

Silenciamiento de genes de la ruta de biosíntesis de almidón en yuca

Silencing of genes involved in starch biosynthesis in cassava

Simón Cortés¹, José David Cortés¹, Janeth Julieta Ladino², Paul Chavarriaga² y Camilo López^{1*}

¹Grupo Manihot Biotec, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

²Transformación Genética, Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, Colombia. *Autor para correspondencia: celopezc@unal.edu.co

Rec.: 03.11.2013 Acep.:10.05.2014

Resumen

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) presenta un alto contenido de almidón en sus raíces almacenadoras, por lo que es una potencial materia prima para el mercado de agro-combustibles. En este proyecto se aprovecha la estrategia del silenciamiento génico mediado por ARN de interferencia (ARNi), para silenciar algunos de los genes de la ruta de biosíntesis del almidón y así obtener variedades con contenidos y estructura de almidón diferentes. Los genes que codifican para GBSS, SBE y AGPasa se amplificaron y clonaron en el vector binario de silenciamiento pHELLSGATE. Estas construcciones fueron empleadas para transformar Callo Embriogénico Friable (CEF) de yuca de la variedad 60444. Se obtuvieron dos líneas transgénicas correspondientes a la construcción pHELLSGATE:SBE las que fueron confirmadas. Estas plantas presentaron problemas de crecimiento y deformaciones en las hojas. Los resultados parecen sugerir que el silenciamiento de los genes implicados en la biosíntesis de almidón compromete la viabilidad de las plantas de yuca.

Palabras clave: yuca, bioetanol, silenciamiento génico, almidón.

Abstract

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), due to its starchy roots is a potential raw material for the biofuel market. To modify the starch quality/quantity in cassava, we used RNA interference (RNAi) to silence selected genes of the starch biosynthesis pathway in the roots. Genes coding for GBSS, SBE & AGPasa were PCR-amplified and cloned into the silencing vector pHELLSGATE. The constructs were introduced in cassava cultivar 60444 by cocultivating Friable Embryogenic Callus (FEC) with *Agrobacterium*. After several transformation attempts, only two lines of plants were confirmed by Southern blot as transgenics for construct pHELLSGATE::SBE. These lines showed abnormal growth and deformed leaves. These findings suggested that silencing genes of the biosynthesis pathway in cassava may compromise the viability of plants.

Key-words: cassava, bioethanol, gene silencing, starch

Introducción

El desarrollo industrial ha dependido en gran medida de la explotación y uso de combustibles fósiles (Lincoln, 2005). La utilización del petróleo ha generado un incremento en la emisión de gases contaminantes que contribuyen al efecto invernadero y al cambio climático (Fantazzini *et al.*, 2011). Entre las alternativas al empleo del combustible fósil se encuentran los biocombustibles líquidos tales como el etanol. El alcohol etílico o etanol se puede obtener por medio de tratamientos físicos, químicos y biológicos, partiendo de materias primas ricas en sacarosa, almidón o más recientemente empleando compuestos ricos en celulosa (Lin y Tanaka, 2006). Entre los productos con alto contenido de almidón se cuentan el maíz, el trigo, la papa y la yuca (Cardona y Sánchez, 2007). El almidón es una materia prima para la producción de bioetanol por medio de la liberación previa de los monómeros de glucosa. El alto porcentaje de almidón almacenado en las raíces de yuca hace que este cultivo tenga un gran potencial para la producción de bioetanol (Nguyen *et al.*, 2007).

El almidón se compone de los polisacáridos amilosa y amilopectina, los cuales representan entre 98% y 99% del peso seco del gránulo de almidón (Mutisya *et al.*, 2003). La amilosa está formada por cadenas lineales de 100 a 10,000 residuos glucosil unidos por enlaces α -1,4; mientras que la amilopectina lo está por cadenas cortas unidas por enlaces α -1,4, y adicionalmente presenta enlaces α -1,6 responsables de los puntos de ramificación (Cardona y Sánchez, 2007; Mutisya *et al.*, 2003). La amilosa puede representar entre 14% y 24%, mientras que la amilopectina representa entre 70% y 80% (Mutisya *et al.*, 2003).

La biosíntesis de los polisacáridos, amilosa y amilopectina, implica pocos pasos enzimáticos. La primera enzima que actúa en el amiloplasto es la adenosina difosfato glucosa pirofosforilasa (AGPasa), la cual partiendo de ATP y glucosa-1-fosfato genera ADP-glucosa, que es el sustrato a partir del cual se sintetizan los dos polisacáridos (Zeeman *et al.*, 2010). La enzima sintasa de almidón ligada al gránulo de almidón (GBSS, por sus siglas en inglés: Granule Bound Starch Synthase),

cataliza la síntesis de amilosa por medio de uniones α -1,4 (Baguma *et al.*, 2003). La amilopectina se sintetiza por medio de la acción de la enzima ramificadora de almidón (SBE, por sus siglas en inglés: Starch Branching Enzyme), la cual introduce puntos de ramificación sobre las cadenas lineales por medio de uniones α -1-6. (Baguma *et al.*, 2003). Adicionalmente a la SBE, las sintasas de almidón solubles (SSS, por sus siglas en inglés Soluble Starch Synthase), participan en la formación de amilopectina (Zeeman *et al.*, 2010) (Figura 1).

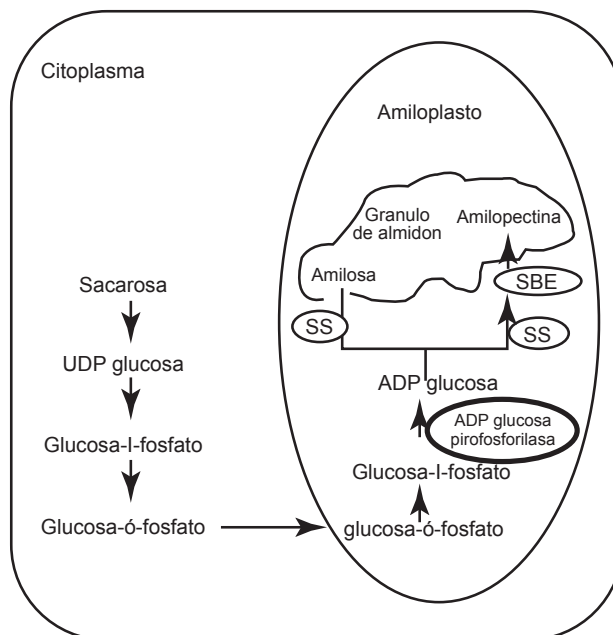


Figura 1. Esquema de la biosíntesis de almidón mostrando las enzimas implicadas en el proceso y cuyos genes fueron blanco de silenciamiento génico. La biosíntesis de almidón inicia con la entrada de glucosa-6-fosfato al amiloplasto donde ocurre la polimerización de azúcares a través de las enzimas AGPasa; SS y SBE.

El limitante en el uso del almidón para la producción de bioetanol radica en que se requiere el empleo de enzimas que permitan su hidrólisis para generar azúcares fermentables (Schubert, 2006). Una solución al problema es la modificación de la estructura y composición del almidón, haciéndolo menos complejo, con menor proporción de los polímeros constitutivos y mayor cantidad de azúcares libres. Una alternativa para lograr este tipo de almidones es a través del silen-

ciamiento génico de los genes que codifican para las enzimas implicadas en la biosíntesis de almidón. En este trabajo se exploró la posibilidad de emplear la tecnología de ARN de interferencia para inactivar los genes codificantes para la AGPasa, la GBSS y la SBE en la variedad de yuca 60444.

Materiales y métodos

Diseño de cebadores

Para el diseño de los cebadores correspondientes a la *AGPasa* se empleó la secuencia de nucleótidos de un EST reportado en el Genbank (número de accesión DB927992) mientras que para *GBSS* se utilizó la secuencia de nucleótidos reportada para yuca (número de accesión X74160). Finalmente la secuencia del gen *SBE* reportada para yuca (número de accesión X77012.19) fue utilizada para el diseño de los cebadores. Los cebadores fueron diseñados empleando el programa primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). La secuencia CACC fue adicionada en el extremo 5' del primer sentido para permitir la clonación en el vector de entrada del sistema Gateway (Cuadro 1).

Extracción de ADN, ARN y síntesis de ADNc

La extracción de ADN se realizó a partir de la variedad 60444 con uso del protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983). El ARN fue extraído a partir de hojas y tallos de plantas de la misma variedad mantenidas en invernadero según el protocolo descrito por Beltrán et al. (2010). La integridad del ARN se verificó en gel de agarosa a 1% y se cuantificó con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 Thermo Scientific®. Previo a la realización de la síntesis de ADNc se realizó tratamiento con ADNasa I (Fermentas, Glen Burnie, MD,

USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La síntesis de primera cadena de ADNc se hizo con el kit First Strand ADNc synthesis (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) según las instrucciones del fabricante.

Amplificación y clonación

La amplificación por PCR se realizó sobre ADN o ADNc de la variedad TMS60444. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 50 µL, conteniendo 50-100ng de ADN, MgCl₂ 2.5mM, 0.2mM de dNTPs, 0.1µM de cada primer, 1 U de Taq polimerasa y Buffer 1X (KCl 50mM, Tris-HCl pH 8.8 10mM, Triton X-100 0,1%). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador BIO-RAD MyCycler™ donde se programaron los siguientes cuatro pasos. Primero, denaturación a 94 °C por 2 min; segundo, 35 repeticiones de las temperaturas siguientes: 94 °C 30 seg, 60 °C por 30 seg, 72 °C 1 min; tercero, a 72 °C por 5 min; último, 20 °C por 5 min. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. Los fragmentos de PCR se eluyeron empleando el Kit Gel Extraction de QIAGEN y se clonaron en el vector pENTR/D-TOPO, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posterior a la reacción de clonación, se llevó a cabo la transformación de células *E. coli*, por medio de choque térmico. Se platearon 200 µL de bacterias en cajas de petri con medio LB (1.0% Triptona 0.5% Extracto de levadura 1.0% Cloruro de sodio) selectivo con el antibiótico Kanamicina a una concentración de 50 µg/ml. Las células crecieron toda la noche a una temperatura de 37 °C. Las colonias positivas se confirmaron por PCR en las condiciones descritas previamente y se realizó la extracción de ADN plasmídico por medio del kit GeneJT Plasmid Miniprep

Cuadro 1. Lista de cebadores empleados para la amplificación de genes de yuca implicados en la biosíntesis de almidón.

| Nombre | Cebador | Secuencia 5'-3' | Tamaño esperado |
|--------|---------|----------------------------|-----------------|
| GBSS | Forward | CACCCAAGCAGAAGTCGGATTGCC | 313bp |
| | Reverse | TGCAACTGAATGAGACCACA | |
| SBE | Forward | CACCTGGGATCAACATGGCATTTA | 350bp |
| | Reverse | TGGCTTGGTCATGACTCTCA | |
| AGPasa | Forward | CACCGGGACCTAGAGATGGAAAAGAG | 303bp |
| | Reverse | TTTGAGTAGCTGCCAGAACCT | |

Los cebadores fueron diseñados a partir de las secuencias reportadas y disponibles en el Genbank y empleando el programa primer3.

(Fermentas). A partir de los clones positivos se realizó la secuenciación. Una vez confirmada la correcta clonación de los fragmentos se procedió a transferirlos al vector pHELLSGATE 12, mediante la reacción LR siguiendo las instrucciones del fabricante (Life Technologies). Posterior a la reacción de recombinación se procedió a la transformación de células de *E. coli* DH5 α mediante electroporación. Las bacterias se cultivaron en cajas petri con medio LB más Spectinomycin (50 μ g/ml). Las colonias positivas fueron confirmadas por PCR y secuenciación. Adicionalmente se hizo una digestión del vector pHELLSGATE con las enzimas XhoI y XbaI, las cuales liberan los fragmentos en sentido y antisentido. Para las digestiones se emplearon 800 ng del vector pHELLSGATE 20 Unidades de XbaI y 10 Unidades de XhoI según las instrucciones del fabricante (Fermentas).

Producción de callo embriogénico friable

El callo embriogénico friable (CEF) se obtuvo a partir de la variedad de yuca 60444. Se realizó una propagación *in vitro* empleando segmentos nodales de plantas crecidas en medio 4E (sales Murashige y Skoog (MS), sacarosa 2%, Tiamina 1 ppm, Mio-inositol 100ppm, CuSO₄ 2 μ M, ANA 0.02 ppm, GA3 0.05 ppm y BAP 0.04 ppm), a 28°C con fotoperíodo 12h/12h por 45 días en una incubadora Sanyo MLR 350. La embriogénesis primaria se hizo a partir de yemas axilares en medio líquido MS250pi (MS suplementado con vitaminas B5 de Gamborg, sacarosa 2%, CuSO₄ 2 μ M, caseína hidrolizada 50 mg/lt y picloram 12 mg/lt), mientras que la embriogénesis cíclica se llevó a cabo en medio MS250pi gelificado con gelrite 0.2%. Los embriones obtenidos se incubaron por 30 días a 28 °C en oscuridad. Para la inducción del CEF se aislaron embriones globulares que fueron transferidos a medio GD250pi (Sales Greshoff y Doy (GD)), Vitaminas GD 1X, Sacarosa 2%, picloram 50 μ M, Agar 0.6%) (Bull *et al.*, 2009). A partir de los clústers celulares obtenidos se llevó a cabo el aislamiento de CEF en medio GD250pi y se renovó el medio a los 22 días. El CEF aislado se incubó a 28 °C con un fotoperíodo 12/12.

Transformación genética

Las construcciones genéticas en pHELLSGATE fueron introducidas en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación, con protocolos descritos previamente (Bull *et al.*, 2009). Las bacterias positivas se aislaron y se confirmó la presencia del vector mediante extracción de ADN plasmídico empleando el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Fermentas). La colonia de *Agrobacterium* seleccionada se cultivó en medio LB en oscuridad hasta alcanzar una densidad óptica DO_{600nm} 0.4, momento en el cual se realizó una pre-inducción con acetosiringona (AS) hasta alcanzar una DO_{600nm} entre 0.8 y 1.0. El cultivo se centrifugó para resuspenderlo en medio GDS (Beltrán *et al.*, 2010) + acetosiringona 100 μ M. Este cultivo fue empleado en las transformaciones de CEF obtenido previamente. El CEF se organizó en placas de GDS + acetosiringona 100 μ M. A cada clúster de CEF se le adicionaron 20 μ l de bacteria y se incubó a 22 °C por 3 días en oscuridad, como se describe en Beltrán *et al.* (2010). Para los procedimientos de lavados, transferencia de CEF y de regeneración se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Beltrán *et al.* (2010). Los embriones somáticos obtenidos fueron aislados en medio MBI suplementado con cefo500 y geneticina para estimular su crecimiento. Posteriormente los embriones más grandes se transfirieron a medio MS2-CA (Sales MS, Vitaminas MS, sacarosa 2% y carbón activado 0.5%) para estimular su germinación. Las plantas obtenidas se crecieron en medio 17N (1/3 sales MS, Vitaminas MS, ANA 0.01 mg/lt y GA3 0.01 mg/lt) para estimular el enraizamiento.

Caracterización molecular de las plantas transgénicas

El ADN de las plantas transgénicas se extrajo a partir de plantas *in vitro* siguiendo la metodología propuesta por Dellaporta *et al.* (1983). Las reacciones de PCR se desarrollaron como se describió previamente con la diferencia que se emplearon los cebadores correspondientes al gen *nptII* (NPTIIsmallF 5'-CCTGCTTGCC-GAATATCATGGTGG-3' y NPTIIsmallR 5'-CGA-AATCTCGTGATGGCAGGTTGG-3'). Para el southern blot se digirieron aproximadamente

12.5 µg de ADN con la enzima de restricción EcoRI a 5 U/µg de ADN. La digestión se corrió en un gel de agarosa al 0.8% a 75 V por 4 horas. El protocolo para la realización del montaje y la transferencia se cumplió de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Roche Molecular Biochemical DIG application manual for filter hybridization). La sonda se sintetizó con los cebadores para el gen *nptII* y marcó con empleo de digoxigenina siguiendo el kit DIG PCR probe synthesis kit (Roche, Mannheim, Germany). La hibridación y detección de la luminiscencia se realizó con el kit DIG Luminescent Detection KIT (Roche, Mannheim, Germany) según con las recomendaciones del fabricante (Roche, 2000).

Resultados

Elaboración de las construcciones para ARNi

Debido a que el gen correspondiente a *AGPasa* presenta un intrón de gran tamaño fue necesario clonarlo empleando ADNc. El fragmento del gen que codifica para la subunidad grande de la *AGPasa* fue exitosamente amplificado empleando los cebadores diseñados (Figura 3A). Con los cebadores para *GBSS* se logró amplificar un fragmento de 300 pb (Figura 4A). Finalmente un fragmento de 350 pb fue obtenido del gen *SBE* (Figura 5A). En este último caso se presentó una amplificación en el control negativo. Hubo varios ensayos con miras a eliminar esta contaminación (cambio de reactivos, incluidas nuevas diluciones de primers) con resultados negativos. Sin embargo la posterior secuenciación de los productos de PCR permitió confirmar la correcta identidad del gen (ver más adelante). En cada caso, los productos de PCR se eluyeron y clonaron en el vector pENTR/D-TOPO, obteniendo un alto número de colonias recombinantes, a partir de las cuales se confirmó la correcta clonación de los insertos (Figuras 3B,C; 4B,C y 5B,C). Las secuencias obtenidas a partir de los clones permitieron identificar que los genes clonados correspondían a los genes cassava4.1_005507m.g, cassava4.1_003884m.g y cassava4.1_001595m.g del genoma de yuca (www.phytozome.com) los cuales han sido anotados como *AGPasa*, *GBSS* y *SBE* respectivamente. A partir de los clones positivos obtenidos se logró la transferencia exitosa de

los fragmentos correspondientes a cada gen en el vector pHELLSGATE12 (Figura 2). Para confirmar la clonación de los fragmentos de los genes en sentido y anti-sentido, se llevó a cabo una digestión de las construcciones con las enzimas *XhoI* y *XbaI*, las cuales permiten liberar el inserto clonado en sentido y anti-sentido respectivamente. En todos los casos se observaron las bandas correspondientes esperadas (Figuras 3D, 4D y 5D). El PCR realizado empleando las bandas eluidas permitieron confirmar la presencia de cada uno de los genes (Figuras 3E, 4E y 5E). Se generaron así tres construcciones independientes: pHELLSGATE:*AGPasa*, pHELLSGATE:*GBSS* y pHELLSGATE:*SBE*, las cuales fueron confirmadas por secuenciación.

Transformación genética

El CEF obtenido fue transformado con cada una de las construcciones. Se realizaron en total 19 ensayos de transformación para cada una de las tres construcciones. En algunos casos se obtuvieron embriones después de varios períodos de selección. Sin embargo, en la mayoría de las construcciones estos embriones no continuaron su desarrollo. Para los embriones obtenidos con las construcciones pHELLSGATE:*AGPasa* y pHELLSGATE:*GBSS* no se logró obtener plantas regenerantes. A partir de los embriones transformados con la construcción pHELLSGATE:*SBE* se lograron regenerar ocho plantas. De las evaluadas, dos mostraron una amplificación positiva del gen *nptII* (Figura 6). Las plantas restantes corresponden a escapes. Las dos plantas positivas se multiplicaron, pero presentaron un crecimiento lento. Finalmente los experimentos de Southern blot con empleo de una sonda correspondiente al gen *nptII* indicaron que las dos plantas fueron producidas a partir de eventos independientes de transformación por tener un patrón de bandas diferente (Figura 7). Las dos plantas obtenidas presentaron fenotipos anormales, con hojas curvadas, sin expandirse y de crecimiento muy lento, lo que no permitió su adaptación a suelo y condiciones de invernadero, por lo cual no se pudo realizar una caracterización fenotípica y de contenido y tipo de almidón.

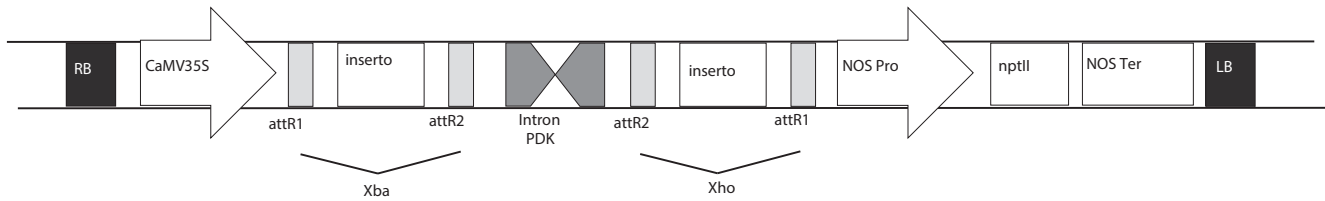


Figura 2. Casete empleado en la transformación genética de yuca para el silenciamiento de los genes implicados en la biosíntesis de almidón en yuca. Esquema del T-ADN presente en el vector pHELLSGATE. Se indican las regiones en donde se clona el fragmento correspondiente a cada uno de los genes (inserto) en sentido y antisentido. Se indican las enzimas de restricción y su posición empleadas para la liberación de los insertos en los dos sentidos.

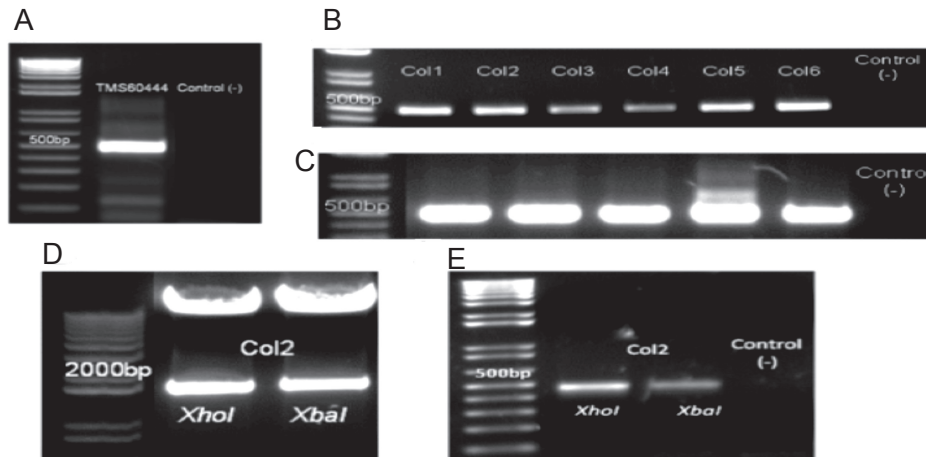


Figura 3. Amplificación y clonación del gen *AGPasa* para ser introducido en el vector de silenciamiento génico y transformación en yuca variedad 60444. **A.** Amplificación sobre el ADNc de la variedad 60444. **B.** PCR sobre colonias recombinantes (vector pENTR/D-TOPO). **C.** PCR sobre minipreps de las colonias recombinantes mostradas en B. **D.** Digestión del vector pHELLSGATE conteniendo el inserto clonado en sentido y antisentido. La digestión se realizó con las enzimas *XhoI* y *XbaI*. **E.** PCR empleando los productos de la digestión eluidos. Para todas las reacciones de PCR se emplearon los cebadores correspondientes al gen *AGPasa*.

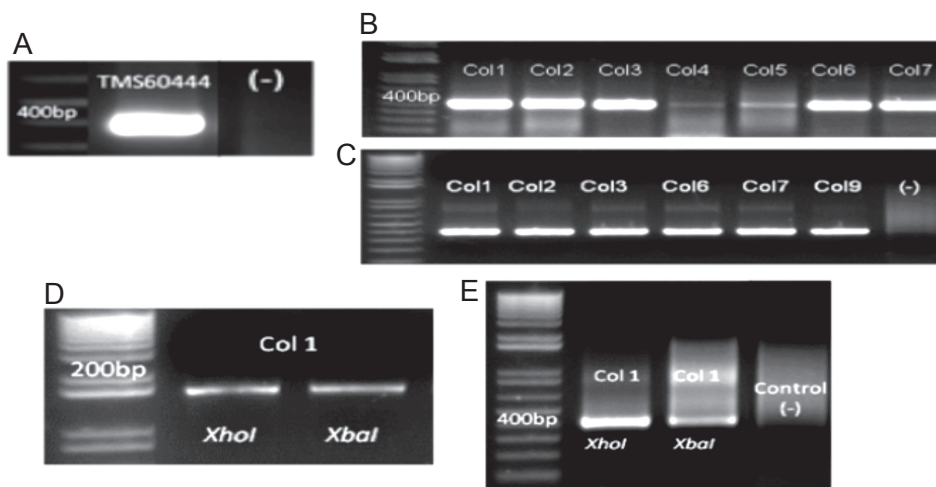


Figura 4. Amplificación y clonación del gen *GBSS* para ser introducido en el vector de silenciamiento génico y transformación en yuca variedad 60444. **A.** Amplificación sobre el ADN genómico de la variedad 60444. **B.** PCR sobre colonias recombinantes (vector pENTR/D-TOPO). **C.** PCR sobre minipreps de las colonias recombinantes mostradas en B. **D.** Digestión del vector pHELLSGATE conteniendo el inserto clonado en sentido y antisentido. La digestión se realizó con las enzimas *XhoI* y *XbaI*. **E.** PCR empleando los productos de la digestión eluidos. Para todas las reacciones de PCR se emplearon los cebadores correspondientes al gen *GBSS*.

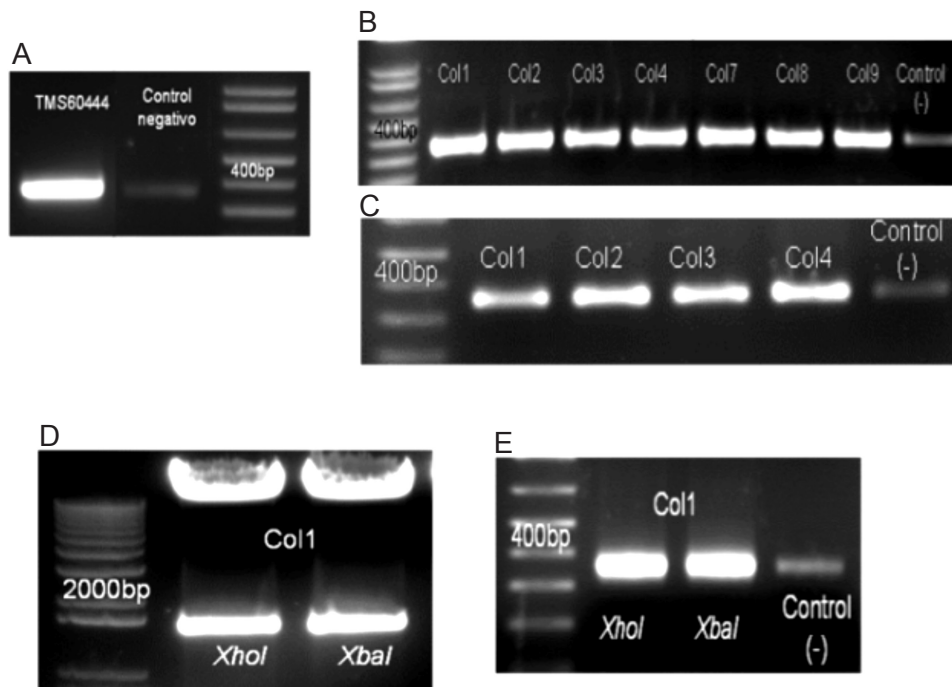


Figura 5. Amplificación y clonación del gen *SBE* para ser introducido en el vector de silenciamiento génico y transformación en yuca variedad 60444. **A.** Amplificación sobre el ADN genómico de la variedad 60444. **B.** PCR sobre colonias recombinantes (vector pENTR/D-TOPO). **C.** PCR sobre minipreps de las colonias recombinantes mostradas en B. **D.** Digestión del vector pHELLSGATE conteniendo el inserto clonado en sentido y antisentido. La digestión se realizó con las enzimas *XhoI* y *XbaI*. **E.** PCR empleando los productos de la digestión eluidos. Para todas las reacciones de PCR se emplearon los cebadores correspondientes al gen *SBE*.

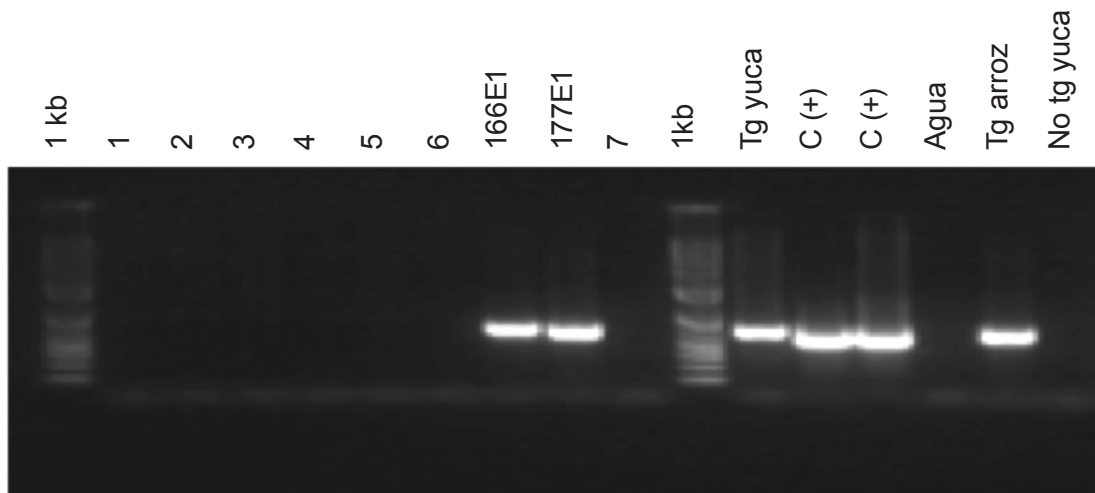


Figura 6. Evaluación de posibles plantas transgénicas de yuca, variedad 60444, silenciadas para genes implicados en la biosíntesis de almidón. Amplificación por PCR del gen *nptII*. Carriles marcados 1-6 posibles plantas transgénicas (pHELLSGATE:AGPasa). Las líneas 166E1 y 177E1 corresponden a la transformación con la construcción pHELLSGATE:SBE. El carril 7 corresponde a la amplificación de una planta transformada con la construcción pHELLSGATE:GBSS. Tg yuca hace referencia a una planta de yuca transformada con un el gen *nptII* y *GUS*. Los carriles marcados C (+) son amplificaciones a partir del vector pHELLSGATE. Tg arroz; corresponde a una planta transgénica de arroz conteniendo el gen *nptII* y *GUS*. No tg yuca; es una planta de yuca sin transformar.

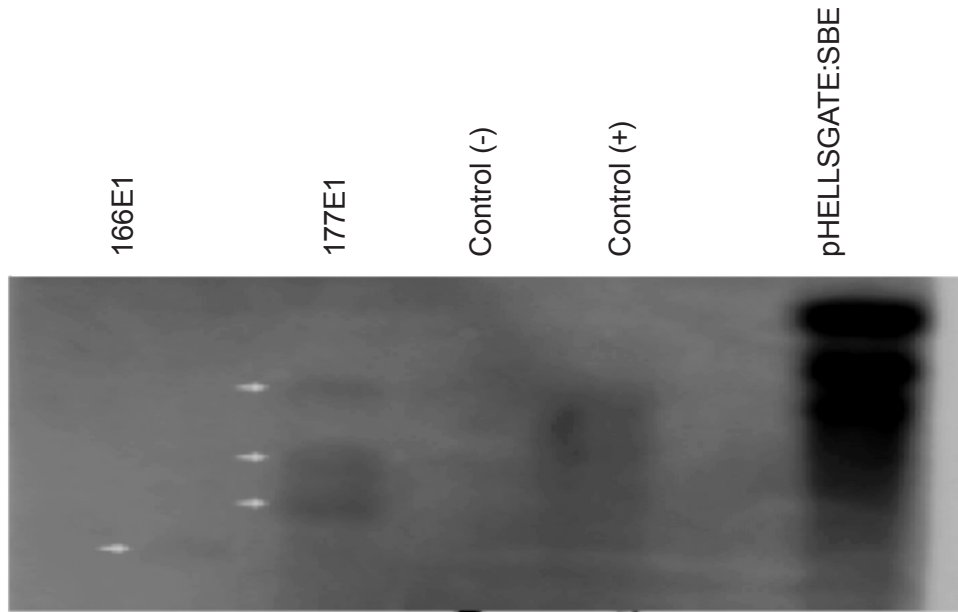


Figura 7. Determinación del número de copias del transgen en las plantas transgénicas de yuca variedad 60444 silenciadas para el gen SBE. Southern blot ADN plantas transgénicas digerido con EcoRI e hibridado con una sonda correspondiente al gen *nptII*. 166E1 y 177E1 son dos líneas de plantas transgénicas (pHELLSGATE:SBE). Control (-) plantas de yuca no transgénica. Control (+) plantas de yuca conteniendo el gen *nptII* y *GUS*. pHELLSGATE:SBE; vector con el gen *GBS* clonado en sentido y antisentido

Discusión

Las materias primas vegetales ricas en almidón son una opción para la producción de bioetanol (Smith, 2008). Sin embargo, los costos asociados con la fragmentación del almidón para realizar la fermentación de los azúcares liberados hace que la producción de bioetanol a partir de almidón no sea competitiva (Schubert, 2006). La yuca es una raíz con altos contenidos de almidón y gran tolerancia a la sequía que puede crecer en suelos tóxicos para muchos cultivos (Sayre *et al.*, 2011). En este trabajo se estudió la posibilidad de silenciar algunos de los genes de la ruta de biosíntesis de almidón en yuca con el objetivo de generar variedades con mayor contenido de azúcares libres, lo que facilitaría la producción de bioetanol.

Se seleccionaron secuencias para los tres genes más importantes de la ruta de biosíntesis de almidón: *AGPasa*, *GBSS* y *SBE*. En el momento en que se inició este trabajo no estaba disponible la secuencia del genoma de yuca, por lo cual los cebadores se diseñaron a partir de las secuencias de ESTs disponibles. La amplificación y secuenciación de

los insertos permitió confirmar la correcta amplificación e identidad de los genes, lo cual se comprobó con la liberación y anotación del genoma de yuca (www.phytozome.com).

Con el vector pHELLSGATE de silenciamiento, el cual es compatible con la tecnología Gateway (Helliwell y Waterhouse, 2003) fue posible obtener las tres construcciones pHELLSGATE:AGPasa, pHELLSGATE:GBSS y pHELLSGATE:SBE, que fueron empleadas en los experimentos de transformación.

Se realizaron varios ensayos de transformación de CEF de la variedad 60444, la cual presenta la mayor eficiencia de transformación entre múltiples variedades evaluadas. A pesar de varios ensayos de transformación no fue posible conseguir embriones o plantas regeneradas cuando se realizó la transformación con pHELLSGATE:AGPasa y pHELLSGATE:GBSS. Sólo fue posible obtener dos plantas transgénicas para la construcción pHELLSGATE:SBE y aun así, estas plantas presentaron fenotipos deformes y un crecimiento muy lento. Los resultados sugieren que el silenciamiento de estos genes puede comprometer la viabilidad de las plantas. Es muy posible que el silenciamiento así

obtenido haya sido mucho más elevado que lo reportado, lo que ocasionó su inviabilidad. Sería interesante evaluar si las plantas regeneradas presentan silenciamiento a través de Northern blot para detectar posibles ARNs pequeños de interferencia.

Hay una familia relativamente grande para cada uno de los genes *AGPasa*, *GBSS* y *SBE* con miembros dentro de ellas que se expresan en condiciones y tejidos particulares (Cortés *et al.* (n.p.); Baguma *et al.*, 2003). Es posible que el silenciamiento producido a partir de las construcciones en este ensayo dirijan el silenciamiento de varios miembros de la familia y comprometa seriamente la viabilidad de las plantas. En varios trabajos (Morandini, 2009; 2013; Patrick *et al.*, 2013) se ha encontrado que la modificación en el metabolismo del azúcar puede tener efectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Plantas transgénicas de caña de azúcar donde se disminuyó la actividad de la invertasa neutral citosólica, si bien presentaron un aumento en la concentración de sucrosa, mostraron un vigor reducido (Rossow *et al.*, 2010). El silenciamiento del gen que codifica para una invertasa vacuolar en melón incrementó la concentración de fructosa en el fruto, pero las plantas presentaron un crecimiento vegetativo disminuido y frutos más pequeños (Yu *et al.*, 2008). La modificación de invertasas en papa (Bhaskar *et al.*, 2010) y en plantas de Lotus (Welham *et al.*, 2009), si bien ha permitido incrementar la concentración de sucrosa, en algunos casos se observa reducción en las raíces y en el crecimiento de meristemas (Welham *et al.*, 2009). En relación con las sucrosas sintasas, no se han reportado trabajos en los que la modificación de este tipo de enzimas no ocasione un retardo en el crecimiento de las plantas (Patrick *et al.*, 2013). En caña de azúcar y tabaco se encontró que la modificación genética para incrementar azúcares como el sorbitol genera efectos negativos como reducción en biomasa, necrosis y senescencia temprana (Chong *et al.*, 2009; Sheveleva *et al.*, 2000). Los estudios sugieren que la modificación del metabolismo del azúcar puede comprometer el homeostasis celular, conllevando a efectos deletéreos como los que se pudieron presentar en las plantas

de yuca silenciadas en algunos genes de la ruta de almidón. No obstante para el caso de yuca se han reportado variedades naturales con altos contenidos de azúcar con crecimiento y desarrollo normales (Carvalo *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2013).

Un mayor conocimiento de los patrones de expresión y funciones de las diferentes isoformas permitiría diseñar regiones blanco más específicas de cada uno de los genes para silenciar. De igual manera, la posibilidad de emplear las mismas construcciones pero con el control de promotores inducibles podría solucionar el problema de la baja viabilidad de las plantas.

Conclusiones

- En este trabajo se pudo amplificar y clonar los genes que codifican para GBSS, SBE y AGPasa y se introdujeron en plantas de yuca por transformación genética.
- Fue posible obtener dos líneas transgénicas de plantas silenciadas para el gen *SBE*, no obstante presentaron problemas de crecimiento y deformaciones en hojas.
- Es posible que el silenciamiento de los genes de la ruta biosintética de almidón genere problemas en el desarrollo y crecimiento de plantas de yuca.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) Contrato No 046-2007D7499-155-07 y por la DIB (No 9905).

Referencias

- Baguma, Y.; Sun, C.; Ahlandsberg, S.; Mutisya, J.; Palmqvist, S.; *et al.* 2003. Expression patterns of the gene encoding starch branching enzyme II in the storage roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Sci.* 164(5):833 - 839.
- Bhaskar, P. B.; Wu, L.; Busse, J. S.; Whitty, B. R.; Hamernik, A.J.; *et al.* 2010. Suppression of the vacuolar invertase gene prevents cold-induced sweetening in potato. *Plant Physiol.* 154(2):939 - 948.
- Beltran, J.; Prias, M.; Al-Babili, S.; Ladino, Y.; Lopez, D.; Beyer, P.; Chavarriaga, P.; y Tohme, J. 2010. Expression pattern conferred by a glutamic acid-

- rich protein gene promoter in field grown transgenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz) *Planta* 231(6):1413 - 1424.
- Bull, S. E.; Owiti, J. A.; Niklaus, M.; Beeching, J. R.; Gruissem, W. *et al.* 2009. *Agrobacterium*-Mediated transformation of friable embryogenic calli and regeneration of transgenic cassava. *Nat. Protoc.* 4(12):1845 - 1854.
- Cardona, C. A. y Sanchez, O. J. 2007. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresour. Technol.* 98(12):2415 - 2457.
- Carvalho, L. J.; de Souza, C. R.; de Mattos Cascardo, J. C.; Junior, C. B.; y Campos, L. 2004. Identification and characterization of a novel cassava (*Manihot esculenta* Crantz) clone with high free sugar content and novel starch. *Plant Mol. Biol.* 56(4):643 - 659.
- Curtis, M. D. y Grossniklaus, U. 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* 133(2):462 - 469.
- Chong, B. F.; Abeydeera, W. P.; Glassop, D.; Bonnett, G. D.; O'Shea, M. G.; y Brumbley, S. M. 2010. Coordinated synthesis of gentiobitol and sorbitol, evidence of sorbitol glycosylation in transgenic sugarcane. *Phytochem.* 71(7):736 - 741.
- Dellaporta, S.; Wood, J.; y Hicks, J. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1(1):19 - 21.
- Fantazzini, D.; Höök, M.; y Angelantoni, A. 2011. Global oil risks in the early 21st century. *Energy Policy* 39:7865 - 7873.
- Gura, T. 2009. Driving biofuels from field to fuel tank. *Cell* 138(1):9 - 12.
- Helliwell, C. y Waterhouse, P. 2003. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods Enzymol.* 30:289 - 295.
- Lin, Y. y Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69(6):627 - 642.
- Lincoln, S. F. 2005. Fossil fuels in the 21st century. *Ambio* 34(8):621 - 627.
- Morandini, P. 2009. Rethinking metabolic control. *Plant Sci.* 176:441 - 451.
- Morandini, P. 2013. Control limits for accumulation of plant metabolites: brute force is no substitute for understanding. *Plant Biotechnol. J.* 11(2):253 - 267.
- Mutisya, J.; Sathish, P.; Sun, C.; Andersson, L.; Ahlandsberg S. *et al.* 2003. Starch branching enzymes in sorghum (*Sorghum bicolor*) and barley (*Hordeum vulgare*): comparative analyses of enzyme structure and gene expression. *J. Plant Physiol.* 160(8):921 - 930.
- Nguyen, T. L.; Gheewala, S. H.; y Garivait, S. 2007. Full chain energy analysis of fuel ethanol from cassava in Thailand. *Environ. Sci. Technol.* 41(11):4135 - 4142.
- Patrick, J. W.; Botha, F. C.; y Birch, R. G. 2013. Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants. *Plant Biotechnol. J.* 11(2):142 - 156.
- Rossouw, D.; Kossmann, J.; Botha, F. C.; y Groenewald, J. H. 2010. Reduced neutral invertase activity in the culm tissues of transgenic sugarcane plants results in a decrease in respiration and sucrose cycling and an increase in the sucrose to hexose ratio. *Funct. Plant Biol.* 37(1):22 - 31.
- Sayre, R.; Beeching, J. R.; Cahoon, E. B.; Egesi, C.; Fauquet, C. *et al.* 2011. The biocassava plus program: biofortification of cassava for Sub-Saharan Africa. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62:251 - 272.
- Schubert, C. 2006. Can biofuels finally take center stage? *Nat. Biotechnol.* 24(7):777 - 784.
- Sheveleva, E. V.; Jensen, R. G.; y Bohnert, H. J. 2000. Disturbance in the allocation of carbohydrates to regenerative organs in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *J. Exp. Bot.* 51(342):115 - 122.
- Smith, A. M. 2008. Prospects for increasing starch and sucrose yields for bioethanol production. *Plant J.* 54(4):546 - 558.
- Souza H. A.; Sousa A.; Souza Ladeira, T. M.; Santos, A. I.; y da Silva Pena, R. 2013. Physicochemical properties of three sugary cassava landraces. *Cienc. Rural* 43(5):792 - 796.
- Taylor, N.; Gaitán-Solís, E.; Moll, T.; Trauterman, B.; Jones, T.; Pranjali, A.; Trembley, C.; Abernathy, V.; Corbin, D.; y Fauquet, C. 2012. A high-throughput platform for the production and analysis of transgenic cassava (*Manihot esculenta*) plants. *Tropical Plant Biol.* 5(1):127 - 139.
- Taylor, N. J.; Masona, M. V.; Carcamo, R. *et al.* 2001. Production of embryogenic tissues and regeneration of transgenic plants in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica* 120(1):25 - 34.
- Welham, T.; Pike, J.; Horst, I.; Flegmetakis, E.; Katinakis, P.; Kaneko, T.; *et al.* 2009. A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, *Lotus japonicus*. *J. Exp. Bot.* 60(12):3353 - 3365.
- Yu, X.; Wang, X.; Zhang, W.; Qian, T.; Tang, G.; Guo, Y.; y Zheng, C. 2008. Antisense suppression of an acid invertase gene (MA11) in muskmelon alters plant growth and fruit development. *J. Exp. Bot.* 59(11):2969 - 2977.
- Zeeman, S.C.; Kossmann, J.; Smith, A.M. 2010. Starch: its metabolism; evolution; and biotechnological modification in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 61:209-234.