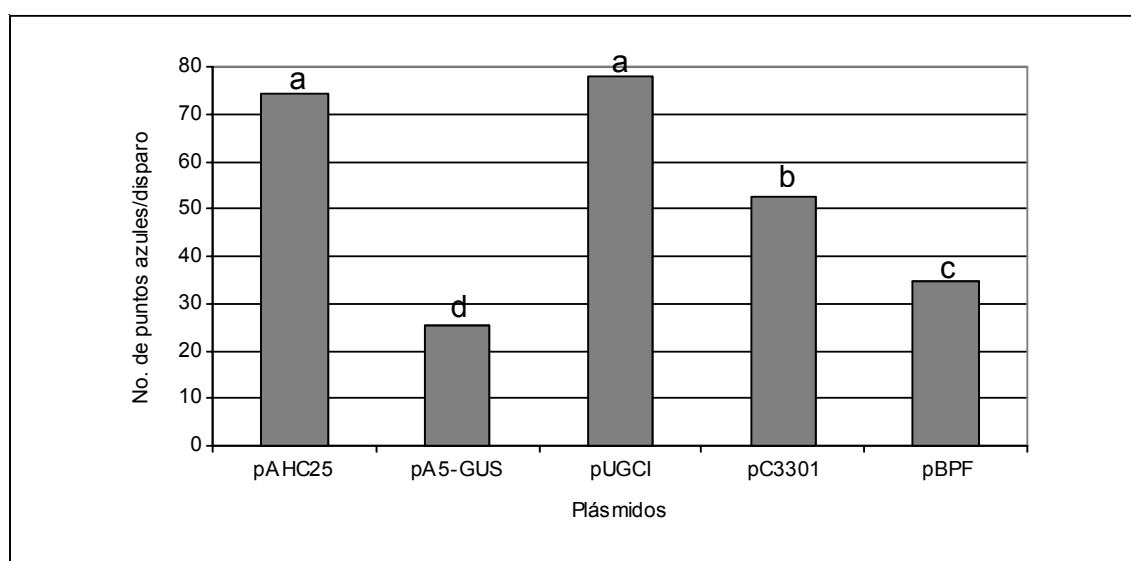
Tabla 1. Número de puntos azules por disparo a diferentes distancias y presiones en *Musa* sp. AAAB cultivar 'FHIA-21' con el plásmido pCAMBIA3301.

Distancia de disparo (cm)	Presión (psi)			
	120	130	140	150
6	20.3 g	28.1 ef	23.6 fg	13.2 h
9	25.2 fg	39.7 c	45.7 b	23.5 fg
12	21.9 fg	36.8 cd	57.0 a	31.8 de
15	15.1 h	24.4 fg	39.8 c	36.6 cd

Medias con letras distintas difieren estadísticamente para  $p < 0.05$  según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Se utilizó para este experimento una distancia de 12 cm y una presión de 140 psi. Se aprecia por la figura 1 una diferencia estadística entre los plásmidos pUGCI y pAHC25, los cuales tenían como promotor, el poliubiquitina del maíz y los demás plásmidos con el promotor de 35S CaMV. Según Sági *et al.* (1995b) el promotor poliubiquitina del maíz es uno de los promotores más fuerte para *Musa* spp. Estos autores obtuvieron mejores resultados con el plásmido

pAHC27 bajo el control del mismo promotor en *Musa* spp. Schenk *et al.* (1999) usaron un nuevo promotor (ScBV) en el bombardeo de células embriogénicas de los cultivares 'Williams' (AAA), 'Three Hand Planty' (AAB) y 'Gran Enano' (AAA) y encontraron que los niveles de expresión fueron variables para diferentes líneas transgénicas, pero en general fue comparable con las actividades de los promotores poliubiquitina del maíz y 35S CaMV.

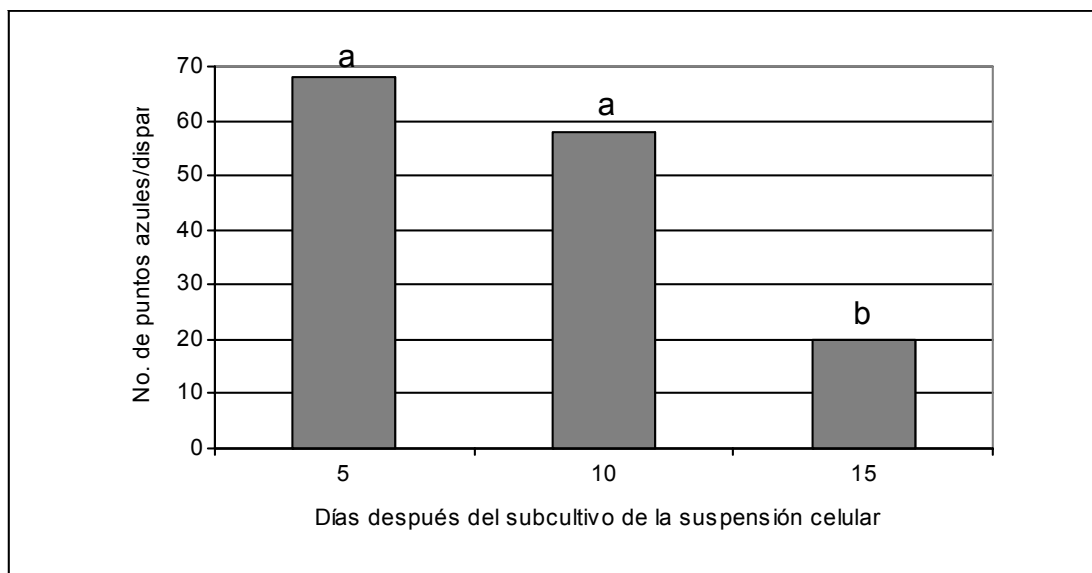


Medias con letras distintas difieren estadísticamente para  $p < 0.05$  según la prueba de Duncan.

Figura1. Número de puntos azules por disparo en cinco plásmidos diferentes en el cultivar híbrido de plátano "FHIA-21" (*Musa* sp. AAAB).

Quedó demostrado en el tercer experimento que la edad de la suspensión celular después del subcultivo fue muy importante en los resultados. Se utilizó en este experimento una distancia de 12 cm y una presión de 140 psi con el plásmido pUGCI de 6.86 kb. Al utilizar suspensiones celulares de cinco días de edad después del subcultivo, se observaron un promedio de 68.13 puntos azules por disparo (Figura 2). No hubo diferencia estadística con suspensiones de 10

días de edad. Sin embargo, al utilizar suspensiones celulares de 15 días de edad, la observación de puntos azules se redujo considerablemente, llegando a solo 20.06 puntos azules por disparo. Este resultado se atribuye a que las suspensiones celulares de 15 días de edad ya no estaban en su fase logarítmica de crecimiento y las células no estaban en división activa, la cual representa la fase estacionaria.



Medias con letras distintas difieren estadísticamente para  $p < 0.05$  según la prueba de Dunnett C

Figura 2. Efecto de la edad de la suspensión celular en la eficiencia de la transformación en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* sp. AAAB).

Sági *et al.* (1995a) estudiaron la edad de 4, 5 y 6 días después del subcultivo en el cultivar 'Bluggoe' y al hacer la tinción con el sustrato dos días después del bombardeo, lograron mejores resultados con los tratamientos de 5 y 6 días.

## CONCLUSIONES

La mejor eficiencia de disparo se logró con una distancia de 12 cm y una presión de 140 psi para el cultivar híbrido FHIA-21. Este resultado fue significativamente superior a los demás tratamientos. Los promotores juegan un papel muy importante en la eficiencia de la transformación y los plásmidos pUGCI y pAHC25, los cuales estaban bajo el control del poliubiquitina del maíz resultaron ser los mejores con diferencia significativa a los demás plásmidos. La edad de la suspensión celular después del subcultivo también es un factor a considerar ya que en este trabajo se demostró que a los 15 días después del subcultivo se había reducido significativamente la expresión transitoria de la  $\beta$ -glucuronidasa.

## REFERENCIAS

- Becker, D, Dugdale B, Smith M, Harding R y Dale J (2000) Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. 'Grand Nain' via microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports* 19: 229-234
- Daniels, D, Gómez RK y Reyes MV (2002) Plant regeneration system via somatic embryogenesis in the hybrid cultivar FHIA-21 (*Musa* sp. AAAB Group). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 38 (4): 330-333
- FAO (2001) <http://www.fao.org>
- Jefferson, RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5: 387-405
- Más, L, Agüero G, Gil V, Reyes M, Gómez R, Ocaña B y Martínez S (2000) Optimización de parámetros en la transformación de embriones somáticos de banano utilizando pistola de genes. *Biotecnología Vegetal* 1: 51-54
- May, G, Afza R, Mason H, Wiecko A, Novak F y Amtzen C (1995) Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Bio Technol.* 13: 486-490
- Rey, M, Humara J, López M, González M, Rodríguez R, Tabaza R, Ancora G y Ordas R (1996) *Somatic Cell Genetics and Molecular Genetics off trees*. Kluwer Acad. Pub.
- Rodríguez, JL y Rodríguez A (2001) Aspectos socioeconómicos del cultivo del plátano en Colombia. *INFOMUSA* 10(1): 4-9
- Sági, L, Panis B, Remy S, Schoofs H, De Smet K, Swennen R y Cammue BPA (1995b) Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment. *Bio/Technology* 13: 481-485
- Sági, L, Remy S, Verelst B, Panis B, Cammue B, Volckaert G y Swennen R (1995a) Transient gene expression in transformed banana (*Musa* cv. Bluggoe) protoplasts and embryogenic cell suspensions. *Euphytica* 85: 89-95
- Sambrook, J, Fritsch E y Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sanford, J, Smith F y Russell J (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Meth. In Enzymol* 217: 483-509
- Schenk, P, Sagi L, Remans T, Dietzgen R, Bernard M, Graham M y Manners J (1999) A promoter from sugarcane bacilliform badnavirus drives transgene expression in banana and other monocot and dicot plants. *Plant Molecular biology* 39: 1221-1230