

Parámetros óptimos en la transformación de embriones somáticos de papaya empleando una pistola de genes de baja presión

Leticia Mas, Boris Chong, Rafael Gómez, Jorge Gallardo, Idalia Herrera, Maritza Reyes. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas Carretera a Camajuaní km. 5 ½ Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

RESUMEN

El mejoramiento genético de la papaya (*Carica papaya* L.) es de gran importancia por su comercialización en el ámbito mundial. En este sentido la biobalística como método de transformación genética constituye una vía alternativa. Utilizando una pistola de genes de baja presión embriones somáticos de papaya fueron bombardeados con el plásmido pCAMBIA3301. Los ensayos fueron evaluados por análisis histoquímico del gen *gus*. Se llegaron a nuevas condiciones óptimas de bombardeo lográndose la expresión transitoria de la β -glucuronidasa en embriones somáticos de papaya con una frecuencia máxima de 77.8 puntos azules por 100 mg de embriones somáticos.

Palabras clave: β -glucuronidasa, bombardeo, micropartículas

ABSTRACT

Genetic improvement of papaya (*Carica papaya* L.) is of great importance for its commercialization in the world. In this sense biolistic, as a genetic transformation method constitutes an alternative. Using a low pressure gene gun, papaya somatic embryos were bombarded with the plasmid pCAMBIA3301. The assays were evaluated by histochemical analysis of the *gus* gene expression. Optimal genetic transformation conditions were obtained with a maximum efficiency of 77.8 blue points per 100 mg of somatic embryos.

Key words: β -glucuronidase, bombardment, microparticles

INTRODUCCIÓN

La ausencia de genes de resistencia al Virus de la Mancha Anular en la papaya (*Carica papaya* L.), unido a la existencia de diferentes formas sexuales y una limitada variabilidad genética del cultivo, así como una baja heredabilidad del mismo hacen que el mejoramiento genético de este frutal por métodos biotecnológicos sea de gran importancia. Una de las técnicas empleada para ello es el bombardeo de partículas, por el cual Fitch *et al.* (1990) obtuvieron las primeras plantas transgénicas resistentes al PRSV. Este trabajo se realizó para determinar los parámetros adecuados de disparo sobre embriones en etapa globular de papaya var. Maradol Roja empleando una pistola de genes de baja presión de argón y lograr en los mismos la expresión transitoria de la β -glucuronidasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Empleando una pistola de genes de baja presión de argón (CINVESTAV, 2000) fueron bombardeados embriones somáticos de papaya var. Maradol Roja en etapa globular (Posada *et al.*, 1995). Los experimentos se realizaron con el plásmido

pCAMBIA3301 (CAMBIA; 1997) de 5077 pares de bases que contiene el gen *bar* que confiere resistencia al herbicida BASTA y el *gus* que codifica para la enzima β -glucuronidasa. Las micropartículas de tungsteno (0.7 μ m) se esterilizaron y recubrieron con el ADN plasmídico según Sanford *et al.* (1993). A las 48 horas del disparo los embriones fueron teñidos para evaluar la expresión transitoria de la β -Glucuronidasa según el protocolo propuesto por McCabe *et al.* (1988) con algunas modificaciones.

Se estudió el efecto de los siguientes parámetros sobre la eficiencia de transformación:

- Empleo de medio osmótico (120 g.l⁻¹ de sacarosa) antes y después del bombardeo
- Presión de disparo: 80, 100, 120, 130, 140 y 150 psi
- Preparación de los embriones antes del bombardeo: cero y tres días
- Presión de vacío: -22 y -25 pulgadas de Hg
- Concentración del ADN utilizado: 1.0, 1.5 y 2.0 mg.ml⁻¹
- Cantidad de micropartículas por disparo: 8.0, 12.0 y 16.0 μ l
- Número de disparos sobre la muestra: uno y dos
- Distancia de disparo: 7.0, 9.0 y 11.0 cm

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Empleo de medio osmótico antes y después del bombardeo

Con la utilización de 120 g.l^{-1} de sacarosa como agente osmótico en el medio de cultivo, cuatro horas antes y 16 horas después del bombardeo se obtuvo la mayor eficiencia de disparo (16 puntos azules por cada 100 mg de embriones somáticos). La elevación de la concentración osmótica en el medio de cultivo protege a las células de la rotura y la explosión de

las mismas durante el bombardeo, a la vez que mejora la penetración de las partículas y por tanto la eficiencia de transformación. Estos resultados confirmaron los obtenidos por Zuker *et al.* (1996) en segmentos de tallo de clavel al aumentar el gradiente osmótico en el medio de cultivo.

Al realizar la tinción histoquímica del material transformado, a las 48 horas del bombardeo, fue posible la observación de puntos azules de distintos tamaños (aislados o agrupados en un mismo embrión somático), sin la presencia de falsos positivos (Figura 1).

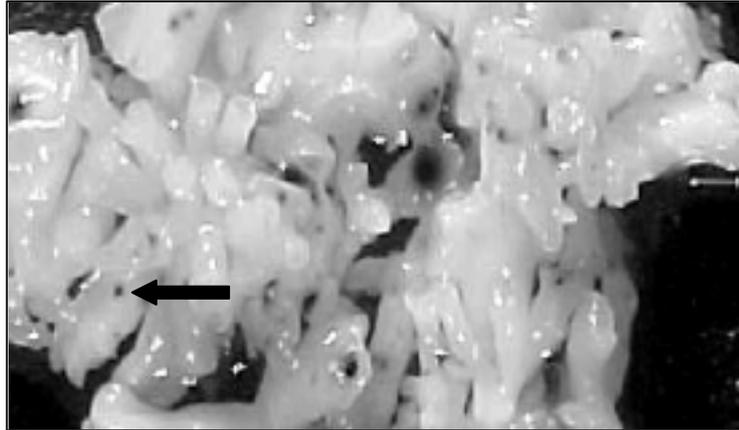
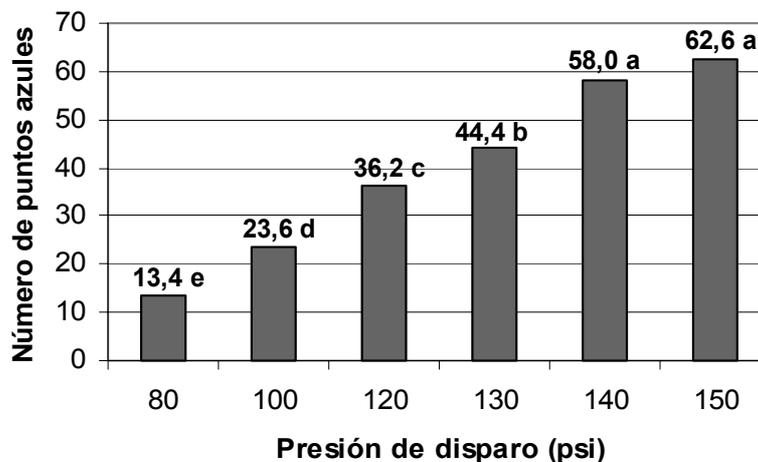


Figura 1. Embriones somáticos de *Carica papaya* L. var. Maradol Roja mostrando actividad transitoria GUS+ a las 48 horas de disparados (zonas oscuras).

Presión de disparo

Al incrementar la presión de disparo el número de puntos azules aumentó; pero los mejores resultados fueron obtenidos a una presión de 140 psi (58.0 puntos azules por 100 mg de embriones somáticos) pues aunque con 150 psi de presión el número de puntos azules no difirió estadísticamente de 140 psi, si

aumentaron los daños celulares en los embriones y por lo tanto se afectó su posterior multiplicación (Figura 2). El aumento de la presión de disparo concentra el disparo reduciendo el área de impacto de los microproyectiles, disminuye el número de partículas que caen fuera del tejido y aumenta las posibilidades de que estas penetren en el tejido y por ende el número de puntos azules.



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

Figura 2. Efecto de la presión de disparo sobre la eficiencia de transformación en embriones somáticos de papaya var. Maradol Roja.

Estos resultados corroboran los estudios de Jenes *et al.* (1996) quienes refirieron que al aumentar la presión de disparo se incrementa la eficiencia de transformación hasta un punto donde las altas presiones dañan la superficie celular.

Preparación de los embriones antes del bombardeo

Con el subcultivo de los embriones somáticos tres días antes del disparo se incrementó en un 73.4% el número de puntos azules. El estrés al que fue sometido el material vegetal durante su preparación estimuló la multiplicación del mismo, asegurando con esto que antes del disparo el tejido permaneciera en una fase de crecimiento activo que facilita la incorporación rápida del ADN exógeno, aumentando con ello la eficiencia de transformación.

Este procedimiento ha sido descrito por Cai *et al.* (1999). Mahon *et al.* (1996) también estudiaron en embriones de papaya, el efecto del régimen de cultivo antes del bombardeo, obteniendo que el mismo tenía un marcado efecto sobre la transformación.

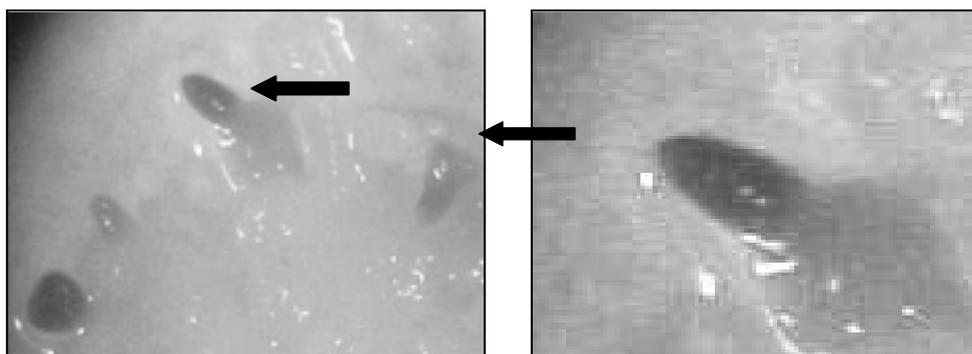


Figura 3. Embriones somáticos en etapa globular de *Carica papaya* L. var. Maradol Roja completamente teñidos de azul (zonas oscuras) a los 10 días del bombardeo.

Efecto de la concentración del ADN

Al analizar los resultados obtenidos se evidenció un incremento de 71% del número de puntos azules al aumentar a 2.0 mg.ml⁻¹ la concentración del ADN empleado en el recubrimiento de las micropartículas.

Al disponer de una mayor cantidad de ADN existieron más posibilidades de que todas las partículas preparadas quedaran recubiertas y por tanto aumentara también el número de moléculas de ADN que penetraron en las células.

Una concentración muy alta de ADN puede provocar la agregación de las partículas y disminuir los resultados, no obstante cantidades de ADN mayores a la mayor disparada en el presente experimento fueron utilizadas con éxito en este mismo material vegetal por Cai *et al.* (1999). Por otra parte Grapin

Presión de vacío

Al lograrse un mayor vacío (25 pulgadas de mercurio) en la cámara de disparo el número de puntos azules de la muestra se incrementó en un 39.7%, al existir una menor fricción de los microproyectiles con el aire de la cámara. La disminución de la fricción evita que las micropartículas pierdan velocidad y por consiguiente permite su penetración en el tejido vegetal con mayor facilidad; a la vez disminuye la onda de choque sobre el tejido en el momento del disparo lo que evita daños mayores al tejido.

Oard *et al.* (1990) al bombardear con una pistola de argón obtuvieron que un aumento del vacío en la cámara de disparo incrementó la actividad transitoria del gen *gus* en suspensiones celulares de maíz, callos de arroz y ápices y hojas de *Triticum aestivum* cv. Tadinia. Resultados similares también fueron obtenidos por Aragao *et al.* (1993).

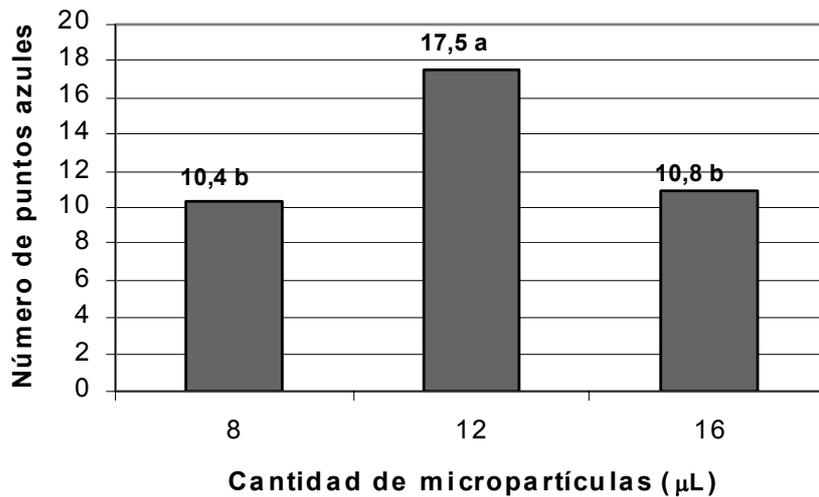
Después de 10 días de esta experiencia se realizó la tinción histoquímica a un grupo de embriones somáticos, observándose algunos completamente teñidos de azul, lo cual confirma la actividad estable de la enzima β -glucuronidasa en este material vegetal (Figura 3).

(1995) concluyó que la concentración óptima estaba relacionada con la talla de los vectores.

Efecto de la cantidad de partículas por disparo

La frecuencia de aparición de puntos azules aumentó en un 68% al disparar una cantidad de 12 ml de la suspensión de micropartículas (Figura 4).

Al disponerse de una mayor cantidad de microproyectiles se incrementó el número de impactos sobre la muestra y con ello la posibilidad de introducción del ADN en el tejido. Sin embargo al dispararse 16 ml la eficiencia disminuyó, lo cual pudiera estar dado por la afectación de la vitalidad del tejido debido al exceso de partículas sobre el mismo. Resultados similares fueron obtenidos por Sanford *et al.* (1993).



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

Figura 4. Efecto de la cantidad de partículas sobre la eficiencia de transformación en embriones somáticos de papaya var. Maradol Roja.

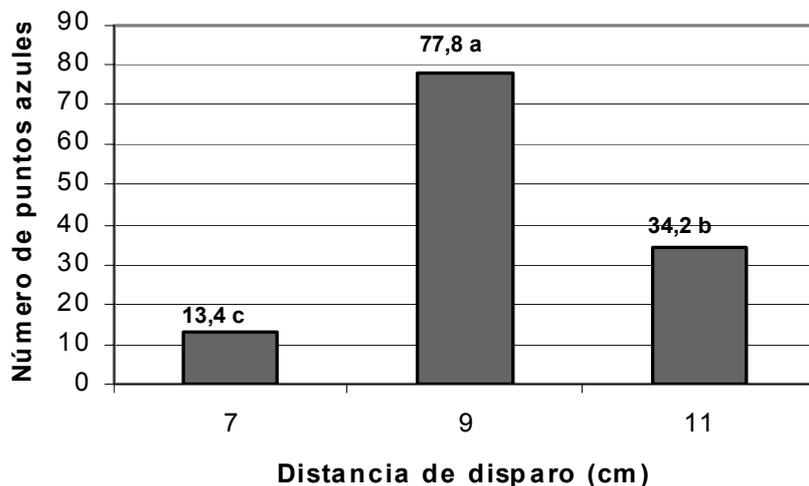
Número de disparos sobre la muestra

No se observaron diferencias significativas entre el número de puntos azules al realizar uno o dos disparos.

Una cantidad de 16 ml de microproyectiles es impulsada hacia el tejido cuando se bombardea dos veces; cantidades similares fueron bombardeadas al realizar un disparo de 16 mL en el experimento del epígrafe anterior, obteniéndose en ambos experimentos una disminución de la eficiencia de transformación.

Distancia de disparo

Con la distancia de 9.0 cm se obtuvo la mejor eficiencia de disparo (77.8 puntos azules por cada 100 mg de embriones somáticos) (Figura 5). Con 7.0 cm los microproyectiles incidieron en una pequeña superficie y causaron grandes daños al tejido. Con 11.0 cm la energía y velocidad de llegada de las partículas no fue suficiente para que penetraran en el tejido con eficiencia. Jenes *et al.* (1996) estudiaron este parámetro y confirmaron que la eficiencia de penetración necesaria para la entrada de los genes a las células disminuía con la distancia.



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

Figura 5. Efecto de la distancia de disparo sobre la eficiencia de transformación en embriones somáticos de papaya var. Maradol Roja.

CONCLUSIONES

La mayor eficiencia de disparo se obtuvo al subcultivar los embriones somáticos en etapa globular tres días antes del bombardeo y emplear un medio de cultivo

osmótico con 120 g.l⁻¹ de sacarosa, 4.0 horas antes y 16.0 horas después del mismo.

Mediante la expresión transitoria de la β -glucuronidasa en embriones somáticos en etapa globular de papaya

var. Maradol Roja se determinó que los parámetros óptimos de disparo para este material vegetal fueron: 9.0 cm de distancia de disparo, 140 psi de presión de disparo, presión de vacío 25 pulgadas de mercurio y 12 ml de micropartículas por disparo.

Al utilizar una concentración de 2.0 mg.ml⁻¹ de ADN plasmídico para el recubrimiento de los microproyectiles se obtuvieron las mejores eficiencias de transformación sobre embriones somáticos de papaya en etapa globular.

Con el empleo de una pistola de genes de baja presión de argón y el protocolo desarrollado se logró la expresión transitoria de la β-glucuronidasa en embriones somáticos en etapa globular de papaya var. Maradol Roja con una frecuencia máxima de actividad transitoria de 77.8 puntos azules por cada 100 mg de embriones somáticos.

REFERENCIAS

- Aragao F, Grossi de Sa M, Davey M, Brasileiro A, Faria J y Rech E (1993) Factors influencing transient gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an electrical particle acceleration device. *Plant Cell Reports* 12: 483-490
- Cai W, Gonzalves C, Tennant P, Fermin G, Souza M, Sarindu N, Jan F, Zhu H y Gonsalves D (1999) A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 35: 61-69
- CAMBIA (1997) Cambia vectors Center of Application of Molecular Biology to International Agriculture
- Fitch M, Manshardt R, Gonsalves D, Slightom J y Sanford J (1990) Stable Transformation of papaya via microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.* 9:189-194
- Grapin A (1995) Regeneration par embryogenese somatique en milieu liquide et transformation genetique par biolistique de bananiers de et triploides. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agronómicas. Escuela Nacional Superior Agronómica, Francia
- Jenes B, Bittencourt P, Csányi A, Pauk J, Nagy I, Toldi O y Balázs E (1996) The GENEBOOSTER – a new microparticle bombardment device – for genetic transformation of plants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 2: 42-51
- Mahon R, Bateson M, Chamberlain D, Higgins C, Drew R y Dale J (1996) Transformation of an Australian variety of *Carica papaya* using microprojectile bombardment. *Aust. J. Plant Physiology* 23: 679-685
- McCabe D, Swain W, Martinell B y Christou P (1988) Stable transformation of soybean by particle acceleration. *Biotechnol.* 6: 923-926
- Oard J, Paige D, Simmonds J y Gradziel T (1990) Transient gene expression in maize, rice and wheat cells using an airgun apparatus. *Plant. Physiol.* 92: 334-339
- Posada L (1995) Desarrollo de la embriogénesis somática en la fruta bomba (*Carica papaya* L.). Trabajo de tesis. UCLV, Santa Clara
- Sanford J, Smith F y Russell J (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol.* 217: 483-509
- Zuker A, Ahroni A, Watad A, Chang P, Cheah K, Kononowicz A, Woodson W, Bressan R, Hasegawa P y Vainstein A (1996) Transformation of carnation using the biolistic method. *Plant Tissue Cultured and Biotechnology* 2: 105-112