

Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de suspensiones celulares embriogénicas de banano cultivar Grande naine (AAA)

Idalmis Bermúdez^{*1}, Rafael Gómez, Borys Chong, Maritza Reyes, José M. Machado, Orelvis Portal, Bárbara Ocaña, Yelenys Alvarado, Michel Leiva, Mayra Acosta, Mileidy Cruz, Belkis Roque, Rony Swennen², Laszlo Sagi² y Lázaro Hernández³. ^{*}Autor para correspondencia.

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: idalmis@ibp.co.cu

² Laboratory of Tropical Crop Improvement, Katholieke Universiteit Leuven (KUL).

³ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). La Habana.

RESUMEN

La Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) se ha convertido en los últimos años, en la enfermedad foliar más destructiva que afecta el cultivo de bananos y plátanos a nivel mundial. El presente trabajo se realizó con el objetivo de obtener plantas transgénicas de banano cultivar Grande naine resistentes a esta enfermedad mediante la transformación genética. Se emplearon suspensiones celulares embriogénicas, obtenidas a partir de embriones somáticos formados de flores masculinas inmaduras, para realizar la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Se empleó la cepa EHA-105 de la bacteria con los plásmidos binarios pHCA-58, pHCG-59 y pHGA-91, estos contienen diferentes combinaciones de genes que codifican para las enzimas antifúngicas: quitinasa, glucanasa y la osmotina AP-24. Como marcador de selección fue empleado el herbicida comercial BASTA®. Se obtuvieron 110 posibles líneas transformadas de las tres construcciones, luego de tres meses en medio de cultivo de selección. El evento de transgénesis fue comprobado mediante análisis de reacción en cadena de la polimerasa.

Palabras clave: AP-24, glucanasa, *Musa*, *Mycosphaerella fijiensis*, quitinasa

ABSTRACT

The black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) has become in the last years, the most destructive disease that affects the production of banana and plantains world-wide. The present work was made with the objective to obtain transgenic plants of banana cultivar Grand naine (AAA) resistant to this disease with the use of genetic transformation. Embryogenic cell suspensions obtained from somatic embryos formed from immature male flowers, were used for the transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. The bacterial strain EHA-105 was used with the binary plasmids pHCA-58, pHCG-59 and pHGA-91, which contain different combinations of genes that encode for the antifungal chitinase, glucanase enzymes and the AP-24 osmotin. The commercial herbicide BASTA® was used as selective agent. One hundred ten putative transformed lines of the three constructions were obtained, after three selection months in the culture medium. The transgenic events were verified by means of Polymerase Chain Reaction analysis.

Key words: AP-24, chitinase, glucanase, *Musa*, *Mycosphaerella fijiensis*

INTRODUCCIÓN

El cultivo de bananos y plátanos se encuentra ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, el estimado de la producción es del orden de 700 millones de toneladas al año con un área calculada de siembra de 10 millones de hectáreas. Este cultivo forma parte de la dieta alimentaria de más de 400 millones de personas y se ubica en el cuarto renglón en la categoría de productos alimenticios de gran demanda después del arroz, maíz y el trigo (FAO, 2003).

La enfermedad Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) hizo su aparición en Cuba a partir del año 1990 y trajo como consecuencia una reducción

en los rendimientos, eliminó variedades susceptibles, así como condujo a un incremento de los costos de producción en las plantaciones de bananos debido al aumento en la frecuencia de aspersiones de fungicidas. Se creó así la necesidad de llevar a cabo la búsqueda de alternativas para desarrollar nuevas variedades resistentes o tolerantes a esta enfermedad (Sánchez *et al.*, 2002).

La ingeniería genética aparece como una alternativa importante para superar las limitaciones que presentan los métodos clásicos de mejoramiento en el género *Musa*, gracias a la posibilidad de introducir cambios genéticos específicos en un corto período de tiempo (Sagi *et al.*, 1994).

La metodología de transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* ha sido aplicada con éxito tanto en plantas dicotiledóneas como monocotiledóneas y se han referido, entre otros, para cultivos de arroz, maíz, yuca y banano (Sagi *et al.*, 2000; Ganapathi, 2001). También se ha descrito en tejidos meristemáticos de *Musa* spp. cv. Grande naine (May *et al.*, 1995) en suspensiones celulares embriogénicas de banano (Pérez, 2000) y plátanos cv. híbrido FHIA-21 (AAAB) (Chong *et al.*, 2002).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de obtener plantas transgénicas de banano cultivar Grande naine (AAA) con el empleo de la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Como material vegetal se usaron suspensiones celulares embriogénicas del cultivar Grande naine (AAA) obtenidas a partir de embriones somáticos, formados de flores masculinas inmaduras, siguiendo la metodología propuesta por Cote *et al.* (1996).

Cepa bacteriana, plásmidos y condiciones de cultivo

Fue usada la cepa EHA-105 de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene los plásmidos (construcciones antifúngicas): pHCA58, pHCG-59 y pHGA-91 (Figura 1). El cultivo bacteriano se desarrolló en el medio de cultivo LB (10 g.l⁻¹ de triptona, 5 g.l⁻¹ de extracto de malta, 10 g.l⁻¹ de cloruro de sodio) a 28°C y 200 rpm durante 24 horas. Los antibióticos rifampicina, ampicilina y estreptomycin, cada uno a 50 mg.l⁻¹, y espectinomycin a 300 mg.l⁻¹, fueron incluidos en el medio de cultivo.

El cultivo bacteriano fue centrifugado a 4 300 rpm durante 10 minutos y el pellet bacteriano fue resuspendido en medio de cultivo de inducción (Sales AB 20X, 2 mM NaH₂PO₄, 30 mM de MES (2-N-Morfolino)ácido etano sulfónico, glucosa 1%, 200 mM acetosiringona, pH 5.6) con los antibióticos mencionados anteriormente (Pérez, 2000). El cultivo con una densidad óptica (DO₆₀₀ = 1.0), fue incubado a 28°C y 200 rpm en un agitador orbital toda la noche.

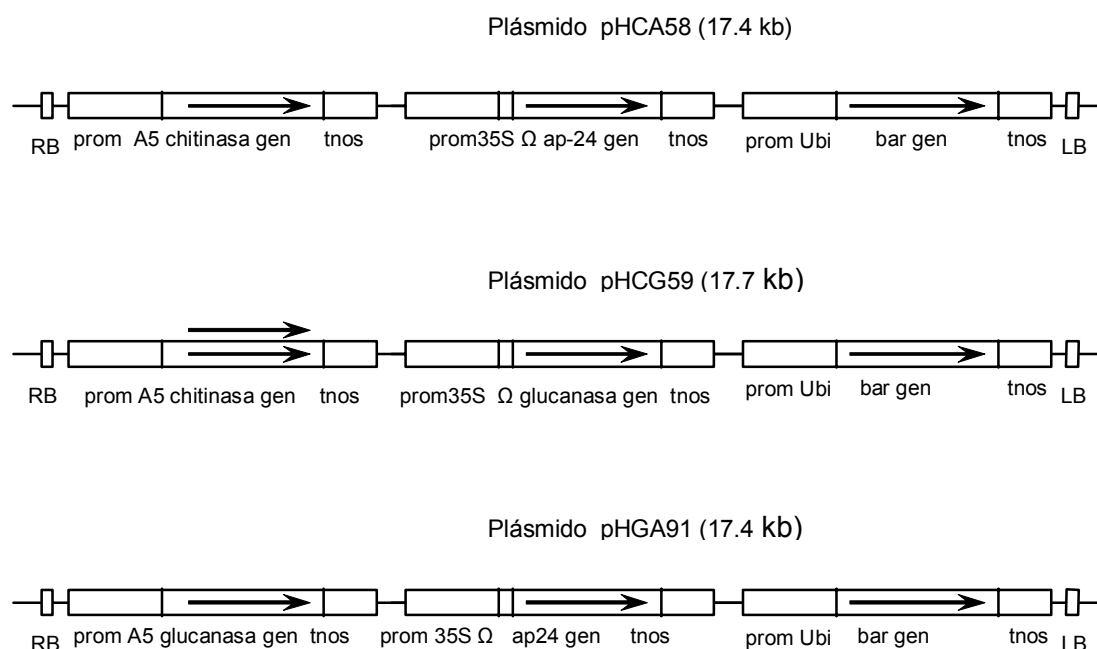


Figura 1. Representación esquemática de los plásmidos utilizados en la transformación genética de suspensiones embriogénicas de banano cv. Grande naine mediada por *A. tumefaciens*.

Transformación genética

El cultivo bacteriano fue transferido al medio de cultivo de inducción libre de antibióticos y diluido a una DO₆₀₀ = 0.5-0.6 antes de la infección de la suspensión celular. Se utilizaron 150 µl de células, con cinco días después de subcultivadas, a una concentración de 33% del volumen de células sedimentadas y fueron mezcladas con 1 ml del cultivo de la suspensión bacteriana. Luego fueron colocadas en la oscuridad a 25°C en un agitador orbital a 25 rpm por 2 h.

La suspensión de células infectada se colocó en una malla de "nylon" (200 µm) y esta a su vez encima de un papel de filtro para eliminar el exceso del cultivo de *A. tumefaciens*. Las mallas fueron transferidas al medio de cultivo de multiplicación de la suspensión celular en estado semisólido (Bieberach, 1995), suplementado con acetosiringona 200 µM y pH 5.6. El cocultivo se realizó por tres días en la oscuridad a la temperatura de 21°C.

Después del cocultivo las células fueron transferidas al mismo medio de cultivo de multiplicación pero

suplementado con 200 mg. l⁻¹ de timentina y 6 mg. l⁻¹ del herbicida comercial BASTA®. Se mantuvieron en este medio de cultivo por dos meses con subcultivos cada 15 días. Las células sobrevivientes a la selección fueron transferidas al medio de cultivo de formación de embriones propuesto por Bieberach (1995), sin agente selectivo. Los embriones formados en 45 días de cultivo fueron luego transferidos al medio de cultivo de germinación propuesto por Gómez *et al.* (2000).

Las posibles plantas transformadas fueron multiplicadas y enraizadas hasta obtener 15-20 plantas por línea usando como medio de cultivo las sales Murashige y Skoog (1962) suplementado con 4.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP (6-Benzil-aminopurina) y 0.65 mg.l⁻¹ de AIA (ácido indolacético) para la multiplicación y para el enraizamiento las mismas sales suplementadas con 1.3 mg.l⁻¹ de AIA y 40 g.l⁻¹ de sacarosa.

Aislamiento del ADN total, reacción en cadena de la polimerasa (RCP)

El ADN (ácido desoxiribonucleico) total fue aislado en 33 posibles líneas transformadas del cultivar Grande naine con las tres plásmidos. Las muestras para la extracción del ADN fueron tomadas de plantas que crecían en condiciones de campo y se utilizó el Kit de purificación de ADN genómico Wizard® (PROMEGA) siguiendo las instrucciones de los fabricantes excepto para el buffer de extracción que fue modificado (100 mM Tris-HCl pH= 8, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 2% PVP, 10 mM β-Mercaptoethanol). La concentración del ADN fue ajustada a 200 ng. l⁻¹ para ser usados en el análisis de RCP. El plásmido usado como control tenía una concentración de 10 ng.

El análisis de RCP fue usado para detectar las líneas que tuvieran el gene *bar* posiblemente incorporado. Para reconocer su secuencia, que amplifica para 402 pares de bases, se usaron los siguientes oligonucleótidos: *bar* 5' (5' CGA GAC AAG CAC GGT CAA CTT C 3') y *bar* 3' (5' GAA ACC CAC GTC ATG CCA GTT C 3'). La temperatura de recorrido del cebador fue de 62 °C.

Las muestras amplificadas fueron expuestas por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% con buffer TBE, y 10 µl de cada producto por ruta. El plásmido pHCA58 (17.4 kb) fue usado como control positivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transformación genética

Las células embriogénicas luego de ser cocultivadas durante tres días, con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA-105, y ser transferidas al medio de cultivo de selección por dos meses con subcultivos cada dos semanas, se observó que a medida que se realizaban los subcultivos muchas células tomaban una coloración de parda a negra. Con la concentración utilizada del agente selectivo BASTA® no se observó ningún tipo de crecimiento en el material vegetal no transformado. Los embriones en estado globular a las cuatro semanas del subcultivo fueron visibles en la superficie de las células embriogénicas. La emergencia del coléoptilo se observó a las cuatro u ocho semanas después de haber transferidos los embriones maduros al medio de cultivo de germinación (Figura 2).

Un total de 110 posibles líneas transformadas fueron obtenidas con los tres plásmidos utilizados (Tabla 1). Se seleccionaron 33 líneas para los análisis moleculares por presentar una respuesta superior frente a *Mycosphaerella fijiensis* en condiciones de campo al compararlas con el control de Grande naine evaluado.

Aislamiento del ADN total, reacción en cadena de la polimerasa (RCP)

El ADN extraído fue comprobado mediante una electroforesis en gel de agarosa, donde se comprobó su pureza e integridad.

El gen *bar* pudo ser amplificado en varias líneas transformadas como se muestra en figura 3. Las bandas de las líneas transformadas coincidieron con las del plásmido (pHCA58), el cual fue usado como control positivo.

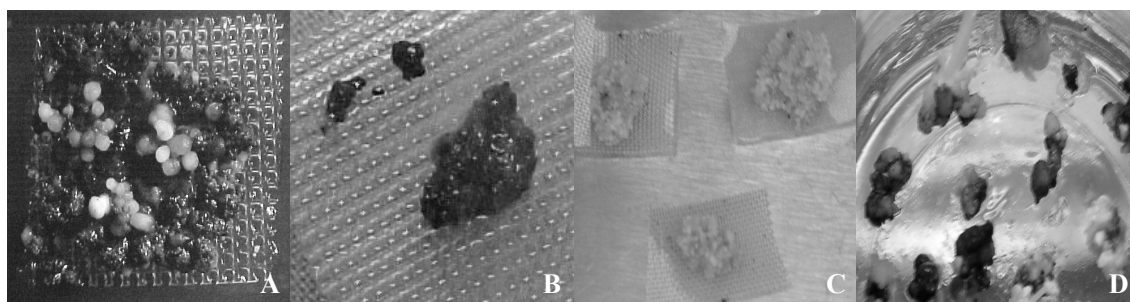


Figura 2. (A) Crecimiento de los embriones posibles transformados en medio de cultivo selectivo que contenía 200 mg.l⁻¹ de timentina y 6 mg.l⁻¹ BASTA®; (B) Control no transformado en medio de cultivo selectivo; (C) Control no transformado en medio de cultivo no selectivo; (D) Germinación de embriones transformados dos meses después de la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*.

En el control negativo (planta no transformada) no apareció ninguna banda lo que indicó que las bandas de las líneas transformadas correspondían al gen *bar*, el cual fue introducido en el genoma de las plantas por los eventos de transformación que tuvieron lugar. De las 33 posibles plantas transgénicas seleccionadas para los análisis moleculares, 21 (67%) resultaron positivas en el RCP (Tabla 2).

Trabajos realizados en este mismo cultivo por Remy *et al.* (2002) quienes regeneraron un total de 157 plantas *in vitro* diferenciadas de *Musa* spp. observaron la expresión en ocho individuos. Así mismo Daniels (2003) de un total de 70 posibles plantas transgénicas logró la expresión en cinco.

Tabla 1. Resultados obtenidos en la transformación genética del cultivar Grande naine con tres plásmidos utilizados en los diferentes experimentos

Variable	Plásmidos			Total
	pHCA58	pHCG59	pHGA91	
No. Total de muestras transform.	26	29	42	97
Colonias indep.	5.3	2.2	2.2	9.7
Posibles Transf. /por muestras (%)				
No. total de líneas indep. Posibles Transf. regeneradas	45	68	24	137
No. total de líneas indep. Posibles Transf. multiplicadas	36	50	24	110

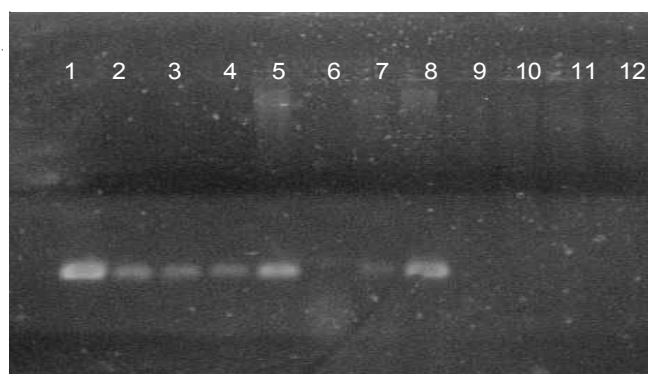


Figura 3. Análisis de RCP (*bar*) en las posibles líneas transformadas del cultivar Grande naine con las construcciones utilizadas. Carril 1) Plásmido pHCA58, Carril 2- 5) Líneas positivas; Carril 6) Control negativo: Planta no transformada; Carril 7-8) Control Positivo: Plantas de tabaco transformadas; Carril 9-12) Líneas negativas.

Tabla 2. Resultados de los análisis moleculares (RCP) de las posibles plantas transformadas en el cultivar Grande naine con los tres plásmidos utilizados.

Variables	Plásmidos			Total
	pHCA58	pHCG59	pHGA91	
Número total de líneas selec. en campo para extracción de DNA	6	14	13	33
Número total de líneas positivas por cada construcción	5	9	7	21
Frecuencia de líneas positivas (%)	83.3	64.2	53.8	67.1

CONCLUSIONES

Con el empleo de la transformación genética de suspensiones celulares embriogénicas vía *Agrobacterium tumefaciens* en banano cultivar Grande naine (AAA), basado en la utilización de suspensiones de células embriogénicas se lograron seleccionar líneas que resultaron positivas en los análisis moleculares realizados.

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. 86 p
- Chong, B, Daniels D, Gómez KR, Bermúdez IC, Reyes MV y Ocaña BR (2002) Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de suspensiones celulares embriogénicas del cultivar híbrido de plátano FHIA-21 (AAAB). *Biología Vegetal* 2 (1): 43-46
- Cote, F, Domergue R, Monmarson S, Schwendiman J, Teisson C y Escalant JV (1996) Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. 'Grand naine'. *Physiologia Plantarum* 97: 285-290
- Daniels D (2003) Desarrollo de la embriogénesis somática y su empleo en la transformación genética por biobalística en el cultivar híbrido de plátano FHIA-21 (*Musa* sp. AAAB). Tesis para aspirar al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de biotecnología de las Plantas. Santa Clara. Cuba. 96 p
- Escalant, JV, Teisson C y Cote F (1994) Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp). *In Vitro Plant Cell and Dev. Biol.* 30:181-186
- FAO (2003) Boletín trimestral FAO de estadísticas. 12 (3-4)
- Ganapathi TR, Higos NS, Balint-Kurti PJ, Arntzen CJ, May GD y Van Eck JM (2001) *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar Rasthali (AAB). *Plant Cell Reports* 20:157-162
- Gómez R, Gilliard T, Barranco LA y Reyes M (2000) Embriogénesis somática en medios líquidos. Maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido FHIA-18 (AAAB). *InfoMusa* 9(1):12-16
- May GD, Afza R, Mason HS, Wiecek A, Novak FJ y Arntzen CJ (1995) Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biotechnology* 13:486-492
- Murashige, T y Skoog R (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 5:173-197
- Pérez, J.B (2000) Development and application of *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation to increase fungus resistance in banana (*Musa* spp.). Ph. D. Thesis, K. U. Leuven, Belgium. 186 p
- Remy, S, Coemans B, Buyse S, Moller-Nielsen N, Santos E, De Weerd G, Swennen R y Sagi L (2002) Promotor tagging in banana. Third International Symposium on Molecular and Cellular Biology of Bananas. Leuven, Belgium. 9-11 September. INIBAP
- Sági, L, Remy S, Panis B, Swennen R y Volckaert G (1994) Transient gene expression in electroporated banana (*Musa* spp., cv. 'Bluggoe' ABB group) protoplasts isolated from regenerable embryogenic cell suspensions. *Plant Cell Reports* 13 (5): 262-266
- Sági, L, Remy S, Cammue B, Maes K, Raemaekers T, Panis B, Schoofs H y Swennen R (2000) Production of transgenic banana and plantain. *Acta Horticulturae* 540:203-206
- Sánchez, RR, Pino JA, Vallin C, Pérez ME, Iznaga Y y Malpartida F (2002) Efecto del fungicida natural F20 contra la enfermedad Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano (AAB) y banano (AAA). *InfoMusa* 11(1):14-16