



Transformación genética de dos especies de cítricos asistida por *Agrobacterium tumefaciens*, usando el gen reportero *gusA* y el péptido antimicrobiano *Atta*

Marco Tulio Buenrostro-Nava | Christian Omar Gómez-Díaz | Aremi Mendoza-Espinoza
| Salvador Guzmán-González | Gilberto Manzo-Sánchez

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias | UNIVERSIDAD DE COLIMA

correo-e: mbuenrostro@uclm.mx

Resumen

Los cítricos son de los frutales de mayor importancia a nivel mundial; sin embargo, las plagas y enfermedades ocasionan cuantiosas pérdidas económicas. El uso de ingeniería genética es uno de los métodos viables para el mejoramiento de los cítricos. El objetivo de este trabajo fue introducir el péptido antimicrobiano atacina A (*Atta*) y el gen reportero *gusA* en plántulas de cítricos usando *Agrobacterium tumefaciens* como vector. Semillas de limón mexicano *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle variedad «Colimex» y del portainjerto «Macrophylla» (*Citrus macrophylla*) fueron germinadas bajo condiciones *in vitro* y transformadas usando *A. tumefaciens*, conteniendo el plásmido binario con el gen antimicrobiano *Atta* y el gen reportero *gusA*. Posteriormente, se regeneraron brotes bajo condiciones selectivas y cuando tenían un tamaño de 2 a 4 mm fueron aislados y sometidos a una prueba histoquímica para detectar la expresión del gen *gusA*. Los resultados obtenidos mostraron un 100% (12 ex-plantas muestreadas) de transformación genética para la variedad «Macrophylla», mientras que «Colimex» presentó sólo un 50% (12 ex-plantas muestreadas). Se analizó y documentó la presencia del gen reportero *gusA* en los brotes, pero aún está pendiente corroborar la presencia del gen antimicrobiano *Atta* mediante PCR, lo cual producirá resultados más detallados sobre este trabajo.

Palabras clave: cítricos, Huanglongbing, *Agrobacterium tumefaciens*, gen *gusA*.

Introducción

El género *Citrus* comprende especies que se concentran en más de cien países en el mundo (Albrecht *et al.*, 2012). Al igual que en la mayoría de los cultivos, las principales pérdidas durante su producción son causadas por enfermedades, dentro de las cuales destaca el *Huanglongbing* (HLB), dragón amarillo o enverdecimiento de los cítricos, que posiblemente es la más destructiva por generar cuantiosas pérdidas económicas a la industria en las zonas afectadas (Gottwald, 2010). El HLB se detectó por primera vez en América en 2004, en el estado de São Paulo, Brasil, y después en 2005 se confirmó su presencia en Florida, EUA, donde ha tenido efectos devastadores por su vertiginosa velocidad de disseminación. La enfermedad se ha extendido a la mayoría de las zonas cítricas de todo el mundo, incluyendo Asia, Arabia Saudita y África (Albrecht *et al.*, 2012; Bové, 2006).

Se ha reportado la transformación genética en varias especies de cítricos mediante diversas metodologías. Luth y Moore (1999) fueron los primeros en reportar la transformación genética de toronja (*Citrus paradisi*) al introducir mediante *Agrobacterium tumefaciens* el gen reportero *gusA* y el marcador de selección *npIII*. Los autores detectaron la presencia del gen *gusA* en el 43.5% de los brotes regenerados después de la transformación; sin embargo, la mayoría resultaron ser quimeras y sólo un 11.9% mostró actividad en todos los tejidos.

El método de transformación genética más empleado es el de *A. tumefaciens*, ya que tiene la capacidad de transferir a las plantas un segmento específico de su genoma a los núcleos de las células de las plantas susceptibles. El ADN de transferencia (ADN-T) se delimita por 23 pares de bases que se repite en el plásmido inductor de tumores (Ti). Este plásmido sintético se añade a colonias de *A. tumefaciens* que albergan los plásmidos Ti que se encuentran normalmente en la naturaleza (Otten *et al.*, 2008).

De manera natural el ADN-T es importante para la infección, ya que contiene los genes que codifican para la producción de reguladores del crecimiento, cuando se expresa en la célula de la planta interrumpen el desarrollo y los eventos de división celular (Christie, 2009). Este sistema de transformación genética se ha usado ampliamente con propósitos biotecnológicos (Otten *et al.*, 2008).

La proteína atacina A (*Atta*) es de un tamaño de 20kD y es secretada por hemolinfas de *Tricoplusia ni* Hubner (Kang *et al.*, 1996), así como por *Drosophila melanogaster* Meigen. Su función principal es combatir las infecciones bacterianas a estos organismos. Se ha demostrado que la proteína *Atta* inhibe el crecimiento de las bacterias Gram negativas y aumenta la permeabilidad de la membrana externa (Engstrom *et al.*, 1984).

Metodología

Se usaron semillas de frutos maduros de limón mexicano *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle, variedad «Colimex», obtenidos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) estación experimental Tecomán y del portainjerto «Macrophylla» (*Citrus macrophylla*) del vivero comercial Edén.

Las semillas fueron extraídas de los frutos y sumergidas en 200 mL de una solución, conteniendo 0.002% de jabón líquido comercial en un vaso de precipitado de 500 mL con agitación de 15 a 20 min; al concluir el tiempo, se enjuagaron varias veces con agua desionizada hasta retirar por completo el jabón. Al término del enjuague, se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 20% (v/v) adicionado con TWEEN 20 (0.02% v/v), durante 20 minutos.

En seguida, se eliminó el exceso de cloro (dentro de la campana de flujo laminar) y se enjuagó con agua destilada estéril, repitiendo los enjuagues en 3 ocasiones. Posteriormente, fueron germinadas bajo condiciones *in vitro* en frascos con 25 mL de medio

MS (Murashig & Skoog, 1992), adicionado con vitaminas B5 (40). Los frascos se incubaron a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ en la oscuridad durante 30 días, seguido de 15 días bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

A. tumefaciens que lleva el plásmido binario que contiene el gen antimicrobiano *AttA* y el gen reportero *gusA* se cultivó en medio YEP sólido (Sambrook & Russell, 2004), adicionado con rifampicina ($25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y kanamicina ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Posteriormente, se inoculó un frasco Erlenmeyer con 50 mL de medio YEP suplementado con los antibióticos descritos anteriormente y se cultivó a 28°C durante 48 horas con agitación constante. Las bacterias se recolectaron por centrifugación a 6 000 rpm a 4°C por 10 minutos, y se re-suspendieron en medio MS líquido adicionado con el compuesto fenólico Acetosiringona (100 mM).

Posteriormente, se cortaron los explantes de epicótilo de aproximadamente 1 cm de largo y se incubaron en la solución con la bacteria por 20 min, después los explantes fueron transferidos a un medio de regeneración (MS, vitaminas B5, BA $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 2,4-D $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, sacarosa $30 \text{ g}\cdot\text{L}$ y Phytigel $3 \text{ g}\cdot\text{L}$) complementado con Acetosiringona (100 mM).

Los explantes fueron cocultivados con la bacteria por 3 días bajo condiciones de oscuridad, después fueron transferidos a un medio de selección, el cual consistió del medio de regeneración más carbencilina $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, cefotaxima $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y kanamicina $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Los explantes se cultivaron bajo las condiciones de luz antes descritas. Todos los antibióticos y los productos químicos aquí descritos fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, EUA), a menos que se indique lo contrario.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos a partir de brotes de 2 a 4 mm de longitud mostraron la expresión del gen *gusA* en un 100% (12 explantes muestreados) de los brotes de la especie «Macrophylla», mientras que la variedad «Colimex» presentó sólo 50% (12 explantes

muestreados). Esto denota que *Agrobacterium tumefaciens* mostró alta eficiencia de transformación para la especie *C. macrophylla*; en comparación con los resultados previamente reportados (Luth & Moore, 1999) se obtuvo solamente un 11.9% de transformación para el híbrido citrange «Carrizo». En el presente trabajo se puede observar la expresión del gen *gusA* uniformemente por toda la nervadura de la hoja en las dos especies transformadas.

Existen estudios en los que se reportan haber obtenido sólo 7.9% positivo de 168 brotes para la prueba histoquímica con *gusA* (Peña *et al.*, 1995). En el presente trabajo no sólo se observaron diferencias en los niveles de expresión entre las dos especies estudiadas, sino que también se observaron diferencias dentro de la misma especie, incluso dentro del tejido muestreado (figura 1). A pesar que estos estudios son preliminares y solamente se muestrearon un total de 24 clones, la variación en los niveles de expresión parece ser común en otras especies de cítricos según lo reportado previamente (Luth & Moore, 1999).

De acuerdo con la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la figura 2, se corroboró la presencia del péptido antimicrobiano *AttA* en los clones tres y cuatro. La falta de amplificación del gen en los clones uno y dos podría asociarse con la presencia de tejido quimérico, por lo que se estudiarán a mayor detalle. Después se comprobará la secuencia de este péptido utilizando la técnica Southern blot.

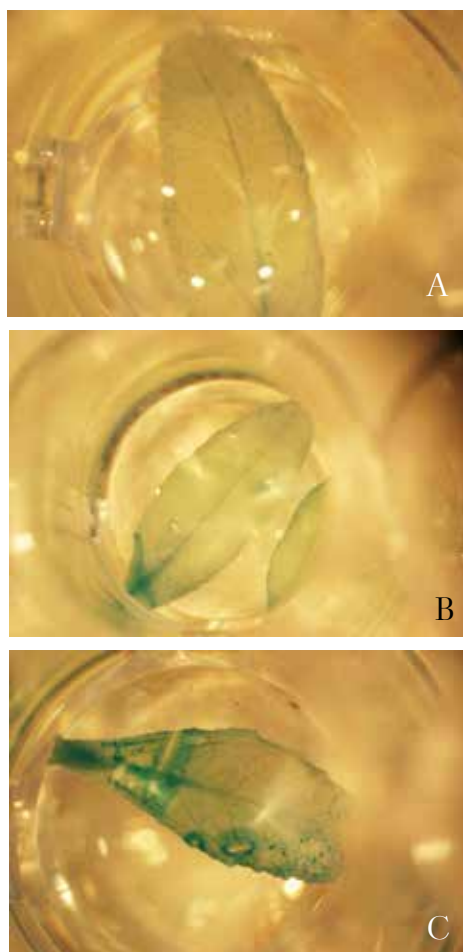


Figura 4. Comparación de especies de cítricos transgénicos de acuerdo con la expresión del gen *gusA* analizada histoquímicamente. Hojas de brotes transgénicos de *Citrus aurantifolia* con un bajo (A) e intermedios (B) niveles de expresión. Hojas de *Citrus macrophylla* con altos niveles de expresión del gen reportero (C).

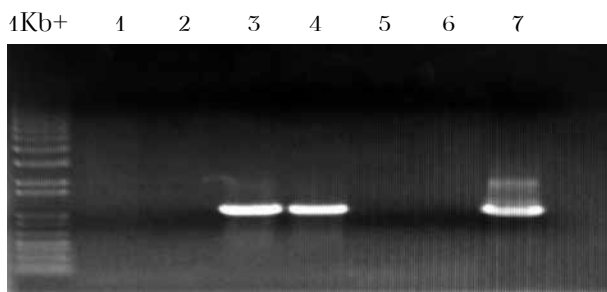


Figura 2. Amplificación del péptido antimicrobiana *AttA*. Carriles 1-4 ADN genómico de cuatro clones; 5 no ADN, 6 ADN de planta no transformada (control negativo); 7 ADN del plásmido con el gen *AttA* (control positivo).

Conclusiones

Con el presente trabajo se demuestra que *Agrobacterium tumefaciens* puede usarse para introducir de manera exitosa el gen reportero *gusA* y los péptidos antimicrobianos en explantes de dos especies de cítricos de alta importancia económica en el estado de Colima.

Aunque se analizó y demostró la presencia del gen reportero en los brotes mediante la prueba histoquímica y la técnica PCR, es necesario corroborar la presencia del gen antimicrobiano *AttA* mediante Southern blot, lo cual producirá resultados detallados sobre este trabajo.

Agradecimientos

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado (Promep) por haber financiado el proyecto 103.5/12/8242.

Referencias

- Albrecht, U., McCollum, G., Bowman, K. (2012). Influence of rootstock variety on Huanglongbing disease development in field-grown sweet orange *Citrus sinensis* (L.) Osbeck trees. *Scientia Horticulturae*, 138:2010-2020.
- Bové, J. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(4):7-37.
- Christie, P.J. (2009). *Agrobacterium and plant cell transformation* (3rd ed.). Houston: Oxford Academic Press.
- Engstrom, P., Carlsson, A., Engstrom, A., Tao, Z., Bennich, H. (1984). The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO Journal*. 3(13):3347-3351.
- Gamborg, O., Miller, R., Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(4):151-158.
- Gottwald, T. (2010). Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology*, 48:199-139.

- Kang, D., Lundstrom, A., Steiner, H. (1996). Trichopilusa ni attacin A, a differentially displayed insect gene coding for an antibacterial protein. *Gene*, 174(2):245-449.
- Luth, D., Moore G. (1999). Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 57:219-222.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3):473-497.
- Otten, L., Burr, T., Szegedi, E. (2008). *Agrobacterium*: a disease-causing bacterium (pp. 4-46). In *Agrobacterium: from Biology to Biotechnology*. New York: Springer.
- Peña, L., Cervera, M., Juárez J., Navarro, A., Pina, J., Durán-Vila, N., Navarro, L. (1995). *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 14(10):646-649.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2004). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.