

## Obtención de plantas transgénicas de papaya var. Maradol roja que portan el gen de la orizacistatina de arroz

Milady F. Mendoza<sup>1\*</sup>, Ana Luisa Darias<sup>1</sup>, Maylín Cruz<sup>2</sup>, Jorge Gallardo<sup>1</sup>, Marisol Tejeda<sup>1</sup>, Rafael Gómez<sup>1</sup> y Orelvis Portal<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: milady@ibp.co.cu

<sup>2</sup> Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera Maleza km 2 ½. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

### RESUMEN

La papaya (*Carica papaya* L.), es severamente afectada por el Virus de la Mancha Anular, el cual pertenece al grupo de los potivirus de plantas. Una reciente estrategia para el control de esta enfermedad, es la transformación con genes que codifican para inhibidores de proteinasas del tipo cisteínico. El gen de la orizacistatina de arroz que codifica para una cistatina, fue insertado en el vector binario pCAMBIA 3300, para la transformación genética de embriones somáticos de papaya var. Maradol roja, mediada por pistola de genes. La integración del gen fue confirmada mediante la reacción en cadena de la polimerasa con el empleo de oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia del gen *bar*. De un total de 80 líneas transgénicas *in vitro* de papaya 40 amplificaron un fragmento de 402 pares de bases que se corresponde con el tamaño esperado.

Palabras clave: *Carica papaya*, ingeniería genética, inhibidor de proteinasas, potivirus

### ABSTRACT

Papaya (*Carica papaya* L.), is severely affected by Papaya Ringspot virus, which belongs to plant potyvirus group. A recent strategy for pest control produced by this virus is the transformation with genes encoding cysteine proteinase inhibitors. Rice oryzacistatin gene encoding for cystatins, was inserted in a pCAMBIA binary vector, for genetic transformation of papaya somatic embryos var. Maradol roja, mediated by gene gun. Gene integration was confirmed by means of polymerase chain reaction using the primers designed from gene *bar* sequence. Forty out of eighty *in vitro* transgenic papaya lines amplified a 402 fragment which correspond to the expecting size.

Key words: *Carica papaya*, genetic engineering, potyvirus, proteinase inhibitor

### INTRODUCCIÓN

Los potivirus constituyen el mayor y más importante grupo de virus de plantas transmitidos por áfidos y dentro del cual el Virus de la Mancha Anular de la papaya (PRSV, de sus siglas en inglés *Papaya Ringspot Virus*), causa las mayores afectaciones en el cultivo de la papaya (*Carica papaya* L.) (Gonsalves, 1998). Un método alternativo para su control resulta la utilización de las técnicas de transformación genética de plantas, a través de la transferencia y expresión de un determinado gen (Dasgupta *et al.*, 2003). Ciertos niveles de resistencia han sido logrados mediante la transformación con genes de resistencia virales naturales o con ácido ribonucleico (ARN) sentido o antisentido, correspondiente a segmentos del genoma viral (Waterhouse *et al.*, 1998).

El genoma del PRSV, codifica para una poliproteína que es procesada proteolíticamente, por la acción fundamental de tres proteasas codificadas por el virus. De ellas la proteasa amino terminal P1 y el componente de ayuda (HC-Pro, de sus siglas en inglés *Helper Component Protease*), derivan de la región amino terminal de la poliproteína y son autocatalíticamente escindidas en su extremo carboxilo terminal y

específicamente esta última es del tipo cisteínico. Estas proteínas están involucradas en otras funciones dentro del ciclo de replicación del virus o en su movimiento intercelular. La tercera proteasa es la de inclusión nuclear (NIa, de sus siglas en inglés *Nuclear Inclusion Protease*), que al igual que HC-Pro es una proteasa cisteína-tripsina, responsable del corte de la proteína en cinco locaciones diferentes, caracterizadas por secuencias muy conservadas (Kang *et al.*, 2001). Un paso esencial para la replicación de los potivirus, es la actividad de estas proteasas del tipo cisteínico, por lo que la inhibición de la acción de la proteína podría interrumpir el proceso de replicación de virus. Plantas transgénicas modificadas con genes de cistatinas han resultado promisorias en el control de insectos, hongos y virus fitopatógenos (Cipriani *et al.*, 1999).

Las cistatinas han sido estudiadas principalmente en células animales, aunque también se han encontrado en varias partes en las plantas: como en semillas, tubérculos y frutos maduros. En plantas se le confieren dos funciones fundamentales, una en la regulación del desdoblamiento de las proteínas y la otra en la resistencia contra insectos y otros patógenos. Se ha demostrado que inhiben las proteinasas digestivas del

tipo cisteínico del intestino en insectos y por lo tanto poseen actividad insecticida (Gutiérrez-Campos *et al.*, 1999).

Plantas transgénicas de tabaco y papa que expresaban el gen de la orizacistatina I, mostraron correlación entre los niveles de expresión de la proteína y la resistencia al Virus del Grabado del tabaco (TEV, de sus siglas en inglés *Tobacco Etch Virus*) y al virus Y de la papa (PVY, de sus siglas en inglés *Potato Virus Y*) respectivamente (Gutiérrez-Campos *et al.*, 1999).

El objetivo de este trabajo fue la obtención de plantas transgénicas de papaya con el gen de la orizacistatina de arroz (*Oryza sativa*), lo que constituye un método alternativo, novedoso y específico, el cual no ha sido referido con anterioridad, para el control de la infección por el Virus de la Mancha Anular de la papaya.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Estrategia para la construcción del plásmido binario

Al fragmento del gen de la orizacistatina de arroz proveniente del plásmido pKYLX80, previamente digerido con *Xho* I y *Xba* I (New England Biolabs, USA), se le rellenaron sus extremos mediante la acción de la ADN polimerasa, fragmento mayor. Se transfirió al sitio *Sma* I del vector plasmídico intermediario pBPFW8 (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Cuba), bajo el control del promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV, de sus siglas en inglés *Cauliflower Mosaic Virus*). La orientación del casete en el plásmido se comprobó por digestión enzimática con las enzimas *Bam*H I-*Kpn* I, *Hind* III y *Sal* I. El plásmido obtenido fue digerido con la enzima *Sph* I y el producto fue clonado en el sitio *Sma* I del plásmido pCAMBIA 3300 (CAMBIA, 1997), obteniéndose la construcción final pCAMBIA-ory. La orientación del fragmento clonado se obtuvo por el análisis con las enzimas, *Eco*R I, *Kpn* I, *Sal* I, *Xba* I.

Los fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) se purificaron con el kit *DNA and Gel Band Purification* (Amersham Life Science, UK) y la visualización del ADN se realizó en gel de agarosa al 0.8 % y teñido con bromuro de etidio (0.5 ì g.ml<sup>-1</sup>).

### Proceso de transformación

Se emplearon como material vegetal de partida embriones somáticos de papaya var. Maradol roja, obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros, siguiendo la metodología propuesta por Posada (1995).

La transformación genética se realizó por biobalística, con el empleo de una pistola de genes de baja presión de argón como gas propulsor (CINVESTAV, 2000), modificando la presión del disparo a 140 psi y la distancia de disparo a 9cm según lo descrito por Más

*et al.* (2002). Los embriones fueron disparados con el plásmido binario pCAMBIA-ory (que porta el gen de la orizacistatina). Para la preparación de las partículas de tungsteno se siguió el protocolo descrito por Sanford *et al.* (1992). Los embriones disparados se colocaron para su selección, pasados los diez días, en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 10mg.l<sup>-1</sup> de BASTA® comercial (AgrEvo, GMBH, Alemania). Después de dos subcultivos de treinta días cada uno, se colocaron en un medio de cultivo para la germinación de embriones somáticos, en el que permanecieron por igual período de tiempo, a partir del cual se separaron por líneas y luego se colocaron en medio de cultivo de propagación de papaya (Posada, 1995).

## Análisis molecular de las plantas

### Extracción de ADN total

El ADN total fue extraído a partir de 100mg de tejido foliar, proveniente de cada una de las plantas *in vitro* de papaya, según el protocolo descrito por Dellaporta *et al.* (1983) modificado. Cada muestra fue tratada con 10mg.ml<sup>-1</sup> de RNasa (Boehringer Mannheim) durante una hora, antes de su cuantificación espectrofotométrica en el *GeneQuantpro* (Amersham Pharmacia Biotech). La integridad fue visualizada en gel de agarosa 0.8 % y teñido con bromuro de etidio 0.5 ì g.ml<sup>-1</sup>.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la realización del PCR se emplearon 10ng de ADN total, libre de ácido ribonucleico (ARN), purificado a partir de plantas *in vitro* de papaya transformadas. Se utilizaron los 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'), diseñados para amplificar un fragmento de 402 pares de bases (pb) del gen que confiere resistencia a fosfotricina. Las condiciones utilizadas para el PCR fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 4min, seguida de 35 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 1min, complementación a 62 °C por 1min y extensión a 72 °C por 90s, con una extensión final a 72 °C por 7min.

El producto de la amplificación fue visualizado en un gel de agarosa 0.8 % y teñido con bromuro de etidio 0.5 ì g.ml<sup>-1</sup>. Las amplificaciones se realizaron en una máquina de *PCR eppendorf Mastercycler® personal* (Germany).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estrategia para la construcción del plásmido binario

Se obtuvo la construcción plasmídica pBPFU8-ory (5.0 kb), que porta el fragmento de 643 pb correspondiente al gen de la orizacistatina de arroz (plásmidos recombinantes 1, 7 y 9). Como resultado del análisis

de restricción se concluyó, que el gen quedó orientado en el mismo sentido con respecto al promotor 35 S y el terminador en cada plasmidio (Figura 1). De la inserción de la construcción quimérica en el vector pCAMBIA 3300, se obtuvieron los plasmidios recombinantes pCAMBIA-ory 13 y 22, donde la ubicación del casete de expresión del gen de la orizacistatina está en el sentido del promotor y del gen de la fosfinotricina en pCAMBIA-ory 22 y contrario en pCAMBIA-ory 13, según el análisis realizado por restricción enzimática (Figura 2). Los tamaños de los fragmentos de ADN obtenidos después de cada digestión enzimática, se correspondieron con los esperados a partir del estudio previo de las secuencias nucleotídicas empleadas. El plasmidio pCAMBIA-ory 22 fue seleccionado para el proceso de transformación. La estrategia seguida para la construcción del vector binario, permitió la ubicación correcta del gen en relación con las secuencias regulatorias, lo que garantizará la eficaz expresión de la proteína en la planta.

### Proceso de transformación

El protocolo de transformación desarrollado permitió la obtención de ochenta líneas de plantas *in vitro* de papaya. La optimización del mismo fue realizada por Más *et al.* (2000) y utilizado con éxito en este cultivo

para la transformación con otros genes de interés (Pons, 2001). En este caso la utilización del BASTA® como marcador de selección, resultó ser adecuada para la identificación de las plantas transformadas, aún cuando existió cierto escape durante el proceso.

### Análisis molecular de las plantas

Fueron confirmadas por PCR 40 líneas de plantas transgénicas de un total de 80, con los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia del gen *bar*, que codifica para la fosfinotricina acetiltransferasa. Como resultado de la amplificación por PCR se observó un producto de 402 pares de bases, lo cual se corresponde con el tamaño esperado (Figura 3). El PCR, es una de las técnicas moleculares que permite hacer un primer chequeo de la eficiencia de la integración de genes foráneos en el genoma de plantas transformadas y ha sido utilizada ampliamente con este fin en todos los trabajos de transformación genética realizados. Las líneas de plantas positivas resultantes de este análisis, han sido mantenidas *in vitro* para la realización de ensayos de Southern blot, actividad enzimática, validar lo obtenido por PCR, así como conocer el número de inserciones y la funcionalidad del gen de la orizacistatina de arroz respectivamente.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

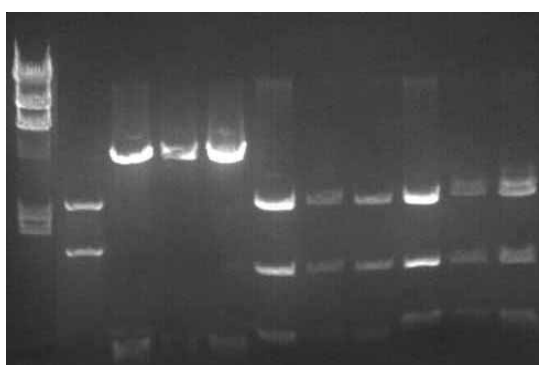


Figura 1. Análisis por restricción enzimática de la orientación del gen de la orizacistatina de arroz en los plasmidios recombinantes pBPFÜ8-ory 1, 7 y 9. Gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio. 1) I-*Hind* III, 2) pBPFÜ8 digerido *Pst* I, 3-5) digestión *Bam*H I-*Kpn* I, 6-8) digestión *Hind* III, 9-11) digestión *Sal* I.

1 2 3 4 5 6 7 8 9

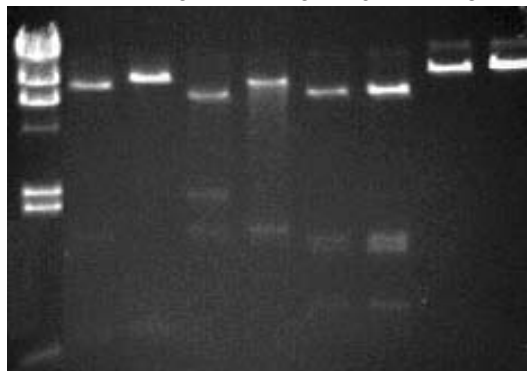


Figura 2. Análisis por restricción enzimática de la orientación del gen de la orizacistatina de arroz en los plasmidios recombinantes pCAMBIA-ory 13 y 22. Gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio. 1) I-*Hind* III, 2-3) digestión *Eco*R I, 4-5) digestión *Kpn* I, 6-7) digestión *Sal* I, 9-10) digestión *Xba* I.

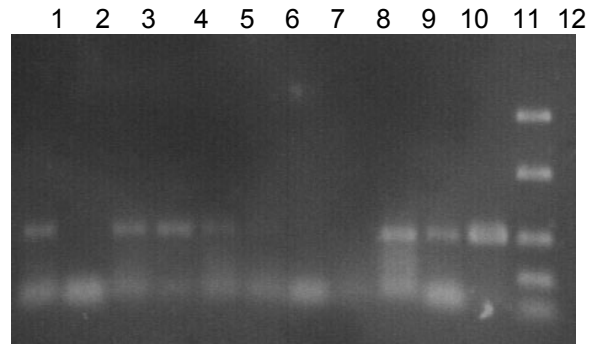


Figura 3. Análisis por PCR de ADN total aislado a partir de plantas de papaya supuestamente transgénicas. Gel de agarosa 0.8 % teñido con bromuro de etidio. 1-11) ADN de plantas de papaya, 12) Fast Ruler DNA ladder Low range.

## REFERENCIAS

- CAMBIA (1997) Cambia vectors Center of Application of Molecular Biology to International Agriculture CINVESTAV (2000) Centro de Investigación y estudios avanzados del IPN.
- Cipriani, G, Fuentes S, Bello V, Salazar LF, Ghislain M, Zhang P (1999) Transgene Expression of Rice Cysteine Proteinase Inhibitors for the development of Resistance against Sweetpotato Feathery Mottle Virus. Research on potato, pp. 267-271. CIP Program Report
- Dasgupta, I, Malathi VG, Mukherjee SK (2003) Genetic engineering for virus resistance. Current Science 84 (3): 341-354
- Dellaporta, SL, Wood J, Hincas JB (1983) A plant DNA miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Report 1: 19-21
- Gonsalves, D (1998) Control of papaya Ringspot virus in Papaya. A case of study. Annu. Rev. Phytopathol 36: 415-437
- Gutiérrez, R, Torres JA, Saucedo LJ, Gómez MA (1999) The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. Nature Biotechnology 17 (12): 1223-1226
- Más, L, Agüero G, Gil V, Reyes M, Gómez R, Ocaña, Martínez S (2000) Optimización de parámetros en la transformación de embriones somáticos de banano utilizando pistola de genes. Biotecnología Vegetal 1: 51-54
- Más, L, Chong B, Gómez R, Gallardo J, Herrera I, Reyes M (2002) Parámetros óptimos en la transformación de embriones somáticos de papaya empleando una pistola de genes de baja presión. Biotecnología Vegetal 2: 101-105
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15: 473-497
- Pons, M (2001) Transformación genética de papaya (*Carica papaya* L.) mediante biobalística. Tesis para la obtención del grado científico maestro en Ciencias en Biotecnología Vegetal. IBP. UCLV
- Posada, L (1995) Desarrollo de la embriogénesis somática en la Fruta Bomba (*Carica papaya* L.). Trabajo de Diploma. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UCLV
- Sanford, J, Smith F, Russell J (1992) Optimizing the biolistic process for different biological applications. Methods Enzymology 217: 483-509
- Waterhouse, PM, Graham MW, Wang M-B (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 13959-13964
- Kang, H, Jae Y, Hwan J, Jin W (2001) Determination of the substrate specificity of turnip mosaic virus NIa protease using a genetic method. Journal of General Virology 82: 3115-3117