

EFECTO DE SURFACTANTES EN LA TRANSFORMACIÓN Y REGENERACIÓN DE LIMÓN MEXICANO *Citrus aurantifolia* (CHRISTM.) SWINGLE, USANDO *Agrobacterium tumefaciens* CONTENIENDO EL GEN *Attacin E*.

Marco Tulio Buenrostro-Nava*
María Luisa Esquivel-Esquivel,
Salvador Guzmán-González,
Gilberto Manzo-Sanchez.

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
Y CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS DE LA UNIVERSIDAD DE
COLIMA.

*Autor responsable
mbuenrostro0@uclm.mx

USE OF SURFACTANTS ON SHOOT INDUCTION AND GENETIC TRANSFORMATION OF MEXICAN LIME *Citrus aurantifolia* (CHRISTM.) SWINGLE USING *Agrobacterium tumefaciens* CONTAINING THE *Attacin E* GENE.

RESUMEN

El Huanglongbing (HLB) o dragón amarillo se considera la enfermedad más devastadora de los cítricos. Dicha enfermedad está asociada con la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. Hasta ahora no se ha encontrado resistencia parcial contra dicha bacteria en ninguna de las especies del género *Citrus*. Por ello es importante hacer uso de la ingeniería genética para introducir genes de resistencia a microorganismos. En el presente trabajo se evaluó el efecto de surfactantes sobre la regeneración de brotes y las eficiencias de transformación. Epicotilos de limón mexicano fueron expuestos a *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo un plásmido binario *AttE* y el gen reportero *GUS*. Posteriormente fueron colocados en medio de cultivo MS adicionado con Pluronic F-68® o Tween 20® en concentraciones de 0, 0.01, 0.1 y 0.5%.

Los resultados muestran una mayor eficiencia de inducción de brotes en concentración de 0.01% en ambos surfactantes, mientras que el mayor número de brotes por explante se observó en la ausencia o presencia de Tween 20 al 0.01%.

Palabras clave: HLB, péptidos antimicrobianos, surfactantes.

ABSTRACT: Huanglongbing (HLB) or greening is considered the most devastating disease of citrus worldwide. This disease is associated with the bacterium *Candidatus Liberibacter* spp. So far no partial resistance against this bacteria has been found in any of the *Citrus* species or its relatives. It is therefore important to make use of genetic engineering to introduce resistance genes to microorganisms. In the present work, we evaluated the effect of surfactants on shoot regeneration and transformation efficiencies. Mexican lemon epicotyls were exposed to *Agrobacterium tumefaciens* containing a binary plasmid containing the *AttE* and the *GUS* reporter genes. Subsequently, epicotyls were placed on MS medium added with Pluronic F-68® or Tween 20® in concentrations of 0, 0.01, 0.1 and 0.5%. The results showed a higher efficiency of shoot induction at 0.01% concentration in both surfactants, while the highest number of shoots per explant was observed in the absence or presence of 0.01% Tween 20.

Keywords: HLB, antimicrobial peptides, surfactants.

I N T R O D U C C I Ó N

El Huanglongbing (HLB) o dragón amarillo se considera la enfermedad más devastadora de los cítricos. Dicha enfermedad está asociada con la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp, de la cual se han descrito tres especies: *Ca. L. asiaticus*, que predomina en Asia; *Ca. L. africanus*, en África y *Ca. L. americanus*, presente en Brasil. El HLB puede ser transmitido de árbol en árbol, por dos psílidos: *Diaphorinacitri* en Asia y América, y *Triozaerytreae* en África (Bové, 2006).

En México también se han visto afectados los cítricos, incluyendo *Citrus aurantifolia*, por el HLB causado por la especie *Ca. L. asiaticus*, que fue reportada por primera vez en el 2009 después de registrarse un incremento en las poblaciones de *D. citri*. Tal situación hace que la producción sea cada vez menor generando un aumento en el desempleo (Robles-González *et al.*, 2013).

A pesar de que existe resistencia parcial en las especies antes mencionadas, el uso del mejoramiento genético convencional entre especies trifoliadas y limón mexicano es limitado por la compatibilidad que existe entre las plantas de los diferentes géneros (Gill *et al.*, 2003). Por lo tanto, es necesario recurrir a otras alternativas, principalmente biotecnológicas, como la ingeniería genética usando *Agrobacterium tumefaciens*, que pudiera funcionar en limón mexicano contra el HLB, introduciendo en el genoma de la planta péptidos antimicrobianos sintetizados en insectos como las attacinas, presentes en la polilla de seda gigante *Hyalophora cecropia* y *Drosophila melanogaster* (Shao-Cong *et al.*, 1991). Aunque existe un gran número de reportes sobre la transformación genética de diversas especies del género *Citrus*, no hay suficientes publicaciones sobre la eficiencia de regeneración y modificación genética del *Citrus aurantifolia*, por lo tanto es necesario realizar estudios sobre el aumento en la eficacia de regeneración de brotes y de transformación de este cultivo.

En investigaciones recientes se ha observado que el uso de surfactantes aumenta la inducción de brotes en *C. sinensis* (Curtis y Mirkov, 2012), además de incrementar la eficiencia de transformación (Khanna y Daggard, 2003). En el presente proyecto, se pretende evaluar algunos de éstos como tratamientos para la eficiencia de transformación genética y regeneración de *C. aurantifolia* mediante *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo el péptido antimicrobiano *attacin E*.

M E T O D O L O G Í A

Se usaron frutos maduros de limón mexicano obtenidos de huertas comerciales y del Banco de Germoplasma del Campo Experimental Tecomán del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Las semillas extraídas fueron lavadas con jabón líquido (0.02%), enjuagadas con abundante agua desionizada y después desinfectadas utilizando hipoclorito de sodio (Cloralex®) 20% (v/v) y Tween 20 0.02% (v/v) con agitación durante 20 min. En una campana de flujo laminar se retiró la solución desinfectante y se removió el exceso del mismo lavando tres veces más las semillas con agua desionizada estéril; posteriormente se retiró cuidadosamente la testa para facilitar su germinación y fueron sembradas en frascos tipo “Gerber” de 100 ml de capacidad con 25 mL de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con un pH de 5.7 y adicionado con vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968). Los frascos fueron mantenidos en oscuridad durante tres semanas. Posteriormente, los cultivos se transfirieron a condiciones de luz con un fotoperiodo de 12 h luz y 8 h oscuridad.

Se utilizaron células de bacteria recombinante de *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58C1 con plásmido binario pBIN-*AttE*, conteniendo en el ADN de transferencia (T-ADN): el gen reportero *GUS* (β -glucuronidasa), el gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina, así como el gen antimicrobiano *attacin E* (Borejsza *et al.*, 2010). Esta bacteria fue inoculada en 50 mL de medio líquido YEP (yeast extract 10 g/L, peptona 10 g/L, NaCl 5 g/L) al que se le adicionaron 50 mg/L de kanamicina y 25 mg/L de rifampicilina. El cultivo fue incubado a 28°C durante 48 h con una agitación constante de 215 rpm. Posteriormente, se centrifugó a -4 °C durante 10 min a 6,000 rpm y la bacteria fue resuspendida en medio líquido MS, adicionado con acetosiringona (AS) 100 μ M y los surfactantes Pluronic F-68 (PI) o Tween 20 (Tw) en concentraciones de 0.0% (control), 0.01%, 0.1% y 0.5%.

Bajo condiciones estériles, se cortaron los epicotilos en fragmentos de 1 cm de longitud, los cuales fueron inoculados con *A. tumefaciens* en los tratamientos descritos anteriormente e incubados durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los explantes fueron transferidos a un medio de co-cultivo MS adicionado con vitaminas B5 (10), 3 mg/L de BA, 10 µg/L de 2,4-D y 0.14 mM de K₂HPO₄, AS 100 µM y conteniendo los tratamientos descritos. En seguida, los explantes fueron co-cultivados en oscuridad durante 72 h.

Después del periodo de co-cultivo, se transfirieron los epicotilos a medio de selección adicionando con: carbenicilina 400 mg/L, cefotaxima 200 mg/L y kanamicina 50 mg/L.

Se cuantificaron los explantes que formaron brote así como el número de brotes por explante. Los datos de todos los tratamientos fueron transformados usando la raíz cuadrada de Y más 0.5.

Los brotes regenerados fueron sometidos a pruebas histoquímicas para la detección del gen reportero *GUS* (Jefferson *et al.*, 1987).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron dos experimentos en donde se adicionó al medio de cultivo, los surfactantes Pluronic F68 y Tween 20 para la regeneración de brotes de limón mexicano. Cada tratamiento constó de cinco frascos conteniendo 10 explantes cada uno.

El mayor porcentaje en inducción de brotes se obtuvo con el tratamiento suplementado con Pluronic F-68 en concentración 0.01%, sin obtener diferencias significativas con respecto al control sin surfactantes (Figura 1). Dicho resultado contrasta con resultados previos, donde el mejor resultado fue con la utilización de PI 0.5% el cual aumentó un 10% en comparación con el control en cultivo de *C. depressa* (Gill *et al.*, 2003). Otro estudio donde se ha utilizado Pluronic en cultivo de *Fragaria vesca* L., se obtuvo una mayor regeneración de brotes con la adición de PI 0.5% (Yildirim y Turker, 2014). De igual forma, en el presente estudio, al utilizar Tween 20 se observa un mayor porcentaje de explantes con brote usando la concentración de 0.01% a pesar de ser menor que con el Pluronic (Figura 1).

CUADRO 1.

Efecto de surfactantes en regeneración de brotes en explantes de limón mexicano a los 25 días después de establecido el experimento .

Tratamiento	Brotos por explante
Control	2±0.7
PI 0.01%	1±0.6
PI 0.1%	1±0.6
PI 0.5%	1±0.7
Tw 0.01%	2±0.4
Tw 0.1%	1±0.6
Tw 0.5%	0±0

PI= Pluronic F68; Tw= Tween 20. Cada valor representa la media de al menos seis repeticiones y 50 explantes por tratamiento ± el error estandar.

FIGURA 1.

Porcentaje de inducción de brotes bajo el efecto de diferentes concentraciones de surfactantes. 1= Control, 2= MS + Pl 0.01%, 3= MS + Pl 0.1%, 4= MS + Pl 0.5%, 5= MS + Tw 0.01%, 6= MS + Tw 0.1% y 7= MS + Tw 0.5%.

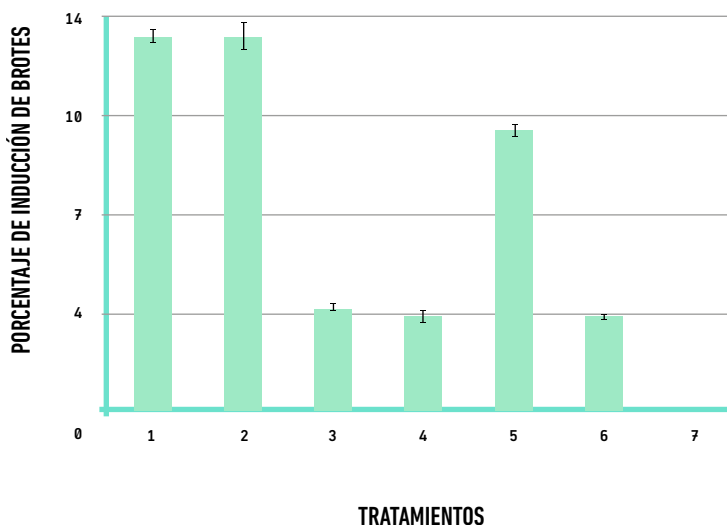
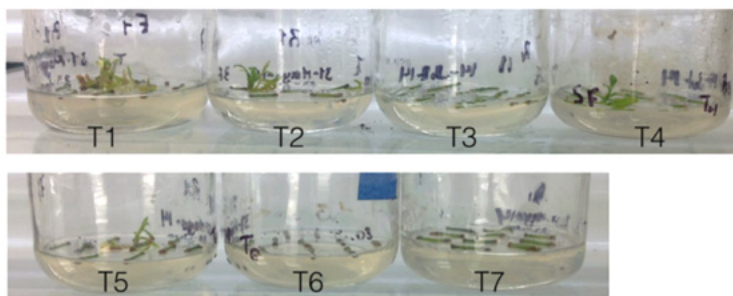


FIGURA 2.-

Inducción de brotes por tratamiento, los cuales son iguales a los descritos en la figura 1.



En cuanto a la producción de brotes por explante, se presentó una mayor inducción con el tratamiento de Tween 20 0.01% lo cual fue semejante al control (Figura 2 y Cuadro 1); sin embargo, en otros estudios se ha reportado que la mejor concentración es al 0.1% con un aumento del 10% respecto al control (Curtis y Mirkov, 2012).

CONCLUSIONES

Después del análisis de estos resultados preliminares, los tratamientos en los que se adicionó el Pluronic o el Tween a una concentración de 0.01% incrementó el porcentaje de inducción de brotes. El tratamiento de Tween 0.01% fue superior en número de brotes por explante.

AGRADECIMIENTOS

Al FORDECYT-CONACYT por el financiamiento del proyecto 139259.

R E F E R E N C I A S

- BOREJSZA, E.; Norelli, J.; Aldwinckle, H.; Malmoy, M. 2010. Stable expression and phenotypic impact of attacin E transgene in orchard grown apple trees over a 12 year period. *BCM Biotechnol.* 10, 41p.
- BOVÉ, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88, 7-37.
- CURTIS, I.; Mirkov, E. 2012. Influence of surfactants on growth and regeneration from mature internodal stem segments of sweet orange (*Citrus sinensis*) cv. Hamlin. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 108, 345-352.
- GAMBORG, O.L.; Miller, R.A.; Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res.* 50, 151-158.
- GILL, M. I. S.; Cancino, G. O.; Anthony, P.; Davey, M. R.; Power, J. B.; Lowe, K. C. 2003. Pluronic F-68 enhanced shoot regeneration in micropropagated Citrus rootstock and Passiflora species. *Acta Biotechnol.* 23, 349-358.
- JEFFERSON, A.; Kavanagh, A.; Bevan, W. 1987. Gus fusions: -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901-3907.
- KHANNA, H. K.; Daggard, G. E. 2003. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of wheat using a super binary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium. *Plant Cell Rep.* 21, 429-436.
- MURASHIGE, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- ROBLES-GONZÁLEZ, M.; Velázquez, J.; Manzanilla, M.; Orozco, M.; Medina, V; López, J.; Flores, R. 2013. Síntomas del huanglongbing (HLB) en árboles de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (christm) swingle] y su dispersión en el estado de Colima, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura.* 19, 15-31.
- SHAO-CONG, S.; Lindström, I.; Jong-Youn L.; Faye, I. 1991. Structure and expression of the attacin genes in *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* 196, 247-254.
- YILDIMIR, A.; Turker, A. 2014. Effects of regeneration enhancers on micropropagation of *Fragaria vesca* L. and phenolic content comparison of field-grown and in vitro-grown plant materials by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). *Scientia Horticulturae.* 169, 169-178.