

Caracterización de promotores mediante modificación genética de banano usando *Agrobacterium tumefaciens*

L. Hidalgo, E. Sánchez, E. Santos*, O. Ruiz, E. Peralta
Centro de Investigación Biotecnológica del Ecuador (CIBE)
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)
Campus Gustavo Galindo, km 30.5 vía Perimetral
Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador
Email: lisan27_@hotmail.com

* Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), efren.santos@gmail.com

Resumen

*Programas de mejoramiento convencional se centran principalmente en la producción de híbridos con resistencia a la Sigatoka negra, la principal enfermedad a nivel mundial. Los híbridos seleccionados son resistentes a enfermedades pero usualmente pierden otras características deseadas a nivel de postcosecha como vida verde y maduración de la pulpa. La transformación genética es una alternativa a la mejora convencional de banano en donde genes que confieren características de resistencia a enfermedades en las plantas son insertados en el genoma. Los promotores juegan un papel importante en regular la expresión génica de una manera específica. Con el fin de caracterizar diferentes promotores de banano para su posible uso en la generación de bananos cisgénicos, se determinó la actividad de los mismos mediante fusión con el gen reportero GUS y transformando mediante *Agrobacterium tumefaciens* suspensiones celulares embriogénicas del banano 'Williams'. Diferentes plásmidos se emplearon para la transformación incluyendo pCAMBIA-1301, pESKUL1 y pESKUL7 conteniendo el promotor 35S del CaMV, y los promotores 17-1 y 85-1 del plátano 'Three Hand Planty', respectivamente. Análisis histoquímicos y fluorométricos se realizaron a los 7 días, 11 semanas y 29 semanas después de la transformación en donde las células embriogénicas de banano pasaron por un proceso de selección y de regeneración en diferentes medios de cultivo. La actividad de los promotores quedó de la siguiente manera 35S>85-1>17-1 siendo el de mayor actividad el del 35S, indicando la posibilidad del uso de los promotores de banano en escenarios donde la expresión necesite ser menor a la del 35S.*

Palabras Clave: *gen reportero, actividad de promotores, Mycosphaerella fijiensis, estomas penetrados.*

Abstract

*Conventional breeding programs are focused in the generation of Sigatoka Disease Resistant Hybrids. The selected hybrids are disease resistant; however usually other characteristics are lose which ones as the time life and the pulp maturation. Genetic transformation is an alternative to the conventional breeding; moreover resistance genes are introduced in the plant genome. Promoters are important in the expression of genes, in a specific target. With the aim of characterize banana promoters for its possible use in the generation of banana cisgenics. The activity was determined by the integration of the reporter gene GUS with an *Agrobacterium*-mediated transformation of banana embryogenic cells, cultivar 'Williams'. Furthermore, different plasmids pCAMBIA-1301, pESKUL1 y pESKUL7, which's contains the promoters 35S from CaMV and 17-1 y 85-1 from the cultivar 'Three Hand Planty', were used in the transformation.*

Besides, Histochemical and fluorometric assay were developed during the day 7, week 11 and week 29 after the day of transformation. In this process during the time the embryonic cells passed thru a selection period and regeneration in different nutritive culture medium. Finally, the promoters activity was this approach 35S>85-1>17-1, indicating the possible use of banana promoters under conditions that would require less expression than 35S.

Key words: reporter gen, promoters' activity, *Mycosphaerella fijiensis*, penetrated stomata

1. Introducción

Ecuador es uno de los países de Latinoamérica con mayores niveles de producción y exportación de banano, fruta que es cotizada internacionalmente por su gran valor nutritivo. Pero el banano es afectado por diversas enfermedades que limitan su producción, la Sigatoka Negra es una de las causas más representativas de los altos costos de producción de esta fruta.[1, 2]

Mycosphaerella fijiensis es el hongo causante de la Sigatoka negra, es de tipo heterotálico con ciclos de reproducción sexual y asexual generando dificultad para controlar su expansión[3]. Posee dos fases de crecimiento, en la primera etapa se alimenta del apoplasto, su segunda etapa es necrotrofica y es aquí donde produce danos como manchas necróticas reduciendo el área foliar útil para fotosíntesis.[4]

El mejoramiento convencional busca generar resistencia a este patógeno pero este proceso depende de la identificación y caracterización de los progenitores diploides, donde no siempre se obtiene un resultado con las exigencias comerciales del cultivo. Por otro lado la ingeniería genética aporta soluciones más rápidas. Existen dos métodos para transformar genéticamente una especie vegetal: directa e indirecta. La transformación indirecta mediada por *Agrobacterium tumefaciens* consiste en integrar un fragmento deseado de ADN en el genoma de la planta.[5-7]

La regulación de genes dentro de los organismos vivos es aun un proceso complejo que no se comprende por completo. Los genes son activados o desactivados por promotores, éstos son regiones antes del punto de transcripción de los genes los mismos que inician una transcripción de ARN [8, 9]. El objetivo principal de este

estudio es determinar eficiencia de promotores aislados de plantas de banano, lo cual puede permitir la generación futura de plantas cisgénicas.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material vegetal y condiciones de medio de cultivo.

Las suspensiones de células embriónicas (SCE) del cultivar 'Williams' (AAA) fueron obtenidas a partir de inflorescencias masculinas (Korneva Sofia, comunicación personal).

El medio de cultivo con el cual fueron subcultivadas cada 2 semanas durante el periodo de selección de 10 semanas fue medio ZZ utilizando como agente selectivo a Higromicina (Hy) concentraciones 12.5 y 18 µg/ml y timentin (TM). A la semana 11 después de la transformación se utilizo medio RDI con el mismo agente selectivo durante 8 semanas, finalmente a la semana 20 posterior a la transformación se uso medio ITC-K sin agente selectivo (-).

2.2. Vectores de transformación.

Obtenidos de la variedad 'Three Hand Planty' y unidos con el gen reportero β-glucuronidasa (GUS) contienen secuencias de 1.7 kilo pares de bases (kbp) y 0.6 kbp, las cuales fueron insertadas por delante del gen GUS[10] Los plásmidos pESKUL1 y pESKUL7 poseen los promotores 17-1 y 85-1 respectivamente, y fueron facilitados por la Universidad Católica de Lovaina en Bélgica (KULeuven).

Por otro lado los vectores pCAMBIA1301 el cual posee el promotor 35S y pCAMBIA1391Z no posee promotor alguno, ambos fueron adquiridos en CAMBIA (www.cambia.org).

2.3. Transformación mediada por *Agrobacterium*.

Basado en el protocolo de transformación estandarizado por Sánchez [11] Se realizó un cocultivo entre las células embriogénicas de banano y *Agrobacterium tumefaciens*, durante 6 horas. Luego se colocaron en medio de cultivo ZZ.

2.4. Selección de colonias de células transformadas.

Luego de 7 días posteriores a la transformación las células embriogénicas fueron transferidas a medio ZZ con higromicina concentración 12,5 (Hy12,5) y 18 (Hy18) $\mu\text{g}/\mu\text{mL}$, y timentim (TM) concentración 200 $\mu\text{g}/\mu\text{mL}$. Las muestras fueron incubadas a 25°C en oscuridad, durante 10 semanas. Una vez formadas las colonias celulares de banano (11 semanas) se trasladaron las muestras a medio RDI con higromicina (Hy) concentración 12,5 y 18 $\mu\text{g}/\mu\text{mL}$, las muestras fueron incubadas a 25°C en oscuridad, durante 8 semanas. Los embriones formados se observan a la semana 20 donde se utiliza medio ITC-K sin ningún agente selectivo.

2.5. Toma de muestras.

Se realizaron tres tomas de muestra:

1. Posterior a los 7 días de transformación, en medio ZZ
2. Posterior a las 10 semanas de selección en medio ZZ con higromicina y timentin
3. Posterior a 29 semanas en medio ITC-K.

2.6. Análisis histoquímico y fluorométricos.

Las muestras tomadas en los tres periodos fueron tenidas con el sustrato X-Gluc, para determinar la actividad temporal del gen GUS la misma que fue expresada como el número de puntos azules, contados con un estereoscopio.

Así mismo se realizó un análisis fluorométrico para medir la actividad enzimática del gen reportero GUS, fue desarrollado según los procedimientos modificados por Santos-Ordoñez.

3. Resultados

3.1. Ensayo histoquímico.

La presencia de los puntos azules a los 7 días fue significativa para el plásmido pCAMBIA1301. Posterior a las 10 semanas de selección las líneas transformadas con pCAMBIA1301 fue la más significativa.

Tabla 1. Número de puntos azules luego de 10 semanas en medio de cultivo ZZ con antibiótico Hy de selección. Símbolo (-) indica ausencia del antibiótico, Hy12,5, higromicina a concentración de 12,5. Hy18, higromicina a concentración de 18 $\mu\text{g}/\mu\text{mL}$

Plásmido	Agente selectivo	Colonias sobrevivientes	# de puntos azules
pESKUL 7	(-)	1170	27
	Hy12.5	780	118
pESKUL 1	(-)	693	0
	Hy12.5	871	19
pCAMBIA 1301	(-)	1420	204
	Hy12.5	840	716
	Hy18	248	211
pCAMBIA 1391Z	(-)	1209	0
	Hy12.5	415	0
	Hy18	328	0
Sin Promotor	(-)	1914	0

La expresión del índigo azul se observó claramente en el ensayo histoquímico. En la semana 11 posterior a la transformación la selección mediante Hy18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mostró un alto índice de mortalidad en comparación con el tratamiento Hy12,5, sugiriendo que un mayor número de líneas transformadas deben estar presentes en las células sobrevivientes en el tratamiento Hy18 que en el Hy12,5

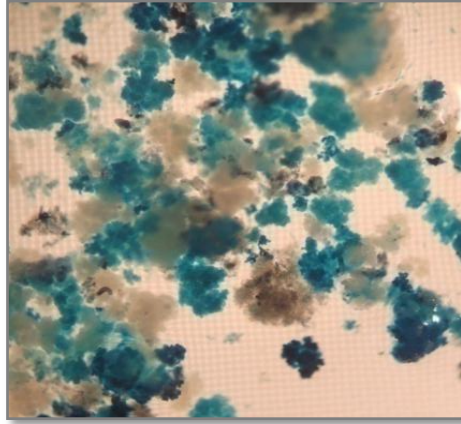


Figura 1. Resultados de la prueba histoquímica. Observación de células embriogénicas con X-GLUC luego de 10 semanas de selección con Hy18. Los puntos azules indican la expresión temporal del gen reportero GUS. La barra negra representa 400µm.

3.2. Ensayo Fluorométrico.

No existieron diferencias significativas entre la expresión del gen posterior a los 7 días de la transformación y la expresión del gen posterior a 10 semanas de selección con higromicina a 12.5 µg/ml en líneas transformadas con el pCAMBIA1301 (Fig. 2).

Por otro lado, el tratamiento pCAMBIA1301 bajo selección de Hy 18 µg/ml durante 10 semanas dio el nivel de expresión del GUS más alta. Cabe recalcar que en esta etapa (10 semanas) las muestras son colonias de células. A diferencia de las muestras de Hy 18 µg/ml a los 3 meses en medio ITC-k cuyas características son más solidas y pertenecen a las de un pequeño embriode.

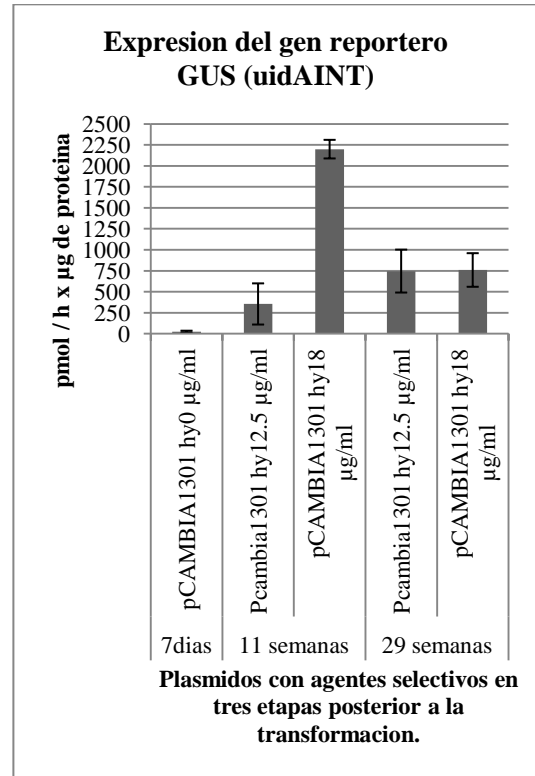


Figura 2. Expresión del gen reportero GUS (*uidA^{INT}*), calculado por medio del análisis fluorométrico. Se utilizaron 3 unidades muestrales por tratamiento. Los promotores se identifican por el nombre del plásmido pESKUL1 (promotor 17-1), pESKUL7 (promotor 85-1) y pCAMBIA1301 (promotor 35S), además se indica las condiciones de agente selectivo (higromicina 0µg/ml, 12.5µg/ml y 18µg/ml) en diferentes etapas del tiempo 7 días, 11 semana y 29 semanas posterior a la transformación de las células embriogénicas con *Agrobacterium tumefaciens*

Como se observó en el análisis histoquímico hubo más expresión con el promotor pCAMBIA1301, pero sin duda alguna hubo presencia de puntos azules en el plásmido pESKUL7, el mismo que contiene al promotor 85-1. Por otra parte la actividad enzimática registrada por el análisis fluorométrico indica que solo existió actividad en el plásmido pCAMBIA1301

con el promotor 35S el cual hasta ahora ha sido útil en la transformación genética vegetal.[12]

La expresión temporal del gen de dio de gran forma en la etapa post-selección donde aun eran colonias de células embriónicas, pero al formarse los embriodes estas disminuyeron considerablemente su expresión, además se observo claramente que la concentración más efectiva de agente selectivo es higromicina 18µg/ml, probablemente por el hecho de que no se hicieron pruebas con esa concentración (18Hy) sino a Hy12,5 en los plásmidos pESKUL 1 y 7 el número de colonias sobrevivientes no estaban conformadas por células transformadas dando por ende una baja expresión.

4. Conclusiones

Se demostraron diferencias significativas entre la eficiencia de los promotores usados, siendo 35S>85-1>17-1. Demostrando que el promotor 85-1 puede seguir siendo evaluado en otras variedades de banano para la generación de cisgénicos, y el uso del promotor 35S para la generación de transgénicos.

Se comprobó la hipótesis planteada que indicaba la eficiencia de selección de líneas transgénicas mediante el uso de higromicina 18 µg/ml, superando en 13% la eficiencia de selección.

5. Prospectos

Se deben seguir realizando la caracterización del promotor 85-1 en diferentes estadios de la planta como en invernadero y campo. Asimismo, futuros trabajos podrían utilizar al promotor 85-1 con algún gen de resistencia específico a *M. fijiensis*. Se recomienda el uso de agente selectivo higromicina en concentración 18 µg/ml, para obtener un mayor número de colonias transformadas.

6. Referencias Bibliográficas

1. MAGAP. *Comercio exterior: Indice de los principales productos de exportacion*. 2009 [cited 2011; Available from: http://www.magap.gob.ec/sigagro/charts/comext_exportaciones.htm#.
2. UNCTAD. . *Banana* Available from: <http://www.unctad.org/infocomm/anglais/banana/market.htm>.
3. CHONG, P., *Diversidad Genetica de Poblaciones de Mycosphaerella fijiensis Morelet Provenientes de Haciendas Bananeras con Manejo Organico y Convencional*, in *Facultad de Ingenieria en Mecanica y Ciencias de la Produccion*2007, ESPOL: Guayaquil.
4. Portal, O., *Analysis of expressed sequence tags derived from a compatible Mycosphaerella fijiensis–banana interaction*. Plant Cell Rep, 2011.
5. TAGU, D. and C. Moussard, *Techniques for molecular biology*. 2006, Enfield, NH: Science Publishers. vii, 227 p.
6. POCASANGRE, F.R.Y.L. *Mejoramiento convencional de banano y platano Estrategias y Logros*. in *Acorbat 2002*. 2002. Colombia.
7. VALLEJO, F., *Mejoramiento genetico de plantas*, U.N.d. Colombia., Editor 2002, DIPAL: Cali.
8. OMOTO, C.K. and P.F. Lurquin, *Genes and DNA : a beginner's guide to genetics and its applications*. 2004, New York: Columbia University Press. xviii, 217 p.
9. Brown, W.M. and P.M. Brown, *Transcription*. Cell and biomolecular sciences. 2002, London ; New York: Taylor & Francis. ix, 158 p.
10. Santos, E., *Characterization and isolation of T-DNA tagged banana promoters active during in vitro regeneration and low temperatura stress*, in *Departement Biosystemen*2008, Katholieke Universiteit Leuven: Leuven. p. 214.
11. Sanchez, E., *Estandarizacion del protocolo de transformacion genetica de celulas embriogenicas de banano variedad 'Williams'(AAA) mediada por Agrobacterium tumefaciens* in *Facultad*

de Ingenieria en Mecanica y Ciencias de la Produccion 2010, ESPOL: Guayaquil. p. 43-46.

12. Rashid, A., *Introduction to Genetic Engineering and Crop Plants*. Aims and Achievements. 2009, New Delhi: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd. 243.