

Expresión transitoria del gen *GUS* en caña de azúcar usando *Agrobacterium tumefaciens*

Transient gene expression in sugarcane using *Agrobacterium tumefaciens*

Martha Liliana Bonilla Betancourt,¹ Jaime Eduardo Muñoz Flórez,² Fernando Ángel Sánchez³

^{1,3}Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia, Cenicaña, AA 9138, Cali, Valle del Cauca, Colombia.

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, AA 237. Palmira, Valle del Cauca, Colombia.

Autor para correspondencia: mlbonilla@cenicana.org

REC.: 27-02-08

ACEPT.: 06-08-08

RESUMEN

En el estudio se desarrolló una metodología de transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* en cultivares colombianos de caña de azúcar. La transformación se evaluó mediante la expresión del gen *GUS*. Callos embriogénicos y explantes meristemáticos de los genotipos CC85-92, CC84-75 y CC87-505 se transformaron usando tres cepas (AGL-1, LBA4404 y EHA105) con el plásmido pCambia 1305.2 y dos (EHA105 y LBA4404) con pCambia 2301. Se usó el medio de infiltración (IM) con acetosiringona y se evaluó el tiempo de cocultivo y la densidad óptica de la bacteria al momento de la inducción. Los genotipos mostraron respuesta diferencial con las combinaciones cepa-plásmido: obtuvieron mayor expresión del gen *GUS* cuando el genotipo CC85-92 se transformó con la cepa AGL-1-pCambia 1305.2. CC84-75 y CC87-505 mostraron mayor expresión cuando se transformaron con la cepa EHA105-pCambia 1305.2. Mayor eficiencia en la expresión se obtuvo cuando la bacteria se indujo en IM después de siete días de cocultivo y cuando la densidad óptica de la bacteria fue de 0.2_{600nm} al momento de la inducción. Se demostró superioridad de los explantes en la eficiencia de transformación.

Palabras clave: *Agrobacterium tumefaciens*; *Saccharum* spp; caña de azúcar; transformación genética.

ABSTRACT

The aim of the present study was to develop a transformation method mediated by *Agrobacterium* in Colombian cultivars of sugarcane. Transformation was evaluated in each step through transient GUS expression. Embryogenic calli and meristematic explants of CC85-92, CC84-75 and CC87-505 cultivars, were transformed using *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1, LBA 4404 and EHA 105 strains, harboring pCambia 1305.2 plasmid. Furthermore, strains LBA 4404 and EHA 105 harboring pCambia 2301 were also tested. Bacterial activator medium, named infiltration media (IM) with acetosyringone was used. Co-cultivation time and bacteria optical density before induction were tested. Sugarcane cultivars evaluated showed differential response to different strain-plasmid combinations, obtaining higher GUS expression when CC85-92 was transformed using AGL-1 strain harboring the vector pCambia 1305.2. CC84-75 and CC87-505 cultivars showed higher GUS expression using EHA 105 strain harboring pCambia 1305.2 vector. The most efficient expression was evident after 7 days of co-cultivation and when bacteria optical density was 0.2_{600nm} before induction in IM medium. This study demonstrated that meristematic explant is more suitable than embryogenic callus as a target to be transformed by *Agrobacterium tumefaciens*.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*; *Saccharum* spp; sugarcane; genetic transformation

INTRODUCCIÓN

La transformación genética se ha usado en la manipulación genética de más de 120 especies por medio de *Agrobacterium tumefaciens*. Partiendo de un modelo biológico usado por la naturaleza se ha desarrollado una técnica que no sólo ha permitido transformar genéticamente organismos vegetales, sino el desarrollo de mo-

delos de señalización celular, transporte célula a célula, importe nuclear de proteínas y ADN y mecanismos de integración genómica (Tzfira y Citovsky, 2000).

Esta metodología se ha establecido para dicotiledóneas y recientemente en monocotiledóneas. Ofrece ventajas sobre los otros sistemas de transformación, como transferir ADN a las células vegetales con ter-

minaciones definidas, fragmentos de ADN grandes con pocos o ningún rearrreglo, con alta reproducibilidad y sin necesidad de utilizar equipos costosos.

Los cultivares modernos de caña de azúcar son híbridos interespecíficos con alto nivel de ploidía, lo que dificulta el mejoramiento genético convencional debido a la compleja base genética del cultivo. Estas características hacen necesario desarrollar sistemas de mejoramiento utilizando la ingeniería genética con el fin de introducir genes de interés en variedades o híbridos comerciales (Lakshmanan *et al.*, 2005).

Son varios los reportes de éxito en la transformación de caña de azúcar usando diferentes metodologías como el bombardeo de partículas (Gallo-Meagher e Irvine, 1996), electroporación (Arencebia *et al.*, 2000) y usando *Agrobacterium* (Manickavasagam *et al.*, 2004). Algunas de las características que se han introducido en el germoplasma son resistencia a herbicidas (Falco *et al.*, 2000; Leibbrandt y Snyman 2003), resistencia a virus (Rangel *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*, 2005) y resistencia a insectos (McAllister *et al.*, 2004).

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una metodología de transformación genética de variedades comerciales colombianas de caña de azúcar usando *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación en cada paso se evaluó mediante la expresión transitoria del gen *GUS* en callos embriogénicos y en explantes meristemáticos con alta capacidad de regeneración.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron dos tipos de tejido (explantes meristemáticos y callos embriogénicos) de tres genotipos de caña de azúcar (CC85-92, CC84-75 y CC87-505). Los callos embriogénicos se indujeron a partir de tejido meristemático de la parte basal del tallo de plantas de 3 meses de edad crecidas en invernadero, en medio de inducción de callos MIC (Gallo-Meagher e Irvine, 1996). Los callos se mantuvieron en condiciones de oscuridad a 28°C por aproximadamente seis semanas. Los callos producidos se subcultivaron cada dos semanas en medio nuevo de inducción. Los explantes meristemáticos consistieron en rodajas tomadas de los 10 primeros centímetros de la parte apical del tallo de plantas crecidas en campo de 6 a 8 meses de edad. Ambos tejidos se esterilizaron y se mostraron una capacidad de regeneración preliminar superior al 85%.

En los ensayos se usaron tres cepas de *Agrobacterium* (AGL-1, EHA105 y LBA4404) que llevan el vector pCambia 1305.2, el cual contiene el gen de selección *hptII* (higromicina fosfotransferasa II), que confiere resistencia al antibiótico higromicina B para la selección

del tejido transformado. Además posee el gen reportero *GUSPlus*® (β -glucuronidasa), que contiene la secuencia de un péptido rico en glicina (PRG), la cual facilita la excreción extracelular de la β -glucuronidasa acelerando la expresión del gen *GUS in vivo*. El plásmido también posee un gen fuera de la región del ADN-T, que confiere resistencia a la kanamicina, antibiótico con el cual se selecciona la bacteria.

También se evaluaron dos cepas (EHA105 y LBA4404) que llevan el plásmido pCambia 2301, el cual contiene el gen de selección *nptII* (neomicina fosfotransferasa II) para la selección del tejido transformado y otorga resistencia a los antibióticos aminoglicósidos (neomicina, kanamicina, paromomicina y gentamicina). También posee el gen reportero *GUS* y un gen fuera de la región del T-DNA que confiere resistencia a kanamicina.

Las cepas bacterianas se activaron en medio LB (Sambrook *et al.*, 1989), suplementado con 50 mgL⁻¹ de kanamicina durante 16 horas a 28°C en agitación continua (240 rpm). El cultivo se diluyó hasta alcanzar una densidad óptica de 0.2_{600nm} en el medio IM (Vaquero, 1999), en agitación a 240 rpm a 28°C durante 2 horas en oscuridad. Las condiciones se establecieron en ensayos preliminares con diferentes medios de activación y densidades ópticas (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 a 600_{nm} de absorbancia).

Los callos se sumergieron en solución bacteriana y se sometieron a infiltración por vacío de 84.43 kPa por cinco minutos. Los explantes de rodajas de tejido meristemático se infiltraron durante una hora. Los tejidos se secaron en papel filtro estéril Whatman N° 1 y se transfirieron a medio de cocultivo sólido (Gallo-Meagher e Irvine, 1996) suplementado con acetosiringona. El cocultivo se realizó en condiciones de oscuridad y humedad relativa de 49% y 21° C. El tiempo de cocultivo se evaluó desde 1 a 7 días.

Después del cocultivo los tejidos se lavaron con cefotaxima 500 mgL⁻¹ para eliminar la bacteria del tejido. El tejido se secó y se realizó la prueba de expresión transitoria del gen *GUS*.

La evaluación transitoria del gen reportero *GUS-Plus*® y *GUS* se realizó según Jefferson *et al.* (1987) y McCabe *et al.* (1988). El tejido se mantuvo en esta solución a 37° C por 24 horas.

Los ensayos de transformación se realizaron en un arreglo multifactorial donde se evaluaron las variables medio de activación bacteriana (3) y fase de crecimiento de la bacteria (5); para variable combinación cepa-plásmido se evaluaron dos combinaciones cepa-plásmido para los genotipos CC 85-92 y CC 87-505; y

tres para el genotipo CC 84-75 (Tabla 1). Se evaluaron en 30 tratamientos para los genotipos CC 85-92 y CC 87-505 y 45 para el genotipo CC 84-75; se evaluaron 32 callos embriogénicos por tratamiento. La variable de respuesta fue la expresión transitoria del gen reportero *GUS*. El análisis de los datos fue descriptivo debido a la carencia de repeticiones y el bajo número de datos por tratamiento. Para los ensayos con los explantes meristemáticos (20 por tratamiento) se evaluó sólo la densidad óptica de la bacteria a 0.2 a 600nm. En la prueba transitoria del gen reportero *GUSPlus*[®] y *GUS* se incluyó como control positivo tejido vegetal de arroz transformado

Tabla 1. Variables evaluadas en los ensayos de transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Factores	Modalidades o niveles
Combinación cepa- plásmido	Genotipo CC 87-505: EHA 105/pCambia 1305.2 EHA 105/pCambia 2301
	Genotipo: CC 84-75: EHA 105/pCambia 1305.2 AGL-1 /pCambia 1305.2 EHA 105/pCambia 2301
	Genotipo: CC 85-92: EHA 105/pCambia 1305.2 AGL-1 /pCambia 1305.2
Medios para la activación bacteriana	IM (Vaquero, C., 1999) MR(Zi- Zhang <i>et al.</i> , 2004) Tabares, E (CIAT, comunicación personal)
Densidad óptica de la bacteria a 600nm de absorbancia	0.1
	0.2
	0.4
	0.6
	0.8
	1.0

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Expresión transitoria del gen *GUS* utilizando callos embriogénicos

Los resultados indicaron respuesta diferencial de los genotipos a las combinaciones cepa-plásmido evaluadas (Figura 1). El genotipo CC85-92 mostró mayor expresión del gen *GUS* cuando se transformó con la cepa AGL-1-pCambia 1305.2 (Tabla 2). El vector pCambia 1305.2 evaluado con tres cepas de *A. tumefaciens* mostró comportamiento diferencial en la capacidad de transformación, similar a lo obtenido con el plásmido pCambia 2301 evaluado con dos cepas. Sin embargo, los ensayos con las dos cepas no mostraron buena expresión del gen *GUS*, excepto con el genotipo CC87-505. Con la cepa LBA 4404 no hubo expresión. Esto coincide con lo sugerido por Amoah *et al.* (2001) acerca de la habilidad de diferentes vectores en la misma cepa de *Agrobacterium* para transferir el ADN-T.

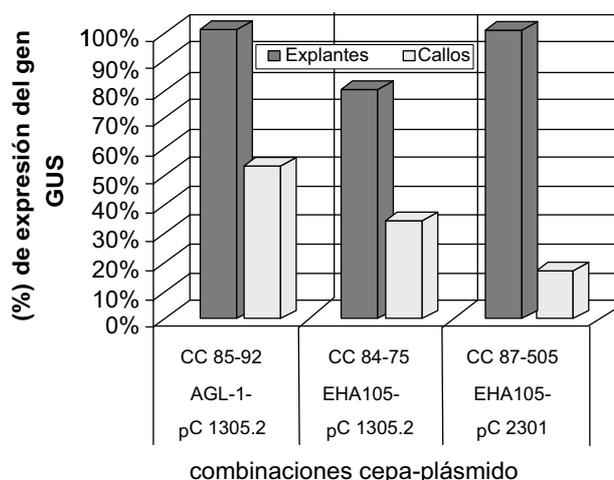


Figura 1. Respuesta de los genotipos a las diferentes combinaciones cepa-plásmido en callos embriogénicos y explantes meristemáticos.

Se lograron mejores resultados cuando la bacteria se encontraba a una D.O de 0.2_{600nm} al momento de la inducción con acetosiringona. A medida que la densidad óptica fue mayor, el porcentaje de callos *GUS* positivo disminuyó, llegando en algunos casos a cero. Esto indica la importancia de la concentración de la bacteria al momento de inducir los genes vir.

La respuesta en la expresión fue significativamente superior en el día 7 de cocultivo (Figura. 2). Similar resultado reportaron Hoshi *et al.* (2004) en la transformación genética de lirio mediada por *Agrobacterium*. Sin embargo, se ha reportado que periodos prolongados de cocultivo pueden favorecer sobrecrecimiento de la bacteria y muerte del tejido (Manickavasagam *et al.*, 2004). En caña de azúcar se ha reportado como tiempo óptimo de cocultivo 3-4 días (Manickavasagam *et al.*, 2004; Zi-Zhang, 2004). En el presente estudio se evaluaron estos días de cocultivo, pero además se evaluaron los días 1 y 2 al igual que los días 5, 6 y 7. En los días de cocultivo 3 y 4 las expresiones del gen *GUS* fueron de 7.8% y 3.7% en promedio, respectivamente. En el séptimo día de cocultivo se obtuvo en promedio para los tres genotipos el 60.86% de expresión. La expresión del gen *GUS* en callos embriogénicos se observa en la Figura 3.

Expresión transitoria del gen *GUS* utilizando explantes meristemáticos

Con explantes meristemáticos se obtuvieron porcentajes superiores de transformación (Figura. 1). El genotipo CC85-92 con la cepa AGL-1-pCambia 1305.2 en el medio de activación IM presentó expresión transitoria del gen *GUS* de 100%. El genotipo CC84-75 presentó la

Tabla 2. Expresión transitoria del gen GUS en callos embriogénicos.

Variedad	Medio de Activación	Cepa	Plásmido	Densidad óptica	Callos N°	Callos GUS+	Día. Coc	% Exp. GUS
CC 84-75	IM	EHA 105	pC1305.2	0.2	32	11	5,6,7	34.37
CC 84-75	IM	EHA 105	pC1305.2	0.4	32	6	5,7	18.75
CC 84-75	IM	EHA 105	pC1305.2	0.6	32	2	7	6.25
CC 84-75	IM	EHA 105	pC1305.2	0.8	32	2	5,8	6.25
CC 84-75	IM	EHA 105	pC1305.2	1.0	32	0	0	0
CC 87-505	IM	EHA 105	pC1305.2	0.2	32	5	5,6,7	15.62
CC 87-505	IM	EHA 105	pC1305.2	0.4	32	4	5,7	12.5
CC 87-505	IM	EHA 105	pC1305.2	0.6	32	2	5,7	6.25
CC 87-505	IM	EHA 105	pC1305.2	0.8	32	1	7	3.125
CC 87-505	IM	EHA 105	pC1305.2	1.0	32	0	0	0
CC 85-92	IM	AGL -1	pC1305.2	0.2	32	17	5,6,7,8	53.12
CC 85-92	IM	AGL -1	pC1305.2	0.4	32	10	5,6,7,8	31.25
CC 85-92	IM	AGL -1	pC1305.2	0.6	32	2	7,8	6.25
CC 85-92	IM	AGL -1	pC1305.2	0.8	32	1	5	3.125
CC 85-92	IM	AGL -1	pC1305.2	1.0	32	2	6,7	6.25

Tabla 3. Expresión transitoria del gen GUS en explantes meristemáticos.

Variedad	Cepa	Plásmido	D.O	N° de Explantes	Medio AC ¹	Exp gus+	Tiempo de inoculación	% de expresión GUS
CC 85-92	AGL -1	pC1305.2	0.2	20	IM	20	1h	100
CC 84-75	EHA 105	pC1305.2	0.2	20	IM	16	1h	80
CC 87-505	EHA 105	pC2301	0.2	20	IM	15	1h	100

1/ Medio de activación bacteriana

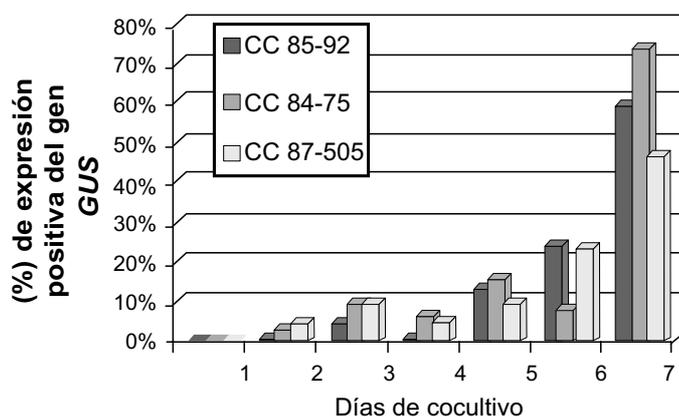


Figura 2. Efecto del tiempo de cocultivo en la expresión transitoria del gen GUS

mayor expresión con la cepa EHA105 pCambia 1305.2. de 75% El genotipo CC87-505 presentó mejor expresión con la cepa EHA 105 pCambia 2301 con 100%, y 75% con la cepa EHA105-pCambia 1305.2 (Tabla 3). La expresión del gen GUS en explantes meristemáticos se observa en la Figura 4.

En caña de azúcar se han reportado resultados positivos de transformación mediante la vía de embriogé-

nesis directa utilizando explantes meristemáticos. Los resultados obtenidos por Snyman *et al.* (2006); Desai *et al.* (2004) y Mulleegadoo y Dookun- Saumatally (2005) han demostrado ciertas ventajas del uso de explantes sobre callos embriogénicos para la transformación utilizando el bombardeo de partículas. La regeneración por la vía de embriogénesis directa ha permitido obtener hasta 72% de plantas transgénicas a partir de

Figura 3. Expresión transitoria del gen *GUS*. A. Genotipo CC 85-92 transformado con la cepa AGL-1-pCambia 1305.2. B. CC 84-75 transformado con la cepa EHA 105-pCambia 1305.2. C. CC 87-505 transformado con la cepa EHA 105-pCambia 1305.2.

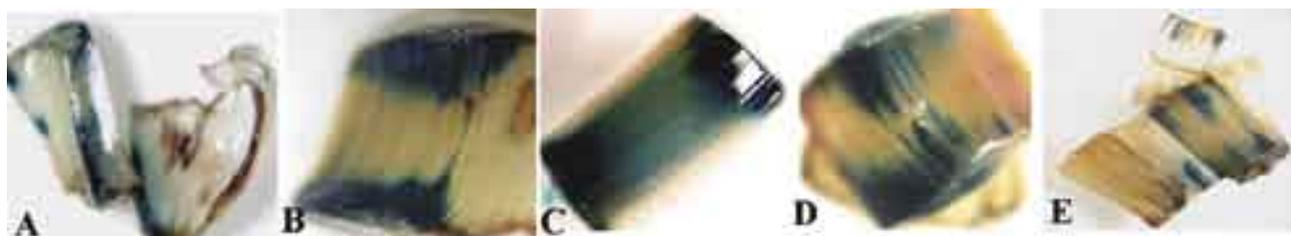
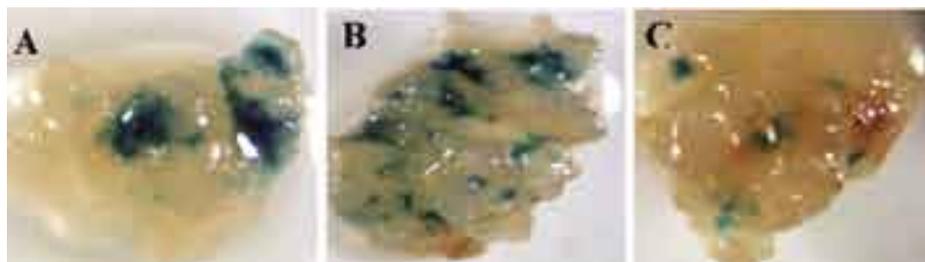


Figura 4. Expresión transitoria del Gen *GUS* en explantes meristemáticos. A. Variedad CC85-92 cepa AGL-1-pCambia 1305.2 B. Variedad CC84-75 cepa EHA 105-pCambia 1305.2. C. Variedad CC84-75, cepa AGL-1-pCambia 1305.2 D. Variedad CC87-505 cepa EHA105-pCambia 1305.2 E. Variedad CC87-505 cepa EHA105-pCambia 2301.

explantes meristemáticos. Estas ventajas se refieren a la reducción en el tiempo de cultivo. Además, se ha evidenciado reducción de variación somaclonal debido a que se acorta el tiempo de exposición a hormonas de crecimiento como el 2,4D (Hoy *et al.*, 2003).

Los resultados indican que con el uso de explantes meristemáticos se desarrolla un sistema rápido y eficiente de transformación para la obtención de plantas transgénicas. Además, permitiría mejorar la eficiencia de transformación de genotipos recalcitrantes a la transformación cuando se usan callos embriogénicos.

CONCLUSIONES

Se identificó respuesta diferencial de los genotipos a las combinaciones cepa-plásmido evaluadas.

La mayor expresión del gen *GUS* fue evidente cuando la bacteria fue inducida en el medio de activación IM conteniendo MES pH 5.6, MgCl₂ y acetosiringona (200 μM). Así mismo, se determinó que la bacteria debe tener una densidad óptica de 0.2 600nm al momento de la inducción de los genes *vir*. La mayor expresión del gen *GUS* se obtuvo después de siete días de cocultivo.

Se demostró superioridad de los explantes meristemáticos en la respuesta a la expresión transitoria del gen *GUS*.

AGRADECIMIENTOS

A las entidades financiadoras Colciencias (código 22141216771) y Cenicaña; a la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, y a los doctores Carlos

Moreno, Ricardo Acuña, Paul Chavarriaga, Claudia Flórez y Eddie Tabares, por sus valiosos aportes durante el desarrollo de la investigación.

El artículo se derivó de la tesis de maestría de M. L. Bonilla.

BIBLIOGRAFIA

1. Amoah, B.K.; Wu, H.; Sparks, C.; Jones, H.D. 2001. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue. *J Exp Bot* 52 (38): 1135-1142.
2. Arencibia, A.D.; Carmona, E.; Cornide, M.T.; Menéndez, E.; Molina, P. 2000. Transgenic sugarcane (*Saccharum* spp). p188-206 *In: Bajaj, S.S (ed) Biotechnology in agriculture and forestry* 46. Heidelberg: Springer. (Transgenic crops 1).
3. Desai, N.S.; Suprasanna, P.; Bapat, V.A. 2004. Simple and reproducible protocol for direct somatic embryogenesis from cultured immature inflorescence segments of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Curr Sci*. 87: 764-768.
4. Falco, M.C.; Tulmann, Neto A.; Ulian, E.C. 2000. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in Brazilian sugarcane. *Plant Cell Rep* 19:1188-1194.
5. Gallo-Meagher, M.; Irvine, J.E. 1996. Herbicide resistant sugarcane containing the *bar* gene. *Crop Sci* 36:1367-1374.
6. Gilbert, R.A.; Gallo-Meagher, M.; Comstock, J.C.; Miller, J.D.; Jain, M.; Abouzid, A. 2005. Agronomic evaluation of sugarcane lines transformed for resistance to *Sugarcane mosaic virus* Strain E. *Crop Sci* 45: 2060-2067.
7. Hoshi, Y.; Kondo, M.; Mori, S.; Adachi, Y.; Nakano, M.; Kobayashi, H. 2004. Production of transgenic lily plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 22: 359-364.
8. Hoy, J.W.; Bischoff, K.P.; Milligan, S.B.; Gravois, K.A. 2003. Effect of tissue culture explant source on sugarcane yield components. *Euphytica* 129: 237-240.

9. Jefferson R.A.; Kavanagh T.A.; Bevan M.W. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907.
10. Lakshmanan P.; Geijskes, J.; Aitken K.; Grof C.; Bonnett, G.; Smith, G. 2005. Sugarcane Biotechnology: The challenges and opportunities. *In Vitro Cell Develop Biol Plant* 41: 345-363
11. Leibbrandt, N. B.; Snyman, S.J. 2003. Stability of gene expression and agronomic performance of a transgenic herbicide-resistant sugarcane line in South Africa. *Crop Sci* 43: 671-677.
12. Manickavasagam, M.; Gavapathi, A.; Anbazhagan, V.R.; Sudhakar, B.; Selvaraj, N.; Vasudevan, A.; Kasthuriengan, S. 2004. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. *Plant Cell Rep* 23: 134-143.
13. McAllister, C.D.; Bischoff, K.P.; Gravois, K.A.; Schexnayder, H.P.; Reagan, T.E. 2004. Transgenic Bt-corn affects sugarcane borer in Louisiana. *Southwest Entomol* 29: 263-269.
14. McCabe, D.E.; Swain, W.F.; Martinell, B.J.; Christou, P. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/ Technol* 6: 923-926.
15. Mullegadoo, K.D.; Dookun-Saumtally, A. 2005. Genetic transformation of sugarcane by microprojectile bombardment of young leaf rolls. *Proc Int Soc Sugar Cane Technol* 25: 579-583.
16. Rangel, M.; Tabares, E.; Lentini, Z.; Tohme, J.; Mirkov, E.; Victoria, J.; Ángel, F. 2002. transformación de plantas de caña de azúcar susceptibles al síndrome de la hoja amarilla. *Rev Col Biotec* 4 (1): 54-60.
17. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. (PAGINAS)
18. Snyman, J.S.; Meyer, M.G.; Richards, M.J.; Haricharan, N.; Ramgareeb, S. Hockett, I.B. 2006. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. *Plant Cell Rep* 25: 1016-1023.
19. Tzfira, T.; Citovsky V. 2000. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Mol Plant Pathol* 1(4): 202-212.
20. Vaquero, C. 1999. Transient expression of a tumor specific single-chain fragment and chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 11128-11133.
21. Zi Zhang Wang. 2004. Trehalose synthase gene transfer mediated by *Agrobacterium tumefaciens* enhances resistance to osmotic stress in sugarcane. p 529-534. *In: Proc Internl Symp. On Sustain Sugarcane and Sugar Production Technol*, Nanning, P.R. China.