
TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLÁTANO (*Musa* sp. CV. HARTÓN) MEDIANTE BIOBALÍSTICA APLICADA A TEJIDOS MERISTEMÁTICOS

Rosanna Valerio C. y Eva C. de García

RESUMEN

El plátano es uno de los cultivos más importantes en el mundo por constituir el alimento básico de millones de personas y una importante fuente de ingresos para los países productores. En los últimos años la producción mundial de plátano se ha visto afectada por numerosas enfermedades causadas por virus, bacterias, insectos y hongos, las cuales provocan grandes pérdidas en la producción y ameritan el uso de diversos tipos de fungicidas e insecticidas, perjudiciales para el ambiente y relativamente costosos. Múltiples instituciones han centrado sus investigaciones en el desarrollo de variedades de plátano y cambures resistentes mediante el uso de distintos métodos modernos de fitomejoramiento, tales como mutagénesis, variación somaclonal y

transformación genética. En este trabajo se utilizó el método de biobalística para transformar ápices caulinares in vitro de plantas de plátano (*Musa* cv. "Hartón") con micropartículas de tungsteno recubiertas con ADN del plásmido CAMBIA3201 portador de los genes *gus* y *bar*, en una máquina de bombardeo de baja presión de fabricación local. La transformación de los ápices se logró a una distancia tejido-cañón de 9,5cm, presión de He de 150psi y concentración de ADN de 2µg/disparo. Se obtuvo un total de 22 plantas transformadas con los genes *gus* y *bar*, cuya presencia fue demostrada por la prueba histoquímica de GUS, y su inserción al ADN mediante la amplificación (PCR) de fragmentos con iniciadores específicos.

GENETIC TRANSFORMATION OF PLANTAIN (*Musa* sp. CV. HARTÓN) BY A BIOBALLISTIC METHOD APPLIED TO MERISTEMATIC TISSUE

Rosanna Valerio C. and Eva C. de García

SUMMARY

Plantain is one of the most important crops in the world as it is the basic food staple of millions of people and an important source of income for producing countries. In the last years, world plantain production has been affected by numerous diseases generated by viruses, bacteria, fungi and insects, resulting in large production losses and requiring the use of fungicides and insecticides that cause important environmental damage and contribute to production cost increase. Multiple institutions focus their research on the development of resistant varieties of plantain and banana through different plant improvement methods such as mutagenesis, somatoclonal variation and genetic transformation.

In this research, the biobalistic method was used to transform in vitro caulinar buds of plantain (*Musa* cv. "Hartón") with tungsten microparticles covered by the DNA plasmid CAMBIA3201 carrying the *gus* and *bar* genes, at different distances and pressures, with a homemade low pressure bombardment machine. Apex transformation was accomplished at a tissue-cannon distance of 9.5cm, He pressure of 150psi and DNA concentration of 2µg/shot. A total of 22 transformed plants carrying the *gus* and *bar* genes were obtained as shown by the GUS histochemical test. PCR with specific initiators was used to verify their insertion in the genomic DNA.

Introducción

El plátano es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial al constituir el alimento básico de millones de personas en los países tropicales en vías de desarrollo y una importante fuente de ingresos para los mercados lo-

cales e internacionales (Frison y Sharrock, 2000) y representa uno de los rubros frutales de exportación más importantes para Venezuela.

Aún cuando el cultivo de plátanos en Venezuela se ha incrementado en los últimos años, enfermedades como la sigatoka negra, producida

por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, han ocasionado grandes pérdidas en la producción. Aunque la sigatoka se controla comúnmente a través del uso de fungicidas, ello resulta en un elevado costo de producción y provoca daños al ambiente, lo que ha hecho necesario el

desarrollo de variedades de plátano y cambures resistentes a través de la aplicación de distintos métodos tales como hibridación, mutagénesis, variación somaclonal y transformación genética. Mediante hibridación, por ejemplo, la Fundación Hondureña de Investigación

PALABRAS CLAVE / Transformación Genética / Biobalística / *Musa* / Gen *bar*. /

Recibido: 30/11/2006. Modificado: 12/02/2008. Aceptado: 20/02/2008.

Rosanna Valerio C. Licenciada en Biología, Universidad de Oriente (UDO), Venezuela. Doctor en Ciencias en Botánica, Universidad Central de

Venezuela (UCV). Profesora, UDO, Venezuela. Dirección: Laboratorio de Fisiología y Cultivo de Tejidos Vegetales, UDO, núcleo Sucre, Venezue-

la. e-mail: rosanna_valerio@hotmail.com

Eva C. de García. Licenciada en Biología, UCV, Venezuela. M.Sc., University of Wiscon-

sin, EEUU. Doctor en Ciencias en Botánica, UCV, Venezuela. Profesora, UCV, Venezuela. e-mail: egarcia@reacciun.ve

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO PLÁTANO (*Musa* SP. CV. HARTÓN) MEDIANTE BIOBALÍSTICA APLICADA A TECIDOS MERISTEMÁTICOS

Rosanna Valerio C. e Eva C.de García

RESUMO

O plátano (*banana-da-terra*) é um dos cultivos mais importantes no mundo por constituir o alimento básico de milhões de pessoas e uma importante fonte de ingressos para os países produtores. Nos últimos anos a produção mundial de plátano tem sido afetada por numerosas enfermidades causadas por vírus, bactérias, insetos e fungos, as quais provocam grandes perdas na produção e se faz necessário o uso de diversos tipos de fungicidas e inseticidas que são prejudiciais para o meio ambiente e relativamente custosos. Múltiplas instituições têm centrado suas investigações no desenvolvimento de variedades de plátano e banana resistentes mediante a utilização de distintos métodos modernos de fitomelhoramento, tais como metagêneses, variação somaclonal

e transformação genética. Neste trabalho se utilizou o método de biobalística para transformar ápices caulinares *in vitro* de plantas de plátano (*Musa* cv. "Hartón") com micro partículas de tungstênio recobertas com ADN do plasmídeo CAMBIA3201 portador dos genes *gus* e *bar*, em uma máquina de bombardeio de baixa pressão de fabricação local. A transformação dos ápices foi alcançada a uma distância tecido-canhão de 9,5cm, pressão de He em 150psi e concentração de ADN em 2µg/disparo. Obteve-se um total de 22 plantas transformadas com os genes *gus* e *bar*, cuja presença foi demonstrada pela prova histoquímica de GUS, e sua inserção ao ADN mediante a amplificação (PCR) de fragmentos com iniciadores específicos.

Agrícola (FHIA) ha obtenido variedades de plátano y cambures resistentes a través de cruzamientos clásicos entre genotipos diploides mejorados. Entre estas variedades se encuentran el FHIA-21 (AAAB), FHIA-01 (AAAB), FHIA-02 (genoma AAAB) y FHIA-03, bananos resistentes a la sigatoka negra y a otras enfermedades.

A través de variación somaclonal se han producido bananos resistentes a sigatoka (Trujillo, 1994; Trujillo y De García, 1996; Giménez *et al.*, 2001). Mediante mutagénesis física y química se han desarrollado bananos con crecimiento vigoroso y floración temprana (Novak *et al.*, 1990), y plantas con resistencia a la infección por *Fusarium* (Smith *et al.*, 1993).

Con relación a la transformación genética, la introducción efectiva de genes en el genoma de plantas de banana y plátano se ha obtenido mediante transformación directa con *Agrobacterium* (Arntzen y Lam, 1992; May *et al.*, 1995; Ganapathi *et al.*, 2001), electroporación (Andreason y Evans, 1988; Fromm *et al.*, 1985; De García y Villarreal, 2007) y bombardeo de microproyectiles (Sagi *et al.*, 1995; Becker *et al.*, 2000; Gómez Lim *et al.*, 2002; Finalet *et al.*, 2002; Sreeramanan y

Marziah, 2002a, b; Gómez-Kosky *et al.*, 2002).

Los métodos de transformación usados hasta ahora han brindado buenos resultados, pero la búsqueda de resistencia contra diversas enfermedades que atacan al género *Musa* apenas comienza. Aunque el desarrollo e introducción de los cultivares mejorados FHIA en diversos países ha contribuido a la mejora significativa de la situación, la obtención de cultivares comerciales mejorados de *Musa* sp. a través de hibridación resulta difícil e involucra mucho tiempo. Por ello las técnicas de propagación *in vitro* se han convertido en una alternativa promisoría. La regeneración de plantas a partir de células en suspensión o de embriones somáticos ha abierto el camino para la incorporación de determinados caracteres vía transformación genética.

El objetivo de esta investigación consistió en el establecimiento de un sistema eficiente de transformación genética de plantas de plátano (*Musa* sp. cv. "Hartón") mediante la aplicación de bombardeo de micropartículas (biobalística) a tejidos meristemáticos. Para ello se obtuvieron ápices caulinares *in vitro* de plátano cv. "Hartón" por micropropagación

de ápices meristemáticos caulinares y se multiplicaron por inmersión temporal. Los ápices fueron transformados con el vector portador del gen de interés, y se verificó la expresión transitoria y su inserción molecular del gen inyectado en las plantas transformadas.

Materiales y Métodos

Iniciación y multiplicación de ápices

El proceso de iniciación de ápices meristemáticos caulinares se realizó de acuerdo a la metodología de Hardy y García (1994). Este proceso involucra la obtención y esterilización del ápice a sembrar mediante una serie de lavados y reducciones sucesivas del cormo inicial en soluciones de cloro comercial a distintas concentraciones. Una vez obtenido el ápice, éste es lavado con agua destilada estéril en cámara de flujo laminar y reducido a un tamaño adecuado para su posterior siembra en medio sólido de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 2,5mg·l⁻¹ de BAP (MS-MAP). Transcurridos 30 días posteriores a la siembra, el ápice iniciado es cortado longitudinalmente en dos partes iguales con el fin de inducir la ruptura de la dominancia

apical y la consecuente activación y desarrollo de las yemas laterales.

Para la multiplicación de las yemas obtenidas durante el cultivo *in vitro* se emplearon dos procedimientos: 1) el procedimiento convencional consistente de la siembra del material vegetal en medio MS-BAP sólido (Hardy y García, 1994) y 2) el uso del sistema de inmersión temporal (SIT) consistente de varios recipientes de inmersión temporal automatizados (RITA), dentro de los cuales se colocó 250ml de medio MS-BAP líquido y el material vegetal a proliferar, en este caso pequeños brotes del cultivar de plátano en estudio, que fueron inmersos por 30min cada 6h. Tanto el RITA como el medio de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 20min a 121°C y 15lb de presión. El sistema fue mantenido a una temperatura de 24 ±1°C en luz continua.

Material blanco y medios de cultivo

El tejido vegetal blanco del bombardeo consistió de grupos de yemas (multiyemas) extraídas directamente del medio de multiplicación MS-BAP, constituidos por 3 a 8 yemas cada uno (Figura 1) que fueron colocados sobre



Figura 1. Aislamiento de multiyemas de *Musa* sp. cv Hartón a partir de grupos grandes de yemas cultivadas en medio MS-BAP (Hardy y García, 1994). a: Recipiente con yemas sobre medio MS-BAP, b: grupo de yemas aisladas en placa de Petri con medio MS-BAP, c: dos yemas aisladas sobre medio MS-BAP en placa de Petri.

medio MS-BAP en placas de Petri e incubados en oscuridad por 1-2 días (tratamiento pre-bombardeo), antes de ser disparados sobre esas mismas placas. Posterior al bombardeo, las multiyemas fueron transferidas a placas de Petri con medio fresco hasta la aparición de brotes, los cuales se transfirieron entonces a medio MS sin hormonas.

Plásmido vector

Se utilizó el plásmido CAMBIA3201 (Figura 2), desarrollado por el laboratorio de Biología Molecular del *Medical Research Council*, Inglaterra, y donado al Centro para la Aplicación de la Biología Molecular en la Agricultura Internacional (CAMBIA, por sus siglas en inglés) de Canberra, Australia. Este plásmido multicopia es un vector de 11459pb, provisto de un origen de la replicación para su replicación autónoma y múltiple en la célula anfitriona, del gen *cat* de resistencia al cloranfenicol para selección en bacteria,

del gen *gus* como reportero para la identificación de las células transformadas, del gen *bar* como marcador de selección que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio (BASTA®) y de la secuencia promotora constitutiva CAMV35S, la cual permite la expresión constitutiva de los genes *gus* y *bar* en la célula anfitriona.

Extracción del ADN plasmídico

En la extracción del ADN plasmídico utilizado para el bombardeo de los ápices se partió de 1ml de cultivo de *Escherichia coli* contenedoras del plásmido CAMBIA3201 (500µl de cultivo de bacterias + 500µl de glicerol estéril) vertido en 100ml de medio LB (10g bactotripton, 5g extracto de levadura y 10g NaCl) con 250µl de cloranfenicol (10mg·ml⁻¹). El medio LB con bacterias se incubó toda la noche a 37°C con agi-

tación constante. La extracción del ADN se realizó según dos protocolos, el *Wizard Plus Midipreps DNA Purification System* (1999) de Promega y el protocolo de Sambrook *et al.* (1989). El *pellet* de ADN obtenido al final de cada proceso se resuspendió en agua estéril y se almacenó a -20°C hasta el momento de la evaluación de su integridad y cuantificación. Luego de realizadas las diluciones del ADN plasmídico requeridas para el bombardeo, éste se almacenó en tubos Eppendorf a -40°C.

Verificación de la presencia de los genes *gus* y *bar*

La amplificación de fragmentos de ADN de los genes *gus* y *bar* presentes en el ADN del plásmido CAMBIA3201 se hizo mediante PCRs específicas utilizando iniciadores (*primers*) sintetizados químicamente y homólogos a las secuencias de dichos genes. Las secuencias específicas empleadas para el gen *gus* permiten la amplificación de un fragmento de 1200pb, mientras que las secuencias para el gen *bar* amplifican un fragmento de 372pb. Dichas secuencias son:

Gus1: 5'-GGTGGGAAGCGCGTTAC-3' (Posición 307-324 del pCAMBIA 3201).

Gus2: 5'-GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA-3' (Posición 1485-1506 del pCAMBIA 3201).

Bar1: 5'-CCAGAAACCCACGTGATGCC-3' (Posición 9118-9137 del pCAMBIA 3201).

Bar2: 5'-CAGGAACCGGCA-GGAGTGGGA-3' (Posición 9471-9489 del pCAMBIA 3201).

La reacción de amplificación (PCR) se realizó en un volumen final de 25µl y los productos fueron visualizados en gel de agarosa 1,5% en buffer TAE 1X a 50V. Las condiciones de amplificación usadas fueron para el gen *gus* 95°C (5min), 40 ciclos de 94°C (30seg), 63°C (30seg) y 72°C (1min) y, finalmente, 72°C (10min). Para el *bar* 95°C (5min), 40 ciclos de 94°C (30seg), 60°C (30seg) y 72°C (1min) y, finalmente, 72°C (10min).

Bombardeo de los ápices

Máquina de biobalística. Se empleó una máquina de baja presión fabricada localmente según diseño de *Finer et al.* (1992). La misma puede alcanzar un vacío máximo de 211b de Hg y presiones de He entre 0 y 400psi. Está provista además de controles para seleccionar el tiempo de vacío e inyección del disparo, así como la carga y descarga del vacío.

Parámetros de bombardeo. Se utilizaron micropartículas de tungsteno de 1,1µm de diámetro esterilizadas con etanol 70-100% y posteriormente incubadas con ADN, CaCl₂ estéril 2,5M y espermidina 0,1M (*Klein et al.*, 1988). La distancia de disparo fue de 9,5cm, a una presión de 150psi. La concentración de ADN utilizada fue de 2,0µg/disparo (modificado de *Klein et al.*, 1988). Se empleó un vacío de 211b de Hg y un tiempo de inyección de 0,1seg. Para evitar que los explantes fuesen expulsados al recibir la descarga de microproyectiles, sobre el tejido blanco se colocaron mallas metálicas con poros de 1mm.

En las placas de Petri con medio MS-BAP sólido (8g·l⁻¹ de agar) se dispusieron 12 yemas por placa, distribuidas en tres yemas por cuadrante, colocadas en el sitio proba-

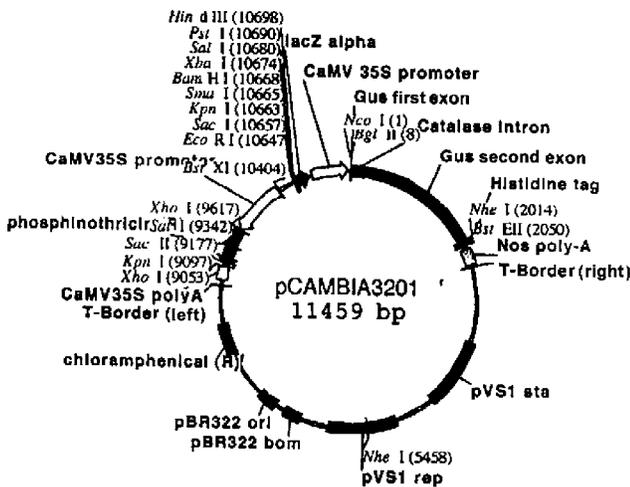


Figura 2. Mapa del vector pCAMBIA3201

ble de caída de las micro-partículas disparadas. Antes y después del proceso de bombardeo las yemas fueron mantenidas por dos días en oscuridad. Posterior al disparo, los explantes fueron transferidos a placas de Petri con medio MS-BAP fresco, y luego de 14-21 días se registró el número total de ápices supervivientes y se tomaron las muestras foliares y radicales para la prueba histoquímica de GUS. Los pequeños brotes obtenidos fueron transferidos a medio MS sin hormonas de crecimiento para obtener las vitroplantas, sin utilizar agente de selección (BASTA) en el medio de cultivo.

Verificación de la transformación genética

Selección y regeneración de las plantas transformadas. No se realizó la prueba de selección con el herbicida BASTA debido a dos razones. 1) El alto nivel de quimerismo mostrado por las plantas bombardeadas, revelado por la evaluación histoquímica de la actividad de la β -glucuronidasa realizada 15-21 días posterior al bombardeo, lo que aumentaba la probabilidad de muerte de los ápices disparados en el medio de selección, por la ausencia de transformación en muchos sectores de tejido regenerado; en efecto, el tejido foliar de muchas de las plantas tratadas con X-Gluc mostró solo algunas células epidérmicas (estomas) con coloración azul de muy baja intensidad. 2) El bajo nivel de supervivencia de los ápices debido al daño físico ocasionado por las micro-partículas disparadas, lo que aumentaba la probabilidad de muerte de los ápices y por ende el riesgo de eliminar los posibles transgénicos obtenidos mediante el proceso biobalístico.

La regeneración de los ápices caulinares bombardeados se logró en medio de multiplicación de brotes (con $2,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP) ~10 días después de la fecha del disparo. Una vez ocurrida la apari-

ción de brotes, éstos fueron transferidos a medio MS sin hormonas para la obtención de las plantas.

Evaluación histoquímica de la actividad β -glucuronidasa. Para evaluar la expresión transitoria del gen *gus* en el tejido recién bombardeado, se empleó el sistema reportero GUS (Jefferson *et al.*, 1987). La prueba se realizó 15-21 días después del bombardeo, una vez ocurrida la aparición de hojas y raíces en los explantes bombardeados. Se incubó segmentos de hoja (1cm^2) y raíz (2cm de largo) en solución del sustrato X-Gluc (5 bromo-4 cloro-3 indolil β -D-glucuronido) por 48h a 37°C . A continuación se extrajo la solución de X-Gluc y se colocó el tejido en etanol 70% por 24h para extraer la clorofila y lograr una mejor visualización del color azul. Finalmente se hicieron desprendimientos epidérmicos y cortes transversales y longitudinales que fueron fotografiados en fotomicroscopio.

Verificación molecular de la transformación genética. El ADN, extraído mediante protocolo de Doyle y Doyle (1990) modificado para banana por Giménez (1997), fue purificado de acuerdo al protocolo de Weising y Kahl (1997) para la remoción de polisacáridos, ARN, polifenoles y otras sustancias contaminantes. Las condiciones de amplificación de fragmentos de ADN fueron las expuestas arriba. La integridad del ADN se observó en geles de agarosa al 0,6% en buffer TAE 1X. Las muestras de ADN fueron cuantificadas en un espectrofotómetro LKB-Ultrospec III.

Resultados y Discusión

Iniciación y multiplicación de ápices

A partir de un total de 50 ápices meristemáticos caulinares iniciados, de los cuales sobrevivieron nueve 9 (18%), se obtuvo un número de brotes suficientes y útiles para la regeneración de las vitro-

TABLA I
PRODUCCIÓN DE BROTES DE HARTÓN EN RECIPIENTES DE INMERSIÓN TEMPORAL AUTOMATIZADOS CONTENIENDO MEDIO MS-BAP LÍQUIDO, A LOS TRES MESES Y MEDIO DE CULTIVO

NBI	NEB	NBF	IFB
6	6	90	15
6	6	90	14
8	6	102	9,56
12	10	116	8,05
6	6	40	6,66
16	12	34	1,59
Total: 54	46	466	9,14

NBI: número de brotes iniciales, NEB: número de explantes con brotes, NBF: número de brotes formados, IFB: índice de formación de brotes, el cual se calculó como $\text{IFB} = \text{NBF} \times \text{NEB} / (\text{explantes cultivados})^2$, según Kikuta y Okazawa (1984), citado por Martel y García (1992).

TABLA II
CARACTERÍSTICAS DE LAS EXTRACCIONES DE ADN PLASMÍDICO

Extracción	ADN ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	Disparos posibles ($2\mu\text{g}/\text{disparo}$)
1	0,8	400
2	1,0	500
3	17,83	8915

plantas requeridas para el aislamiento de las multiyemas blanco del bombardeo. El alto porcentaje de mortalidad de los ápices *ex vitro* iniciados se debió a contaminación por bacterias y/o nemátodos presente en el material vegetal proveniente del campo utilizado para la iniciación.

En promedio, luego de tres y medio meses de cultivo en RITAs se produjeron 9,14 veces el número de brotes colocados inicialmente en el recipiente (Tabla I). Tal índice de formación de brotes (IFB) es semejante a los coeficientes de multiplicación (7,2-9,4) reportados por Castro *et al.* (2002) para explantes de banana en biorreactores de inmersión temporal, y es menor al obtenido por Colmenares y Giménez (2003) para yemas de plátano Hartón cultivadas en RITAs con medio MS suplementado con $5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP. En este último caso, la mayor multiplicación en menos tiempo (1 mes) probablemente se debió a la mayor concentración de BAP empleada.

El uso de RITAs en los procesos de micropropaga-

ción ha sido recomendado por algunos autores como una opción para reducir costos de manipulación y espacio requeridos, y aumentar los volúmenes de producción. Desde que Teisson *et al.* (1996) desarrollaron un equipo sencillo de inmersión temporal, éste ha sido empleado con frecuencia para el cultivo de microesquejes y embriogénesis somática en especies de interés hortícola, con altas tasas de multiplicación y bajos costos de producción (Castro y González, 2002).

*Verificación de la presencia de los genes *gus* y *bar* en el ADN plasmídico*

Las secuencias diseñadas para la verificación de la presencia de los genes *gus* y *bar* en el ADN del pCAM-BIA3201 permitieron la amplificación de los fragmentos de 1200pb y 372pb esperados.

Bombardeo de multiyemas

De un total de 1252 yemas bombardeadas a 9,5cm y 150psi se obtuvieron 268

(21,40%) brotes post-bombardeo. Esta tasa de supervivencia es mayor a las obtenidas por Maneharan y Dahleen. (2002) y Cho *et al.* (2004) para callos embriogénicos de trigo (12,81%), cebada (3,25%) y tejidos verdes regenerativos de arroz (6,5%), respectivamente, pero menor que los reportados por Christou *et al.* (1991), Dayal *et al.* (2003) y Snezana *et al.* (2005) para embriones cigóticos de arroz, hojas de quinchoncho y de remolacha, respectivamente. Los resultados son comparados con especies diferentes a *Musa* sp. dado que en la mayoría de los estudios acerca de la transformación genética de *Musa* sp., así como de otras especies tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, se utilizan suspensiones celulares como tejido blanco, en lugar de tejidos de naturaleza multicelular, como en el presente caso. Solo Sreeramanan y Marziah (2002a, b) usaron multiyemas de los cultivares de *Musa* "Pisang rastali" y "Mutiará" para el bombardeo con microproyectiles, pero no reportan el nivel de supervivencia.

Por otra parte, los valores de supervivencia citados fueron calculados en base al número de explantes sobrevivientes en medio de selección, mientras que la supervivencia de los ápices disparados en el presente estudio se logró sobre medio de cultivo sin el agente de selección. En base a esto, la obtención de un valor de supervivencia alto en comparación con los citados era muy probable. No obstante, en general, la supervivencia obtenida para tejidos expuestos al bombardeo con microproyectiles es baja.

Actividad β -glucuronidasa (GUS)

El total de plantas obtenidas (268) a partir de los 1252 ápices bombardeados a 150psi y 9,5cm de distancia, fue tomado para la prueba de la β -glucuronidasa (GUS). En



Figura 3. Estomas abaxiales en hojas de plantas *in vitro* del cultivar Hartón regeneradas a partir de ápices bombardeados. Se observan diferentes intensidades de azul (gris) como consecuencia de la tinción suministrada por la prueba histoquímica de GUS (40 \times).

muestras foliares y radicales de las plantas regeneradas a partir de los ápices bombardeados se observó que un 22,01% de éstas exhibió sectores epidérmicos foliares GUS positivos con estomas teñidos de distintas intensidades de azul (Figura 3). La presencia de sectores con distintas intensidades de azul en hojas y raíces de plantas transformadas fue observada por Sreeramanan y Marziah (2002a, b). La condición de quimerismo en las plantas transformadas mediante biobalística a partir de explantes multicelulares no es un hecho reciente (Christou *et al.*, 1989; Fitch *et al.*, 1990; Sautter, 1993); no obstante, el problema puede ser minimizado por aislamiento y subcultivo continuo de los sectores efectivamente transformados (Birch y Franks, 1991; Sautter, 1993; May *et al.*, 1995).

El número de estomas abaxiales azules fue de 1-8/cm² con promedio de 2/cm², de los 9000/cm² presentes en la hoja del cultivar Hartón. En algunas plantas se observó además coloración GUS positiva en el floema y en el borde de hojas (Figura 4).

El porcentaje de expresión transitoria obtenido (22,01%) es mayor que los reportados para algunas especies dicotiledóneas y monocotiledóneas transformadas a partir de tejidos blancos multicelulares, tales como los obtenidos por Christou *et al.* (1991) para plantas de arroz y Snezana *et al.* (2005) para remolacha, de 3,75 y 2,4%, respectivamente.

La expresión transitoria del gen reportero asociado

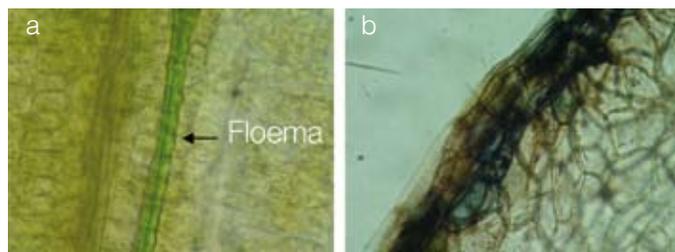


Figura 4. a: Tejido vascular GUS positivo en hoja de Hartón regenerada a partir de ápice bombardeado a 150psi (20 \times). b: Borde de hoja sometida a prueba de GUS regenerada a partir de ápice bombardeado (40 \times).

al gen de interés dentro de la célula blanco depende, entre otros, de factores tales como composición química de las micropartículas, concentración del ADN, grado de daño sufrido por el tejido, estado fisiológico del tejido, tamaño de la construcción genética y promotor empleado (Birch y Franks, 1991). Las micropartículas de oro son ampliamente utilizadas y recomendadas por su inercia química, ausencia de reactividad con el ADN y otros componentes de las mezclas de precipitación, textura lisa y baja toxicidad para las células vegetales. Las micropartículas de tungsteno, sin embargo, aún cuando ya no son de uso tan frecuente, han sido empleadas en estudios de transformación genética con resultados satisfactorios. Es posible que el alto grado de oxidación mostrado por los ápices bombardeados del cultivar Hartón en estudio sea debido al uso de micropartículas de tungsteno en lugar de oro, pero también pudo deberse a la presencia y liberación elevada de fenoles en los explantes bombardeados. El uso de bajas concentraciones de ADN asociadas a bajas concen-

traciones de micropartículas reduce la formación de agregados ADN-micropartículas difíciles de separar, lo cual no facilita la liberación del ADN de la partícula una vez dentro de la célula.

Uno de los factores más influyentes en el nivel de expresión transitoria de las células es el grado de daño sufrido por el tejido durante el bombardeo. Según Klein *et al.* (1988) en el área central del tejido se produce una alta frecuencia de expresión transitoria que es afectada por el disparo, por lo que ha sido referida como "zona de muerte". El daño puede ser minimizado aumentando la distancia entre el tejido y el cañón de disparo, o colocando una malla de protección sobre el tejido. La malla utilizada, además de bloquear algunos de los microproyectiles disparados y reducir el daño tisular, evitó que el tejido bombardeado fuera propeldido con violencia durante el disparo.

Cuando se optimiza un sistema de bombardeo de microproyectiles, es necesario escoger una construcción genética que se exprese en altas tasas en el tejido modificado. Se debe seleccio-

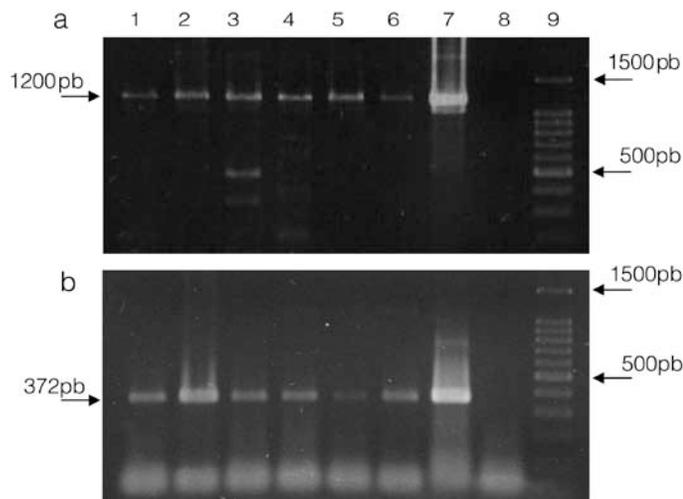


Figura 5. Amplificación del fragmento de 1200pb del gen *gus* (a) y amplificación del fragmento de 372 pb del gen *bar* (b) en seis plantas positivas al ensayo de la β -glucuronidasa. Carriles 1-6: ADN de plantas bombardeadas 03, 05, 24, 36, 50 y 53; carril 07: ADN del pCAMBIA3201 (Control positivo); carril 08: ADN de planta del cultivar Hartón sin bombardear; carril 09: marcador de peso molecular, escalera de 100 pb.

nar un promotor constitutivo fuerte que asegure la expresión del transgen en el tejido blanco (Schenk *et al.*, 1999). Ello depende de la especie vegetal utilizada, de forma tal que promotores útiles en el manejo de la expresión de un transgen en una especie podrían no ser efectivos en la regulación de la expresión en otras. Por otra parte, el uso de promotores iguales en la regulación de genes distintos dentro del mismo vector puede inducir silenciamiento genético (Flavell, 1994; Matzke *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1996). Schenk *et al.* (1999) estudiaron la actividad del promotor específico Sc del virus baciliforme de la caña de azúcar, en comparación con la actividad del promotor CaMV35S, en la regulación de los niveles de expresión del gen reportero *gus* en plantas de banano (*Musa sp.* cv. Williams), encontrando que ambos promotores son efectivos en el manejo de la expresión del gen *gus* en ese cultivar. No obstante, Sagi *et al.* (1995) encontraron que el promotor Ubi (ubiquitina del maíz) es más efectivo en el manejo de la expresión génica del gen *gus* en plantas de *Musa sp.* cv. Williams y el plátano *Musa sp.* cv.

Three Hand Planty, en comparación con los promotores CaMV35S y Emu. El promotor CaMV35S utilizado en el presente estudio permitió la expresión efectiva del gen *gus* en el cultivar de plátano; siendo comparable el porcentaje de plantas con células GUS positivas al obtenido en otros estudios de transgénesis vegetal.

Hay indicios de que plásmidos grandes (>10000pb) pueden estar sujetos a mayor fragmentación durante el bombardeo (Mendel *et al.*, 1989; Fitch *et al.*, 1990). El CAMBIA3201 utilizado es un vector de 11459pb y su tamaño podría constituir un factor negativo en su transferencia efectiva al genoma de las células; no obstante, su introducción íntegra en éstas se produjo exitosamente, como se evidenció por la presencia de ambos genes (*gus* y *bar*) en todas las plantas PCR positivas obtenidas.

Es posible que el nivel de expresión transitoria (22,01%) obtenido haya sido subestimado debido a la falta de sensibilidad de la prueba de GUS para revelar células con bajo nivel de expresión del gen *gus*. Birch y Franks (1991) han referido que el ensayo

histoquímico del GUS es relativamente insensible y las células que expresan poco el gen *gus* pueden no ser detectadas. Puede ocurrir que el sustrato para la β -glucuronidasa (X-Gluc) presenta dificultad para penetrar el tejido bombardeado por el grosor de la pared celular, lo que reduce la posibilidad de visualización del tejido transformado.

No se descarta que el nivel de expresión transitoria obtenido haya sido subestimado por la manera como fueron manipuladas las plantas (presuntas transgénicas) para la evaluación de la presencia de expresión transitoria GUS positiva. En efecto, para la prueba solo se tomó una pequeña muestra (un fragmento de hoja) del total de la planta regenerada, debido a 1) el carácter relativamente rápido (<48h) con que se recomienda realizar la prueba, antes que ocurra degradación por acción de las nucleasas del ADN introducido; 2) la disponibilidad limitada del sustrato X-Gluc con el que fue realizada la prueba; y 3) la naturaleza destructiva del procedimiento, que obliga la utilización racional del material para contar con suficiente cantidad para las pruebas moleculares.

Presencia de los genes *gus* y *bar* en el genoma de plantas con expresión transitoria GUS positiva

Un total de 22 plantas mostraron integración de los genes *gus* y *bar* en el genoma de sus células foliares, equivalente al 37,28% de las 59 plantas con expresión transitoria GUS positiva y al 8,21% de las 268 plantas bombardeadas sobrevivientes. La amplificación de fragmentos de estos dos genes para algunas de las plantas transgénicas obtenidas se muestra en la Figura 5.

Es común obtener una alta frecuencia de expresión transitoria asociada a un porcentaje muy bajo de células que integra y expresa establemen-

te el gen introducido (Birch y Franks, 1991). Algunos autores han referido que una de las causas del bajo nivel de integración de los transformantes obtenidos mediante biobalística es la ausencia de una asociación efectiva ADN-proteínas (como ocurre con el ADN-T transferido por *Agrobacterium*) que contribuya a la protección del ADN bombardeado, una vez dentro de la célula hospedera, de la acción degradativa de las nucleasas; por ello, solo parte del ADN llega al núcleo donde se produce, con baja eficiencia, la integración al azar en el ADN cromosómico. En este estudio se obtuvo un nivel de expresión transitoria de 22,01% asociado a un nivel de integración genética de 8,21%, el cual es alto en comparación con otros reportados (McCabe y Christou, 1993; Sautter, 1993) para dicotiledóneas y monocotiledóneas transformadas mediante biobalística.

REFERENCIAS

- Andreason G, Evans G (1988) Introduction and expression of DNA molecules in eukariotic cells by electroporation. *Bio/Techn.* 6: 650-660.
- Arntzen C, Lam D (1992) Biotechnology for improvement of banana and plantains. En *Advanced Technology Assessment System. Issue 9, Biotechnology and Development*. New York: UN Publication E. 92. 11 A. 15. pp. 313-320.
- Becker D, Dugdale B, Smith M, Harding R, Dale J (2000) Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa spp.* AAA group) cv. "Grand Nain" via microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.* 19: 229-234.
- Birch R, Franks T (1991) Development and Optimization of Microprojectile System for Plant Genetic Transformation. *Aust. J. Plant. Physiol.* 18: 453-464.
- Castro D, González J (2002) Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el Sistema de Inmersión Temporal. *Agricultura Técnica (Chile)* 62: 68-78.
- Castro D, Díaz J, Montoya N (2002) Propagación clonal de bananos en Biorreactores de

- Inmersión Temporal. *Mem. XV Reunión. Int. ACORBAT*. Colombia. pp. 44-48.
- Cho M, Yano H, Okamoto D, Kim H, Jung H, Newcomb K, Le V, Yoo H, Langham R, Buchanan B, Lemaux P (2004) Stable transformation of rice (*Oryza sativa* L.) via microprojectile bombardment of highly regenerative green tissues derived from mature seed. *Plant Cell Rep.* 22: 483-489.
- Christou P, Swain W, Yang N, McCale D (1989) Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7500-7504.
- Christou P, Ford T, Kofron M (1991) Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technol.* 9: 957-962.
- Colmenares M, Giménez C (2003) Multiplicación *in vitro* de *Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 20: 468-477.
- Dayal S, Lavanya M, Deví P, Sharma K (2003) An efficient protocol for shoot regeneration and genetic transformation of pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Mill. sp.] using leaf explants. *Plant Cell Rep.* 21: 1072-1079.
- De García E, Villarroel C (2007) Transgenic plantain (cv. Harton) plants resistant to herbicide Basta obtained by electroporation. *Acta Horticult.* 738: 509-514.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of DNA from small amounts of plants tissues. *BRL Focus* 12: 13-15.
- Finalet J, Remy S, Francois I, López J, Sagi L, Swennen R (2002) *Agrobacterium* transformation of Cuban plantain cultivars for fungal disease resistance. *Mem. XV Reunión. Int. ACORBAT*. Colombia. pp. 28-29.
- Finer J, Vain P, Jones M, McMullen M (1992) Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep.* 11: 232-238.
- Fitch M, Manshardt R, Gonsalves D, Slightom J, Sanford J (1990) Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.* 9: 189-194.
- Flavell R (1994) Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3490-3496.
- Frison EA, Sharrock SL (2000) Biodiversidad y producción sostenible del banano. www.Bananafair.de/publ/report/spa/5.htm.
- Fromm M, Taylor L, Walbot V (1985) Expression of genes transferred into monocot and dicot cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 82: 5824-5828.
- Ganapathi T, Higgs N, Balin-Curti P, Van Eck J, May G (2001) *Agrobacterium* mediated transformation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar Rasthali (AAB). *Plant Cell Rep.* 20: 157-162.
- Giménez C (1997) *Características genéticas y moleculares del variante somaclonal de banano C1ENBTA-03 asociadas al mecanismo de resistencia a la Sigatoka Amarilla y a su estabilidad genética*. Tesis. Universidad Central de Venezuela. 135 pp.
- Giménez C, De García E, De Xena N, Blanca I (2001) Somaclonal variation in Banana: Cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant C1ENBTA-03. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 37: 217-222
- Gómez-Kosky R, Daniels D, Chong Pérez B, Más L, Bermúdez I, Reyes M, Pereira C (2002) Somatic embryogenesis and genetic transformation via particle bombardment in the hybrid "FHIA-21" (*Musa* sp. AAAB). *Mem. XV Reunión. Int. ACORBAT*. Colombia. p. 31.
- Gómez Lim M, González J, Ortiz J, Aguilar M, Sandoval J (2002) Generación de banano (C.V. Grand Nain) transgénico conteniendo genes antifúngicos para conferir resistencia contra Sigatoka negra. *Mem. XV Reunión. Int. ACORBAT*. Colombia. pp. 114-117.
- Hardy I, De García E (1994) Micropropagación de bananos (*Musa* AAA) del subgrupo Cavendish. *Phyton* 55: 31-41.
- Jefferson R, Kavanagh T, Bevan M (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- Klein T, Gradziel T, Fromm M, Sanford J (1988) Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high velocity microprojectiles. *Bio/Technol.* 6: 559-63.
- Manecharan M, Dahleen L (2002) Genetic transformation of the commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar Conlon by particle bombardment of callus. *Plant Cell Rep.* 21: 76-80.
- Martel A, De García E (1992) Formación *in vitro* de brotes adventicios en discos de tubérculo de papa (*Solanum tuberosum* L. cv. Sebago). *Phyton* 53: 57-64.
- Matzke A, Neuhuber F, Park Y, Ambros P, Matzke M (1994) Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. *Mol. Gen. Genet* 244: 219-229.
- May G, Rownak A, Mason H, Wiecko A, Novak F, Arntzen C (1995) Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium* mediated transformation. *Bio/Technol.* 13: 486-492.
- McCabe D, Christou P (1993) Direct DNA transfer using electric discharge particle acceleration (Accell™ technology). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 33: 227-236.
- Mendel R, Müller B, Schulze J, Kolesnikov V, Zelenin A (1989) Delivery of foreign genes to intact barley cells by high-velocity microprojectiles. *Theor. Appl. Genet* 78: 31-34.
- Murashige T, Skoog T (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Novak F, Afza R, van Duren M, Omer M (1990) Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro* cultured shoot tips of banana and plantain (*Musa* cvs). *Trop. Agric.* 67: 21-28.
- Park Y, Papp I, Moscone E, Iglesias V, Vaucheret H, Matzke A, Matzke M (1996) Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J.* 9: 183-194.
- Promega Corp (1999) "Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System", Technical Bulletin No. 225.
- Sagi L, Panis B, Remy S, Schoofs H, De Smet K, Swennen R, Cammue B (1995) Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp) via particle bombardment. *Bio/Technol.* 13: 481-485.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2a ed. CSHL Press. Cold Spring Hbr., NY, EEUU. 1659 pp.
- Sautter C (1993) Development of a microtargeting device for particle bombardment of plant meristem. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 33: 251-257.
- Schenk P, Sagi L, Remans T, Dietzgen R, Bernard M, Graham M, Manners J (1999) A promoter from sugarcane bacilliform banaviruses drives transgene expression in banana and other monocot and dicot plants. *Plant Mol. Biol.* 39: 1221-1230.
- Smith M, Hamil S, Langdon P, Pegg K (1993) Mutation breeding program produces a plant with potential *Fusarium* wilt (Race 4) resistance Cavendish variety. *Mut. Breed. Newsletter.* 40: 4-5.
- Snezana D, Ivic-Haynes J, Smigorki A (2005) Biobalistic transformation of highly regenerative sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Cell Rep.* 23: 699-704.
- Sreeramman S, Marziah M (2002a) Physical and biological parameters affecting transient and stable GUS gene expression in "Pisang rastali" (*Musa* sp. AAB) using the biobalistic gun. *Mem. XV Reunión. Int. ACORBAT*. Colombia. pp 30-31.
- Sreeramman S, Marziah M (2002b) Particle bombardment-mediated co-transformation of chitinase and β -1,3-glucanase for synergistic activity to enhance fungal resistance in "Pisang rastali" and "Mutiará". *Mem. XV Reunión. Int. ACORBAT*. Colombia. pp. 30-31.
- Teisson C, Alvarado D, Berthouly B, Cote F, Escalant J, Etienne H, Lartaud M (1996) Simple apparatus to perform plant tissue culture immersion. *Acta Hort.* 440: 521-526.
- Trujillo I (1994) *Aplicación de Técnicas Biotecnológicas en el Mejoramiento del Género Musa*. Tesis. Universidad Central de Venezuela. 261 pp.
- Trujillo I, De García E (1996) Aplicación de métodos de presión de selección en la obtención de variantes de banano resistentes a la Sigatoka amarilla. *Phyton* 59: 111-121.
- Weising K, Kahl G (1997) Hybridization-based microsatellite fingerprinting of plants and fungi. In *DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews*. Wiley & Sons. NY, EEUU. pp. 27-54.