

Evaluación del efecto del daño mecánico sobre la eficacia de transformación genética de embriones somáticos de *Carica papaya* L. mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Salvador Guzmán-González | Aided Evelina Montes-Peniche
| Marco Tulio Buenrostro-Nava | Pedro Valadez-Ramírez

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias | UNIVERSIDAD DE COLIMA

Julio Vega-Arreguín

Escuela Nacional de Estudios Superiores | UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, Unidad León, Guanajuato

correo-e: sguzman@ucol.mx

Resumen

La producción de papaya en el estado de Colima es afectada por enfermedades causadas por agentes virales, principalmente *Papaya ringspot poty virus-P*, por lo que el uso de *Agrobacterium tumefaciens* es viable para inducir resistencia a los virus. La eficiencia de transformación depende de la presencia de compuestos fenólicos provocados por daño mecánico. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes métodos de inducción de daño mecánico sobre la eficacia de transformación genética de embriones de *Carica papaya* L., mediante *A. tumefaciens*. El daño mecánico en un gramo de embriones somáticos de *Carica papaya* L. fue inducido mediante el uso de carborúndum (0.5 g en 15 mL de H₂O estéril), biobalística (un disparo a 0 cm de distancia con una presión de 150 psi) o sonicación (15 s a 40 kHz) en la presencia de *A. tumefaciens*. Los resultados mostraron que el contenido total de compuestos fenólicos fue mayor al utilizar el método desonificación. De acuerdo con la presencia de focos azules en los embriones somáticos transformados, se observó que la mayor eficiencia de transformación se encontró con el método de carborundum, con una cantidad de 22.5 focos azules por gramo. Asimismo, se observó que los diversos métodos de inducción de daño mecánico afectan la eficacia de *Agrobacterium tumefaciens* en la transformación genética de embriones somáticos de *Carica papaya* L.

Palabras clave: compuestos fenólicos, *A. tumefaciens*, genes *vir*.

Introducción

La papaya (*Carica papaya* L.) es uno de los cultivos más rentables para México, motivo por el cual su establecimiento va en aumento en los últimos años; sin embargo, es afectada por enfermedades provenientes de agentes virales, principalmente *Papaya ringspot poty virus*-P (PRSV-P) (Gonsalves, 1998), de tal forma que se reportan pérdidas en la producción de hasta el 85% en Colima, Veracruz y Guerrero cuando no existe un método de control. El PRSV-P causa mosaico severo y distorsión de las hojas, anillos concéntricos en los frutos y manchas aceitosas en la parte superior de los tallos y pecíolos. Además, el mismo virus impide el crecimiento de la planta y reduce drásticamente el tamaño y la calidad de las frutas (Yeh *et al.*, 2007).

En ese sentido, la mejor alternativa de control de PRSV-P en papaya es el uso de la ingeniería genética. La transformación genética de explantes de papaya mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es una herramienta eficiente (Fitch *et al.*, 2003). Sin embargo, para que este proceso de transferencia tenga lugar es necesario que la célula vegetal posea una herida que inicie así la síntesis de compuestos fenólicos (Trick y Finer, 1997), los cuales activan los genes de virulencia (*vir*).

Una de las estrategias para mejorar la eficiencia de transformación es la inducción de compuestos fenólicos en el explante, los cuales se producen al ocasionar un daño mecánico del mismo, causado comúnmente por agitación en presencia de carborúndum, por biobalística o por sonicación (Trick y Finer, 1997). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes métodos de inducción de daño mecánico sobre la eficiencia de transformación genética de embriones de *Carica papaya*.

Metodología

Se emplearon masas de embriones somáticos de papaya Maradol de tres meses de edad, inducidos a

partir del cultivo de embriones cigóticos en medio Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), los cuales se sometieron a daño mecánico, con un gramo de embriones para cada tratamiento. Se evaluaron métodos de agitación con carborúndum (Cheng *et al.*, 1996), bombardeo con micropartículas (Helios™ GeneGun, BioRad) y sonicación (Jiang *et al.*, 2004). Embriones somáticos intactos se emplearon como control de referencia. Se evaluó el contenido total de compuestos fenólicos, tales moléculas se extrajeron y cuantificaron siguiendo el protocolo descrito por Ainsworth y Gillespie (2007).

Para la cuantificación del contenido total de fenoles se calculó una curva estándar elaborada con ácido gálico (Sigma) a concentraciones de 0, 100, 200, 400, 800 y 1600 μ M de ácido gálico preparado en metanol al 95% (v/v), donde cada punto de calibración se realizó por triplicado. El contenido se expresó como equivalente de ácido gálico medido con la ecuación de regresión entre los puntos de calibración del compuesto fenólico y su absorbancia a 765 nm.

Transformación genética con *A. tumefaciens*

Con la ayuda de un asa bacteriológica, se tomó una muestra de *A. tumefaciens* cepa LBA4404 recombinante (con el vector binario pCambia1301) que se inoculó en 50 mL de medio YM líquido estéril con antibióticos de selección. Los embriones somáticos se incubaron en la suspensión de *A. tumefaciens* activada durante 10 min y se colocaron en medio de cocultivo MS (Dandekar & Fisk, 2005) y se procedió a realizar el ensayo histoquímico.

Ensayo histoquímico de GUS

Cinco días después del cocultivo se llevó a cabo la detección histoquímica de la actividad transitoria de la β -glucuronidasa, para esto se empleó el estuche comercial « β -glucuronidase reporter gene staining» (Sigma), siguiendo las recomendaciones del

fabricante. Se empleó un diseño estadístico completamente al azar con cuatro tratamientos: *T1*) agitación con carborundum, *T2*) biobalística, *T3*) sonicación y *T4*) sin daño mecánico o control; con cuatro repeticiones para cada uno. Se evaluó el contenido de compuestos fenólicos producidos en cada uno de los tratamientos y la cantidad de focos azules registrada en el material vegetal. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de medias de Tukey al 0.05 de probabilidad usando el paquete estadístico SAS, versión 9 (2002).

Resultados y discusión

Los resultados muestran que el daño mecánico por sonicación induce una mayor cantidad de compuestos fenólicos (cuadro 1), lo que podría estar relacionado al hecho que este proceso genera una considerable cantidad de fisuras y canales uniformes en el tejido expuesto a la bacteria (Trick y Finer, 1997) comparado con los otros tratamientos donde probablemente esto no se logre. No obstante, la funcionalidad de los cuatro tratamientos en la transformación de los embriones somáticos de papaya por *A. tumefaciens* ya ha sido demostrada con anterioridad (Fitch *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2004).

Cuadro 1

Efecto del método de inducción de daño mecánico en embriones somáticos de papaya en la producción de compuestos fenólicos

Tipo de daño mecánico	Contenido total de compuestos fenólicos (equivalentes de ácido gálico)*
Sonicación	659.17 a
Sin daño (testigo)	494.67 b
Carborundum	437.5 b
Biobalística	390.0 b

*Medias de Tukey con letra distinta dentro de la columna son estadísticamente diferentes ($n = 3$, $P \leq 0.05$).

Según las diversas investigaciones, los compuestos fenólicos y otros como carbohidratos son importantes para que ocurra la «activación» de los genes *vir* de *A. tumefaciens* y en consecuencia exista la movilización del T-DNA específico hacia la célula blanco (Stachel *et al.*, 1985), hecho que se corroboró en este estudio con la expresión transitoria del gen *gus* (figura 1).

El que haya existido transformación genética (evaluada por la presencia de focos azules) en los embriones somáticos de papaya que no recibieron algún daño mecánico, obedece a que los compuestos fenólicos son parte del metabolismo de este material vegetal en el proceso de la embriogénesis somática (Kouakou *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2008; Alemanno *et al.*, 2003; Hosseini *et al.*, 2011).

En este estudio no se observó una relación entre la cantidad de compuestos fenólicos y la eficiencia de transformación (cantidad de focos azules). Sin embargo, fue necesario que existiera algún daño mecánico en la célula para que la eficiencia de transformación se incrementara (cuadro 2). Resultados similares fueron reportados por de la Riva *et al.* (1998), quienes indican que la detección de compuestos fenólicos y monosacáridos por la maquinaria genética de *Agrobacterium* responde a bajos niveles de compuestos fenólicos. Esta sensibilidad denota la existencia de un límite o umbral en la cantidad de esos compuestos para evitar una toxicidad hacia la bacteria que pudiera afectar la eficiencia de transformación, tal como se ha demostrado (Plyuta *et al.*, 2013).

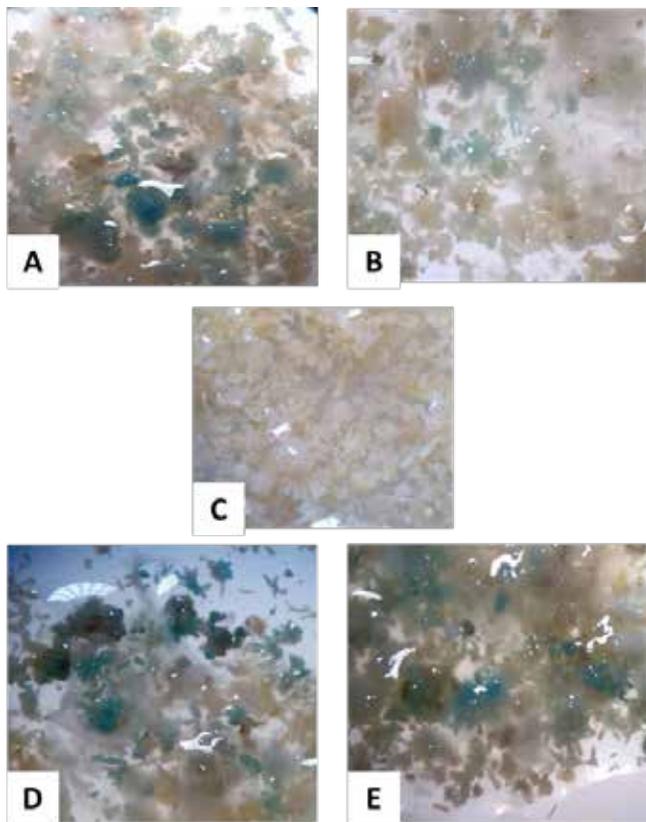


Figura 1. Expresión del gen reportero GUS en embriones somáticos de papaya sometidos a la inducción de daño mecánico usando: A) carborúndum, B) sin daño mecánico, C) sin daño y sin *A. tumefaciens* (doble control), D) biobalística, E) sonicación.

Cuadro 2

Cantidad de focos azules de acuerdo con el tipo de daño mecánico en embriones somáticos de papaya

Tratamiento	Cantidad de focos azules*
Sin tratamiento (testigo)	7.5 c
Sonicación	16.0 b
Carborúndum	22.5 a
Biobalística	17.5 ab

*Medias de Tukey con letra distinta dentro de columna son estadísticamente diferentes ($n = 3$, $Pr \leq 0.05$)

Conclusiones

Los diversos métodos de inducción de daño mecánico afectan la eficacia de transformación genética de embriones somáticos de *Carica papaya* L. mediante *Agrobacterium tumefaciens*. También se observó una correlación entre la cantidad de contenidos fenólicos y la eficiencia de transformación; se observó la transformación más alta (22.5 focos azules·g⁻¹ de embriones) en el tratamiento donde se indujo una concentración intermedia de fenoles (437.5 equivalentes de ácido gálico).

Agradecimientos

Al Fondo Sectorial SAGARPA-Conacyt 2011-C04 por el financiamiento del proyecto 163213.

Referencias

- Ainsworth, E.A., Gillespie, K.M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4):875-877.
- Alemanno, L., Ramos, T., Gargadenec, A., Andary, C., Ferriere, N. (2003). Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, 92(4):613-623.
- Cheng, Y.H., Yang, J.S., Yeh, S.D. (1996). Efficient transformation of papaya by coat protein gene of papaya ringspot virus mediated by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with carborundum. *Plant Cell Reports*, 16:127-132.
- Dandekar, A., Fisk, H.J. (2005). Plant transformation. *Agrobacterium-mediated gene transfer. Methods in Molecular Biology*, 286: 35-46.
- Fitch, M.M.M., Manshardt, R.M., Gonsalves, D., Slightom, J.L. (1993). Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 12:245-249.

- Gonsalves, D. (1998). Control of *Papaya ringspot virus* en papaya: a case study. *Annual Review of Phytopathology*, 36:415-437.
- Hosseini, S.S., Mashayekhi, K., Alizadeh, M., Ebrahimi, P. (2014). Effect of salicylic acid on somatic embryogenesis and chlorogenic acid levels of carrot (*Daucus carota* cv. Nantes) explants. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*, 1:405-413.
- Jiang, L., Maoka, T., Komori, S., Fukamachi, H., Kato, H., Ogawa, K. (2004). An efficient method for sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of coat protein (CP) coding genes into papaya (*Carica papaya* L.). *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*, 37(3):489-498.
- Kouakou, T.H., Waffo-Téguo, P., Kouadio, Y.T., Valls, J., Richard, T., Decendit, A., Mérillon, J.M. (2007). Phenolic compounds and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90(4):25-29.
- Plyuta, V., Zaitseva, J., Lobakova, E., Zagoskina, N., Kuznetsov, A., Khenel, I. (2013). Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 121(11):1073-1084.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3):473-497.
- Reis, R., Batista, M.T., Canhoto, J.M. (2008). Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. *Protoplasma*, 232(3):193-202.
- De la Riva, G.A., Enríquez-Obregón, G.A., Vázquez-Padrón, R.I., Prieto-Samsonov, D.L., Selman-Housein, G.A. (1998). Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant*, 206(4):20-27.
- SAS Institute Inc. (2002). SAS/STAT Version 8. User's Guide. Cary, NC: Autor.
- Stachel, S.E., Messens, E., Van Montagu, M., Zambryski, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 318(6047):624-629.
- Trick, H.N., Finer J.J. (1997). Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Research*, 6(5):329-336.
- Yeh, S.D., Bau, H.J., Kung, Y.J., Yu, T.A. (2007). Papaya (pp. 73-96). En Pua, E.C., Davey, M.R. (Eds.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Heidelberg: Springer-Verlag.