

MEJORA GENÉTICA DE PLANTAS POR BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN AGROMORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LINEAS ENDOGÁMICAS DE MAÍZ (*ZEA MAYS*)

Daymara Rodríguez^{1*}, Andrés Morales¹, Miriam Isidró¹, Evelyn Valera¹, Katia Gil², Emigdia Alfaro², June Simpson². *Autor para correspondencia.

¹Grupo de Biotecnología Vegetal. Universidad Agraria de La Habana. Autopista Nac. km 23, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, CP 18-19. e-mail: maviak@isch.edu.cu

²Departamento de Ingeniería Genética. CINVESTAV, Unidad de Irapuato. Apdo postal 629, Irapuato, Guanajuato, México.

RESUMEN

Con vistas a obtener material genéticamente adaptado a bajos insumos se realizaron autofecundaciones sucesivas al germoplasma de maíces cultivados en Cuba provenientes de productores, lo que llevó a cuatro líneas endogámicas seleccionadas por su comportamiento favorable en esas condiciones, con color de granos blanco, rojo, amarillo y anaranjado, respectivamente, con las que se desarrolló un ensayo agronómico en condiciones de campo y se aplicaron marcadores moleculares de ADN. La siembra se realizó en un suelo Ferralítico Rojo lixiviado con un diseño de bloques al azar; se evaluaron 20 plantas por réplica mediante el descriptor CIMMYT/IBPGR; para el procesamiento de los datos se aplicó el paquete estadístico ANOVA aplicando la prueba de Duncan para un 95 % de probabilidad. La extracción de ADN para el análisis molecular se realizó a partir de hojas jóvenes mediante un *kit* de la firma Promega. Se aplicó la técnica de AFLP para estudiar el grado de homología entre los materiales. Se emplearon cuatro combinaciones de cebadores (Eco RI+AAG x Mse I+AAG, ECO RI+ AGG y dNTPs) para la amplificación selectiva. En el análisis molecular, a partir de los datos generados, se hizo una matriz de similitud genética y con ella una de distancia genética. A partir de esta última se generó un dendrograma con el empleo del método UPGMA. En cuanto al potencial productivo y otros caracteres se destacaron las líneas de granos de color anaranjado y rojos, aunque las cuatro manifestaron buena resistencia y precocidad. En el análisis de los AFLPs, se aprecian dos grupos, uno con la línea de granos color naranja y el otro formado por el resto de los materiales. Futuros estudios agronómicos se encaminarán para evaluar el comportamiento de híbridos y líneas en varias localidades.

Palabra clave: AFLPs, descriptor, líneas autofecundadas, maíz

EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA EN PLANTAS DEL CLON 'NAVOLEAN' (*MUSA SPP.*) OBTENIDAS POR MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS

Leneidy Pérez Pelea^{*1}, María Isabel Román², Jorge López², Clara González¹, Xonia Xiqués¹, Alejandro Rojas¹. *Autor para correspondencia.

¹Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Calle 25 #455 e/ I y J, Vedado, Plaza, C. Habana. email: lene@fbio.uh.cu

²Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo 6, Sto Dgo., Villa Clara, CP 53 000. Cuba.

RESUMEN

Se realizó la evaluación de la estabilidad genética, con el empleo de marcadores citogenéticos y genético-bioquímicos, en plantas del clon de plátanos 'Navolean' (*Musa spp.* grupo AAB) pertenecientes a la colección de plátanos y bananos del Banco de Germoplasma del Instituto de Investigaciones en Viandas

Tropicales (INIVIT), obtenidas por embriogénesis somática a partir de domos meristemáticos de multiyemas y de una nueva fuente de explante: domos meristemáticos de yemas brotadas, en comparación con plantas propagadas por organogénesis (ápices meristemáticos) y por el método convencional (por cormos). El análisis citogenético se realizó en raíces de las plantas obtenidas por los diferentes métodos de propagación y permitió determinar que se mantuvo estable el número de cromosomas del clon al encontrar en todas las células analizadas $2n=3x=33$ cromosomas, lo que confirma su condición triploide. El estudio genético-bioquímico mostró un marcado monomorfismo para los sistemas isoenzimáticos analizados (Peroxidasas, Polifenoloxidasas, Esterasas y Anhidrasa carbónica) para las vitroplantas y las plantas de campo obtenidas por los diferentes métodos de propagación, lo cual demostró que los métodos biotecnológicos utilizados no producen variación genética en el material. Al evaluar los embriones somáticos en distintas etapas del proceso de embriogénesis somática, todos los sistemas isoenzimáticos empleados mostraron un alto grado de polimorfismo y resultaron ser marcadores de las etapas de maduración en este proceso, al observarse bandas propias en los embriones que se encontraban en la fase más avanzada de la maduración.

Palabras clave: domos meristemáticos, marcadores citogenéticos, *Musa* spp.

OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE MUTANTES RESISTENTES A LA ROYA DE LA CAÑA DE AZÚCAR (*PUCCINIA MELANOCEPHALA* H Y P SYDOW. MEDIANTE EL CULTIVO *IN VITRO* Y TRATAMIENTO CON RADIACIONES GAMMA (^{60}Co) DE CALLOS DE LA VARIEDAD DE CAÑA DE AZÚCAR (*SACHARUM* SPP. HÍBRIDO) SP 70-1284

P. Orellana*, B.A. Valdés, R.L. García, N. Veitía, Idalmis Bermúdez-Carabaloso, Y. Padrón, D. Torres, C. Romero. *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. e-mail: orellana@ibp.co.cu

RESUMEN

El cultivo de tejidos combinado con la mutagénesis *in vitro* son herramientas útiles para inducir variabilidad y reducir el tiempo en la selección de variedades con adecuadas características productivas y resistentes a enfermedades. Con base en lo anterior se desarrolló en el IBP, en Santa Clara, Cuba y en el campo experimental del Colegio de Postgraduados en Tabasco, México un trabajo de investigación, cuyo objetivo fue la obtención de mutantes resistentes a la roya de la caña de azúcar para esa región de México, a partir del cultivar susceptible SP 70- 1284. En el IBP se estudió la formación, crecimiento y regeneración adecuada de callos, se emplearon como fuente para inducir variabilidad genética, las radiaciones gamma (^{60}Co), determinándose como mejor la dosis de 30 Gy aplicada en la fase crecimiento del callo. La selección en fase temprana para la infección por roya y presencia de variaciones fenotípicas, se efectuó durante tres ciclos bajo condiciones semicontroladas en Cuba. Las plantas seleccionadas con respuestas hasta grado 3 a la roya, se evaluaron en campo durante tres ciclos en Tabasco. En las evaluaciones y análisis del comportamiento en varios experimentos en las dos localidades de estudio, tres mutantes mostraron resistencia estable a la roya. De ellos, el mutante 7 por su alta resistencia a la roya y diferencias en algunas características agro morfológicas y genéticas a nivel molecular, pero de bajo potencial productivo con respecto al control, es un nuevo genotipo de utilidad en programas de mejoramiento genético y para estudios de mapeo genético. Los mutantes 2 y 3 con respuesta resistente y características morfológicas similares al control, pueden considerarse mutantes con potencial comercial para la región de Tabasco. Se propone un esquema de trabajo para obtener mutantes resistentes a la partir de genotipos susceptibles a la roya.

Palabras clave: cultivo de tejidos, selección, variabilidad genética

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS

ANÁLISIS PRIMARIO DE LOS MICROORGANISMOS DE LA RIZOSFERA Y LA ENTOMOFAUNA FOLIAR EN UN ÁREA DE EXPERIMENTACIÓN PLANTADA CON BANANO Y PLÁTANO TRANSGÉNICOS

J.M. Machado-Rodríguez^{1*}, H. Grillo², C. Pérez², Zuleika Martínez³, Yelenys Alvarado-Capó¹, Michel Leiva-Mora¹, Norma Suárez³, Ana L. Darias¹ y R. G. Kosky¹. *Autor para correspondencia.

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

²Centro de Investigaciones Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km. 5 ½, Santa Clara, V.C., Cuba.

³Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5 ½, Santa Clara, V.C., Cuba.

⁴Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, Carretera de Malezas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

RESUMEN

Para la evaluación de riesgos de organismos vivos modificados genéticamente, liberados al medio ambiente de manera controlada, se aplican diversas técnicas para el monitoreo de aquellas variables que interactúan con el medio ambiente y la planta transgénica en sí. Antes de establecer parámetros que definan una desviación dada que pueda inferirse como un impacto al medio ambiente, es necesario hacer análisis previos que orienten la situación en el área de experimentación. Con ese fin se realizó una evaluación primaria de la microflora de la rizosfera, de los plátanos y bananos transgénicos así como de los controles no transgénicos. De la misma manera se procedió a hacer un inventario de la entomofauna presente sobre las plantas en experimentación por simple inspección, colecta de ejemplares y las variaciones poblacionales del *Tetranychus tumidus* Banks. Los conteos de la microflora mostraron una variación inicial que debe ser tenida en cuenta para las ulteriores investigaciones. Los resultados primarios obtenidos sirven como base para los estudios en la extensión del experimento a áreas mayores de terreno.

Palabras clave: evaluación de riesgo, medio ambiente, plantas transgénicas

MICROFLORA, RIZOSPHERA AND ENTOMOLOGICAL PRELIMINARY ANALYSIS ON A TRANSGENIC BANANA AND PLANTAIN FIELD TRIAL

ABSTRACT

In risk assessment with live transgenic organisms (LTO), which are released in the environment to perform field trials under control measures, a few techniques are applied to monitor the risk that involve the interaction between transgenic plants and the environment itself. In order to have valuable parameters in the beginning of the trial, it is necessary to make some primary analysis in the experimental area. The microflora of the rhizosphere from transgenic plantain and banana, as well as from non-transformed controls were evaluated. On the other hand a list of insects present on the leaves of transgenic plants was developed, after they were collected and submitted to classification, at the same time we studied the variation of colonies of *Tetranychus tumidus* Banks. The results from microorganisms counting showed that there were differences to be taken into account in further researches. This study can be a starting point for risk assessment on more extensive experimental areas.

Key words: environment risk assessment, transgenic plants

CAMBIOS BIOQUÍMICOS EN PLANTAS TRANSFORMADAS DE PIÑA

L. Yabor*, M. Arzola, C. Aragón, M. Hernandez, A. Arencibia, J.C. Lorenzo. *Autor para correspondencia.

Laboratory for Plant Breeding, Bioplant Center, University of Ciego de Avila, 69 450, Cuba.
e-mail: lyabor@bioplantillas.cu

RESUMEN

La piña es una de las frutas tropicales más importantes, por tanto en muchos países se han llevado a cabo intensivos programas de mejoramiento genético. Cuba es uno de ellos. Este trabajo muestra los datos sobre los efectos del herbicida FINALE (0, 15 y 30 días) sobre las plantas de piña transformadas que portan el gen *bar*. En comparación con las plantas no transformadas, las plantas de piña transformadas sobrevivieron al efecto del herbicida y mostraron un incremento de malondialdehído, otros aldehídos, clorofilas a, b y totales y contenido de fenoles libres como resultado de la aplicación del herbicida FINALE. Sin embargo, las plantas transformadas no mostraron incremento de fenoles ligados a la pared celular. El análisis estadístico de la actividad peroxidasa después de la aplicación del herbicida no mostró diferencias entre ambos grupos de plantas (no transformadas y transformadas) y se incrementó la actividad durante la evaluación del experimento. El análisis estadístico del contenido de proteínas después de asperjar el herbicida FINALE, no mostró ningún efecto en el transcurso del tiempo. Sin embargo, en general el contenido de proteínas fue estadísticamente superior en plántulas no transformadas que en plántulas transformadas. En este experimento, la transformación genética de piña con el gen *bar* no solo confirió resistencia al herbicida FINALE sino que además promovió varios eventos bioquímicos adicionales. Estos eventos pudieran modificar importantes caracteres agrícolas en las plantas de piña, que en futuros experimentos serán estudiados en condiciones de campo.

Palabras clave: *Ananas comosus* (L.) Merr., cambios bioquímicos, transformación genética

BIOCHEMICAL SIDE EFFECTS OF TRANSFORMED PINEAPPLE PLANTS

ABSTRACT

Pineapple is one of the most important tropical fruit and therefore intensive genetic improvement programs are being carried out in many countries. Cuba is one of them. This report shows data about the effects (0-30 days) of herbicide FINALE on *bar* gene-containing pineapple plantlets. In comparison with non-transformed plantlets: transformed pineapples survived the application of the herbicide and showed an increase of malondialdehyde, other aldehydes, chlorophyll (*a*, *b*, total) and free phenolics contents as results of FINALE application. However, transformed plants did not show increases of cell wall-linked phenolics. Statistical analysis of peroxidase activity after herbicide application did not show difference between both groups of plantlets (non-transformed and transformed) and the activity increased during the experiment. Statistical analysis of protein contents after FINALE spraying showed no-effects of the time course. However, in general, protein content was statistically higher in non-transformed than in transformed plantlets. In our experiment, genetic transformation of pineapple with *bar* gene not only conferred resistance to herbicide FINALE but also promoted several additional biochemical events. Those events could modify important agricultural traits of pineapple plants that will be studied under fields conditions in futures researches.

Key words: *Ananas comosus* (L.) Merr., biochemical changes, genetic transformation

EFFECTOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DE LA APLICACIÓN DEL ETHREL-480 Y EL NITRATO DE AMONIO EN CAÑA DE AZÚCAR (*SACCHARUM SP. HÍBRIDO*) VAR. CP52-43

Janet Quiñones¹, Yanelis Capdesuñer^{1*}, Janetsy Borroto¹, Orlando Borrás², María A. Blanco¹, Yanet Tambara², Maribel Rivas¹, Hipólito Peralta³, Mayra Rodríguez²; Eduardo Canales, Maylin Rodríguez³, Liudmila Chavez², Justo González¹. *Autor para correspondencia.

¹Centro de Bioplantillas, Carretera a Morón km 9. CP 69450. Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila. Cuba. e-mail: jquinones@bioplantillas.cu

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.

³Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.

RESUMEN

La búsqueda de variedades mejoradas de caña de azúcar con alto contenido azucarero y para la alimentación animal son objetivos priorizados en Cuba. Una forma de contribuir a lograr ambos objetivos es manipulando genes relacionados con los procesos de maduración y asimilación de nitrógeno. Por lo que en el presente trabajo se evaluaron los efectos químicos, bioquímicos y moleculares de la aplicación del Ethrel-480 y nitrato de amonio en caña de azúcar var. 'CP52-43'. Para ello se desarrollaron dos experimentos bajo condiciones controladas en áreas del Centro de Bioplantas. Se empleó el Ethrel-480 a razón de 1 g.l⁻¹ de i.a. para evaluar indicadores químicos (polisacáridos, glucosa, fructosa, sacarosa) y bioquímicos (sacarosa fosfato sintasa (SFS) e invertasas ácidas solubles (IAS)) del metabolismo del carbono y (nitrato reductasa (NR) y proteínas) del metabolismo del nitrógeno, se determinó además la relación carbono nitrógeno. Para evaluar la expresión diferencial de genes mediante AFLP-ADNc se aplicó Ethrel-480 a razón de 1 g.l⁻¹ de i.a y nitrato de amonio a 0.2 g.l⁻¹. El Ethrel-480 estimuló cambios metabólicos en plantas tratadas con respecto a las plantas no tratadas: un incremento de la sacarosa con disminución de la fructosa en hojas a los 7 días después de la aplicación; un incremento de la actividad de la SFS, y de los contenidos de polisacáridos y sacarosa, y una reducción de la actividad de las IA y de los contenidos de glucosa, fructosa y proteínas a los 14 días en tallos. Al analizar la relación C:N, se mostraron valores superiores en las plantas tratadas, indicando que se favoreció el metabolismo del carbono y se obtuvieron 18 y 9 bandas diferenciales relacionadas con los tratamientos con Ethrel-480 y nitrato de amonio respectivamente.

Palabras clave: AFLP-ADNc, caña de azúcar, etileno, ethrel-480, sacarosa

ABSTRACT

The search of improved varieties of sugar cane with high sugar content and for the feeding animal objective is prioritized in Cuba. A form to contribute to obtain both objectives is manipulating genes related to the maturation processes and nitrogen assimilation. Reason why in the present work the chemical effects, biochemical and molecular of the application of the Ethrel-480 and ammonium nitrate were evaluated to var. 'CP52-43'. For it, two experiments under conditions controlled in areas of the Bioplant Center were developed. The Ethrel-480 at the rate of 1 g.l⁻¹ of i.a. was used to evaluate chemical tracers (polysaccharides, glucose, fructose, sucrose) and biochemists (sucrose phosphate sintase (SPS) and soluble acid invertase (SAI)) of the metabolism of carbon and (nitrate reductasa (NR) and proteins) of the metabolism of nitrogen, the relation was determined in addition carbon nitrogen. In order to evaluate the differential expression of genes by means of AFLPcDNA it was applied to Ethrel-480 at the rate of 1 g.l⁻¹ of i.a and ammonium nitrate to 0.2 g.l⁻¹. The Ethrel-480 stimulated metabolic changes in plants treated with respect to the plants nontreated: an increase of sucrose with decrease of the fructose one in leaves to the 7 days after the application: an increase of the activity of the SFS, and the contents of polysaccharides and sucrose, and a reduction of the activity of the IA and the contents of glucose, fructose and proteins to the 14 days in stems. When analyzing relation C:N, were superior values in the treated plants, indicating that the metabolism of carbon was stimulated and 18 and 9 bands were obtained respectively differentials related to the treatments with Ethrel-480 and ammonium nitrate.

Key words: AFLP-cDNA, ethylene, ethrel-480, sucrose, sugarcane

GEN MODIFICADO DE *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR *TENEBRIONIS* PARA ALTOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA TOXINA INSECTICIDA CRY 3A EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE BONIATO (*IPOMOEA BATATAS*)

Irene Alvarez*, Rolando Morán, Barbaro Usatorres, Zurima Zaldúa, Danalay Somonte, Tania Olivera.

*Autor para correspondencia.

Laboratorio de Biología Molecular de Plantas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado postal 387. Camagüey 70100. Cuba. e-mail: irene.alvarez@cigb.edu.cu

RESUMEN

La expresión de las Cry á-endotoxinas en plantas es una valiosa herramienta para el control de insectos debido a que estas se unen específicamente a receptores de su tracto medio intestinal causando la lisis celular y muerte en pocos días. Se ha informado del uso del gen sintético *cry3a* de *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* como un controlador potencial activo contra coleópteros, mediante la expresión de la toxina Cry 3A. Para obtener plantas transgénicas de Boniato (*Ipomoea batatas*) resistentes al ataque del Tetuán (*Cylas formicarius*) mediante la alta expresión de este gen, se diseñó una estrategia para lograr una versión sintética vegetalizada del *cry3a* nativo. Las modificaciones realizadas a este gen para la expresión óptima en plantas

han sido informadas previamente. Se sintetizaron cinco fragmentos de ADN con un rango de tallas entre los 200 y 400 pb. La ligación de estos fragmentos se llevó a cabo por protocolos convencionales y se precedió de una reacción de fosforilación en tampón T4 ADN Ligasa. El producto de la ligación fue amplificado por P.C.R con la enzima *Taq* Polimerasa. La banda de 1833 pb que se obtuvo de la reacción de amplificación se clonó en vector pBluescript de *E. coli* tratado Smal/ CIP. Los clones positivos fueron seleccionados por análisis de restricción y secuenciación. En todos los casos se comprobó que el ensamblaje de los cinco fragmentos fue correcto, sin embargo, se observaron varias diferencias puntuales en la secuencia nucleotídica del gen con relación a la diseñada, por lo que se repitió el evento de polimerización con una enzima de alta fidelidad (*Pfu* Polimerasa). Sin embargo, nuevamente los resultados de la secuenciación indicaron algunas sustituciones nucleotídicas aunque en más baja frecuencia por lo que se ejecutó una estrategia de clonaje donde se combinaron las regiones correctas de tres de los clones obtenidos. Del resultado de esta clonación pudo aislarse el gen *cry 3a* sintético para la obtención del vector de transformación de plantas: plasmidio pCKGS. Plantas de boniato de la variedad 'CEMSA 78-354' se transformaron vía *Agrobacterium tumefaciens* con esta construcción sintética y fueron caracterizadas por la actividad biológica contra el Tetuán, evaluando el porcentaje de infestación en condiciones controladas y de campo; y por ensayos moleculares. El clon denominado C-26 fue el que mostró los mayores niveles de expresión de la toxina y la mejor protección contra el ataque del insecto.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, boniato, á-endotoxina, gen sintético *cry 3a*, plantas transgénicas

MODIFIED *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR *TENEBRIONIS* GENE FOR HIGH EXPRESSION LEVELS OF CRY 3A TOXIN IN TRANSGENIC SWEET POTATO (*IPOMOEA BATATAS*) PLANTS

ABSTRACT

Cry á-endotoxin expression in plants is a valuable tool for pest insect control because á-endotoxin binds specifically to receptors at insect gut level, causing cell lysis and insect death in a few days. The design and synthesis of a coleopteran active *cry3a* gene from *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* for optimized expression in plants has been reported. To obtain Sweet Potato (*Ipomoea batatas*) transgenic plants resistant to Weevil (*Cylas formicarius*) attack through high expression levels of Cry 3A toxin, a strategy including a synthetic version of the native *cry3a* gene was designed. Genetic modifications for optimal expression in plants had been previously reported. Five DNA fragments ranging from 200 to 400 bp were synthesized. Ligation of these fragments was carried out by conventional protocols, preceded by phosphorylation in T4 DNA Ligase buffer. Ligation reaction rendered mostly five fragments in the expected arrangement. However, the amount of DNA was not enough to be cloned directly, so amplification by P.C.R was carried out with *Taq* Polymerase. A 1833 bp band was obtained as P.C.R. product and cloned in a pBluescript *E. coli* vector Smal/CIP treated. Positive clones were selected by restriction analysis. Sequencing results confirmed the correct fragment assembling, however, some nucleotide differences compared with the expected sequence were observed in all clones. To obtain a construct with the appropriate sequence, polymerization with high fidelity *Pfu* Polymerase was carried out. However, sequencing results indicated some base substitutions, in a lower frequency than *Taq* Polymerase amplified clones. An effective cloning strategy, combining gene regions with the correct sequences was performed. Several clones containing the synthetic construct with the expected sequence were obtained. A plant transformation vector containing the designed synthetic *cry3a* gene (plasmid pCKGS) was obtained and transformed in an *Agrobacterium tumefaciens* strain to be used for Sweet Potato variety CEMSA 78-354 transformation. Plants having the synthetic gene were characterized by the biological activity against Sweet Potato Weevil, both under infestation at controlled and field conditions. Several molecular tests were performed to these plants. Clone called C-26 showed the highest toxin levels and the best protection against insect attack.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, á-endotoxin, sweet potato, synthetic *cry 3a* gene, transgenic plants

OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *A. THALIANA* CON NIVELES MODIFICADOS DE FORMALDEHÍDO DESHIDROGENASA DEPENDIENTE DE GLUTATIÓN. SU IMPORTANCIA EN LA DESCONTAMINACIÓN DE FORMALDEHÍDO EXÓGENO

Maykelis Díaz^{1*}, Hakima Achkor², M. Carmen Martínez¹. *Autor para correspondencia.

¹Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey, Central España Republicana, CP 44280, Matanzas, Cuba. e-mail: maykelis.diaz@indio.atenas.inf.cu

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, España.

RESUMEN

Como consecuencia de la alta contaminación ambiental, se está comenzando a aplicar la bioremediación utilizando plantas para eliminar compuestos perjudiciales (fitoremediación). El formaldehído es un compuesto muy tóxico cuya eliminación es necesaria en todas las células vivas. A temperatura ambiente es un gas inflamable, incoloro y muy soluble en agua. Este producto se puede encontrar dentro de la casa, en el medio ambiente, de forma natural o como resultado de la actividad industrial humana. La formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH), conocida también como ADH clase III, es una enzima ubicua, presente tanto en el reino animal como vegetal. La eliminación del formaldehído dentro de la célula se realiza principalmente mediante la FALDH, que utiliza NAD⁺ como cofactor. Para investigar el papel de la FALDH, se generaron plantas transgénicas de *A. thaliana* bajo el control del promotor CaMV35S. El clonaje se realizó en dos etapas: primero se clonó el ADNc de la FALDH en el vector pDH51 y a continuación se subclonó en el vector de expresión de plantas pBin19. La transformación se llevó a cabo mediante la infiltración de *Arabidopsis* con *Agrobacterium tumefaciens*. Dichas plantas transgénicas presentaron variación en la capacidad de metabolizar el formaldehído exógeno y en la actividad enzimática FALDH directamente relacionados con los niveles de proteína. Por otra parte, mostraron un fenotipo diferente, principalmente en la raíz. Teniendo como base estudios bioquímicos y de localización subcelular se propone que una de las funciones de la FALDH es ser una enzima capaz de descontaminar el formaldehído medioambiental, presente en el aire y en aguas residuales. La obtención de plantas transgénicas con niveles modificados de formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH) puede ser, por tanto, de gran interés para remediar la contaminación atmosférica en espacios interiores.

Palabras clave: *A. thaliana*, FALDH, formaldehído, planta transgénica

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE STEVIA REBAUDIANA BERT MEDIADA POR AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

Martínez R. Diego^{1*}, Monsalve F Zulma¹, Urrea Aura I¹, Jiménez Elio². *Autor para correspondencia.

¹Universidad de Antioquia, Laboratorio de Biología Molecular de Plantas. Medellín- Colombia email: drivilla2001@yahoo.es

²Instituto de Biotecnología de las Plantas Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830.

RESUMEN

Stevia rebaudiana Bert., (*Asteraceae*) es una planta herbácea originaria del Paraguay. Presenta en sus hojas compuestos que pueden ser 300 veces más dulces que el azúcar con un reducido aporte energético. Estas sustancias tienen un importante valor económico y posicionamiento en el mercado de edulcorantes. Con el objetivo de aportar herramientas al mejoramiento genético de la especie y la producción de sus metabolitos secundarios, se estableció un método para la transformación genética basado en *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación de segmentos de hojas provenientes de plantas *in vitro* de *Stevia* se realizó utilizando la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*. Se emplearon dos plásmidos de la serie pCambia, el p1301 que porta un gen de resistencia a higromicina *hptII* (higromicin fosfotransferase) y el gen de β-glucuronidasa (GUS) y el segundo plásmido p1302 con el gen *hptII* y el gen de *gfp* (*green fluorescen protein*). Las plantas fueron regeneradas después de 8 semanas en medio de cultivo MS con 2.5 mg.l⁻¹ de 6-bencil aminopurina (6-BAP). 0.5 mg.l⁻¹ de higromicina para selección y Tetraciclina 200 mg.l⁻¹ para la eliminación de la bacteria. La efectividad de la infección se comprobó mediante detección histoquímica de GUS y la expresión de GFP. Los brotes desarrollados luego de 12 semanas fueron transferidos a medio de cultivo de libre de reguladores de crecimiento para multiplicación y posteriores verificaciones. Se presenta el primer informe del uso de *Agrobacterium tumefaciens* en la transformación de *Stevia rebaudiana*.

Palabras clave: β-glucuronidasa, edulcorantes, higromicina, proteína verde fluorescente

AGROBACTERIUM TUMEFACIENS- MEDIATED GENETIC TRANSFORMATION IN STEVIA REBAUDIANA

ABSTRACT

Stevia rebaudiana Bert., is an herbaceous native plant from Paraguay. Its leaves contain compounds that can be 300 fold times sweeter than sugar with reduced caloric contribution. It give to them an important economic value and positioning on edulcorants market. With the objective to contribute with tools for improvement and secondary metabolites production in Stevia, an *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method was established. Leaves segments infection from *in vitro* plants of Stevia was done with *A. tumefaciens* LBA4404 strain. Two plasmids from pCAMBIA series were used, p1301 carrying both hygromycin resistance gene (*hptII*, hygromycin phosphotransferase) and β -glucuronidasa gene (*gus*) and the second one plasmid was p1302 carryng both *hptII* gene and green fluoescen protein gene (*gfp*). Plants were regenerated after eight weeks on MS medium supplemented with 6-bencil aminopurine (6-BAP) 2.5 mg.l⁻¹, hygromycin 0.5 mg.l⁻¹ for selection and Ticarcilin 200 mg.l⁻¹ for bacterium elimination. Effectiveness of infection was verified by GUS histochemical detection and GFP expression. Shoots developed after 12 weeks were transferred to free growth regulators medium for multiplication and later verifications. This is the first report of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Stevia rebaudiana*.

Key words: β -glucuronidase, edulcorants, green fluoescen protein, hygromycin

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE VARIEDADES COLOMBIANAS DE CRISANTEMO EMPLEANDO AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

Hodson E., Forero A.*, Garcia A., Cancino G., Vaca J. *Autor para correspondencia.

Unidad de Biotecnología Vegetal, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. A.A.56 710.

RESUMEN

Colombia es el segundo exportador mundial de flores frescas de corte, entre las que se incluye *Dendranthema grandiflora* (Crisantemo). Sin embargo, su producción puede verse afectada por el ataque de enfermedades fúngicas, lo que trae como consecuencia que se empleen grandes cantidades de fungicidas aumentando los costos de producción a nivel económico y ecológico. La evaluación de sistemas de regeneración *in vitro* de Crisantemo a partir de discos de hoja vía organogénesis y embriogénesis somática, constituyó un primer paso hacia el empleo de la transformación genética. Con este fin, fueron establecidos *in vitro* discos de hoja de *D. grandiflora*, variedades Escapade, White albatross y Yellow albatross, sobre medio de cultivo MS en presencia de ANA (0 - 4.83 μ M) y BAP (0 - 13.3 μ M). Así mismo, se establecieron discos foliares sobre el medio de cultivo Mum B en presencia 2,4-D (0 - 4.52 μ M) con periodos de exposición de 7, 14 y 21 días. Los brotes regenerados fueron individualizados, enraizados y endurecidos. Se desarrollaron protocolos de regeneración de tres variedades de crisantemo. Los resultados mostraron la capacidad de regeneración de plantas completas vía organogénesis o embriogénesis somática a partir de segmentos foliares. El grupo desarrolló una metodología eficiente para la transformación de *D. grandiflora*, mediante el uso de *A. tumefaciens*. Se transfirió e integró el gen inhibidor de la poligiaracturonasa (*pgip*) de frambuesa y de kiwi -en forma individual- y el gen marcador de selección (*bar*). Se obtuvo regeneración de plantas completas de *D. grandiflora* variedades Escapade y White Albatross. El tiempo de co-cultivo de 3 días y bajas concentraciones bacterianas en el momento de la infección, favorecieron la transformación y la regeneración de los explantes infectados con *A. tumefaciens* cepas EHA 105, GV2260 y LBA 4404. Con la cepa GV2260-pSPC1 se registró la mayor frecuencia de transformación en las plantas desarrolladas vía embriogénesis somática.

Palabras clave: *Dendranthema grandiflora*, gen inhibidor de la poligiaracturonasa (*pgip*), regeneración *in vitro*, transformación genética

AGROBACTERIUM TUMEFACIENS-MEDIATED GENETIC TRANSFORMATION OF COLOMBIAN VARIETIES OF CHRYSANTHEMUM

ABSTRACT

Colombia is the world's second largest exporter of fresh cut flowers including chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). Chrysanthemum production can be affected by fungal diseases hence involving the heavy use of fungicides, which leads to increased ecological and commercial production costs. *In vitro* regeneration from leaf discs was evaluated *via* organogenesis and somatic embryogenesis on three varieties: Escapade, White Albatross, and Yellow Albatross. Leaf discs cultures were initiated on MS medium supplemented with NAA

(0- 4.83 ì M) and BAP (0-13.32 ì M). In addition, Mum B medium supplemented with 2,4-D (0-4.52 ì M) was evaluated after 7, 14, and 21 days. Regenerated shoots were transferred to rooting medium and hardened. Plant regeneration protocols *via* organogenesis and somatic embryogenesis were developed for the three varieties. An efficient genetic transformation methodology using *Agrobacterium tumefaciens* was developed. The Polygalacturonase Inhibiting Protein (*pgip*) genes from raspberry and kiwi were transferred and integrated individually along with a selection marker gene (*bar*). Escapade and White Albatross whole plants were regenerated. A 3 day-co-cultivation period combined with low bacterial concentrations when initiating the infection, favoured the transformation and regeneration of explants infected with *A. tumefaciens* strains EHA 105, GV2260, and LBA 4404. The highest transformation frequency was recorded on plants regenerated *via* somatic embryogenesis prior explant infection with strain GV2260-pSPC1.

Key words: *Dendrothema grandiflora*, *in vitro* regeneration, genetic transformation, Polygalacturonase Inhibiting Protein (*pgip*) gene

SONICATION-ASSISTED SYSTEM FOR TRANSIENT EXPRESSION IN RICE EMBRYOS USING AGROBACTERIUM

Meilyn Rodríguez*, Ana V. Pérez, Kenia Tiel, Daymi Abreu, Marlene Pérez, Osmany Ramos, Cecilia Sánchez, Merardo Pujol. *Autor para correspondencia.

Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB). P.O. Box 6162, Havana 10600, Cuba. e-mail: meilyn.rodriguez@cigb.edu.cu

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most versatile and important cereal crops. Currently this crop supports more than 50 % of the World population. Recent advances in molecular biology and genetic engineering have provide tools that increase the efficiency of existing breeding methods and allow unconventional approaches for rice improvement. Results obtained from transient expression systems rapidly and efficiently provide important information and reflect *in vivo* situation *in planta*. Microprojectile bombardment is commonly used to assay transient gene expression, but the main difficulty in its use is the variability in the number of individual bombardment events between independent experiments. Sonication-assisted *Agrobacterium* mediated transformation tremendously improves the efficiency of *Agrobacterium* infection by introducing large numbers of microwounds into the target plant tissue. Using immature embryos of rice as explants, we evaluated the transient expression of β -glucuronidase (GUS) activity. The highest GUS expression was obtained when immature embryos were sonicated for 2 s in the presence of *Agrobacterium*, followed by co-cultivation with the explants in contact the culture medium for 3, 5 and 7 days at 25 °C. The addition of acetosyringone to the co-culture medium enhanced transient expression.

Key words: rice embryos, sonication, transient expression