

## **Estandarización del protocolo de transformación genética de células embriogénicas de banano de la variedad ‘Williams’ (AAA) mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

L.E. Sánchez, \*E. G. Santos.

Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE)

Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)

Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral,

Apartado 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador.

Autor: edu\_st@hotmail.com; lesanche@espol.edu.ec

\*efren.santos@gmail.com, \*gsantos@espol.edu.ec

### **Resumen**

*Un programa de mejoramiento convencional de banano es muy dificultoso debido a los altos niveles de esterilidad, necesidad de cruzamientos interploidales, baja proporción de germinación de semillas y a un largo ciclo de cultivo. La ingeniería genética es una alternativa al mejoramiento convencional y ofrece a los fitomejoradores la oportunidad de superar las limitaciones impuestas por la esterilidad en la mayoría de los cultivares de banano. El objetivo principal de este estudio es desarrollar y estandarizar metodologías para la integración de genes en el genoma del banano en el Ecuador. La transferencia de genes fue realizada a través del co-cultivo de suspensiones de células embriogénicas del cultivar de banano ‘Williams’ con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Los plásmidos usados para la transformación fueron el pCAMBIA1301 (promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor expresando el gen reportero uidA<sup>INT</sup>), el pESKUL1 y el pESKUL7 los cuales contienen distintos promotores de banano que expresan al gen reportero uidA<sup>INT</sup>. El ensayo de expresión temporal en células de banano transformadas genéticamente mostró que desde 12, 26 y hasta 244 puntos azules se encontraron en las células transformadas con los plásmidos pESKUL1, pESKUL7, y el pCAMBIA1301 respectivamente. La concentración óptima del antibiótico higromicina fue probada para la selección de colonias de células transgénicas. Un protocolo estandarizado para la transformación genética de banano está siendo desarrollado, formando las bases biotecnológicas para la generación de plantas de banano resistentes a enfermedades por primera vez en el Ecuador.*

**Palabras Claves:** *Mejoramiento genético, uidA<sup>INT</sup>, transgénesis, cisgénesis, suspensión de células embriogénicas, plantas modificadas genéticamente.*

### **Abstract**

*A conventional breeding strategy in banana is difficult due to the high level of sterility, need of interploidy crosses, poor seed germination rate and long life cycle. Genetic engineering is an alternative to conventional breeding and offers plant breeders an opportunity to overcome the constraints imposed by sterility of most banana cultivars. The principal objective of this study is the development and standardization of methodologies for the integration of genes into the banana genome in Ecuador. The transfer of genes was performed through the co-cultivation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar ‘Williams’ with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105. The plasmids used for transformation were the pCAMBIA1301 (35S promoter driving the uidA<sup>INT</sup> reporter gene) and the pESKUL1 and pESKUL7 which both contain different banana promoters driving the uidA<sup>INT</sup> reporter gene. Transient gene expression assays showed up to 12, 26 and 244 blue foci in banana cells transformed with pESKUL1, pESKUL7 and pCAMBIA1301, respectively. The optimal concentration of the antibiotic hygromycin was tested for the selection of transgenic cell colonies. A standardized protocol for genetic transformation in banana is been developed, setting the basis for the generation banana plants resistant to diseases for the first time in Ecuador.*

**Keywords:** *Genetic improvement, uidA<sup>INT</sup>, transgenic, cisgenic, embryogenic cell suspensions, genetic modified plants.*

## 1. Introducción

Los bananos y plátanos son el cuarto cultivo más importante en los países en vías de desarrollo después del arroz, el trigo y el maíz. El mayor contratiempo en la producción de banano (incluidos de ahora en adelante los plátanos) en el Ecuador es la enfermedad sigatoka negra, cuyo agente causal es el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet [1]. Aproximadamente entre el 25 y el 30% de la inversión en la producción bananera es requerido para el control de la sigatoka negra, mayormente a través de fungicidas convencionales. El desarrollo y producción de plantas de banano con resistencia o tolerancia a la sigatoka negra resultaría en una reducción de la aplicación de los fungicidas para el control de la enfermedad.

Los programas de mejoramiento se enfocan en la generación de plantas con resistencia a estrés biótico o abiótico conduciendo a una mayor producción. Un programa de mejoramiento convencional en banano es dificultoso debido a los altos niveles de esterilidad, necesidad de cruzamientos interploides, baja proporción de germinación de las semillas y largos ciclos de cultivo [2]. Adicionalmente, un programa de mejoramiento puede proveer unos cuantos híbridos candidatos que pueden ser altamente productivos y resistentes a algunas enfermedades. Sin embargo, otras características pueden perderse, tales como el tiempo de vida del producto o propiedades organolépticas de la pulpa, llevando a una disminución de la demanda del producto en el mercado. La ingeniería genética es una alternativa al mejoramiento convencional y ofrece a los fitomejoradores la oportunidad para superar las limitaciones impuestas por la esterilidad de la mayoría de los cultivares de banano. La transformación genética supera la esterilidad de la mayoría de los cultivos de banano usando suspensiones de células embriogénicas de banano. Dos métodos de transformación genética han sido desarrollados, los cuales incluyen el bombardeo de partículas y la transformación mediada por *Agrobacterium* [2]. La última metodología es la más usada debido al bajo número de copias de genes integrados en el genoma de la planta. A través de la transformación genética, es posible insertar solo los genes necesarios para obtener ciertas características como la resistencia a enfermedades, mientras que las características organolépticas o de post-cosecha pueden ser mantenidas tales como en el cultivar original.

El mejoramiento convencional no es posible en el subgrupo Cavendish debido al alto nivel de esterilidad del gameto femenino [3], incluyendo 'Williams' (genotipo AAA), el cual es una de las variedades de banano más cultivadas en el Ecuador. Por lo tanto, el uso de técnicas de transformación genética tiene el potencial para ser una metodología de importancia

para el mejoramiento de banano en el Ecuador. Una de las mayores ventajas de la transformación genética es que los genes integrados en el genoma del banano serán confinados, evitando la dispersión de los transgenes al ambiente o cruzamiento con otras especies nativas de banano debido a la esterilidad.

Muchos esfuerzos están enfocados en la generación de bananos cisgénicos. La generación de una planta modificada genéticamente mediante la introducción de genes, con sus promotores originales, de una planta compatible de cruzamiento o de la misma se puede denominar como cisgénica y no transgénica [4]. Estos bananos cisgénicos (i) deben conducir a una mejor percepción pública, (ii) evitarían el uso de promotores y secuencias regulatorias que son empleadas intensivamente en la generación de plantas transgénicas y pueden ser restringidas por patentes, y (iii) conducirían a una mejor estabilidad y funcionamiento de las secuencias insertadas. Recientemente promotores aislados de banano, fueron identificados en el cultivar de banano 'Three Hand Planty' [5, 6] y podrían ser usados para la generación de bananos modificados genéticamente.

Para estandarizar el método de transformación genética de banano en el Ecuador, se utilizaron suspensiones celulares embriogénicas de banano y la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, en donde se comprobó la transformación de banano mediante ensayos histoquímicos y fluorométricos para determinar la presencia del producto del gen insertado *uidA<sup>INT</sup>*. Un protocolo estandarizado de transformación genética de banano está siendo desarrollado en el Ecuador para, una vez establecido, poder introducir genes de resistencia a enfermedades, como la Sigatoka negra.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Material vegetal y condiciones del medio de cultivo.

Las suspensiones de células embriogénicas (SCE) del cultivar de banano 'Williams' (grupo genómico AAA) proporcionadas por el laboratorio de cultivo de tejidos del CIBE, fueron desarrolladas a partir de inflorescencias masculinas (Soffa Korneva, comunicación personal) y fueron subcultivadas cada dos semanas en medio ZZ que contiene medio MS [7] diluido a la mitad suplementado con 5  $\mu$ M 2,4-D y 1  $\mu$ M de zeatina [5].

### 2.2. Vectores de transformación

Los vectores que contienen los promotores de banano (variedad 'Three Hand Planty', grupo genómico AAB, número de accesoión del Centro Internacional de Tránsito ITC.0185) fusionados con el gen reportero  $\beta$ -glucuronidasa (*uidA<sup>INT</sup>*, GUS)

contienen secuencias de 1.7 kilo pares de bases (kpb) y 0.6 kpb, las cuales fueron insertadas por delante del gen *uidA*<sup>INT</sup> del pCAMBIA1391Z (pESKUL1 y pESKUL7, respectivamente [5]). El plásmido pESKUL1 contiene el promotor 17-1 (1.7 kpb) que posee actividad diferenciada a estrés de baja temperatura [6] y la secuencia se encuentra en la base de datos del GenBank del "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) bajo el número de accesión EU161097. El plásmido pESKUL7 contiene el promotor 85-1 (0.6 kpb) de banano [5]. Los vectores pESKUL1 y pESKUL7 fueron facilitados por la Universidad Católica de Lovaina en Bélgica (KULeuven) a través del "Laboratory of Tropical Crop Improvement". Otros vectores fueron adquiridos en CAMBIA ([www.cambia.org](http://www.cambia.org)) e incluyen el pCAMBIA1391Z (que contiene el *uidA*<sup>INT</sup> sin promotor) usado como vector control y el pCAMBIA1301 (con el gen reportero *uidA*<sup>INT</sup> expresado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor). Todos los vectores utilizan el gen de selección higromicina fosfotransferasa (*hph*) expresado por el promotor 35S duplicado. La clonación de los vectores en *A. tumefaciens* fue realizada de acuerdo a Santos-Ordóñez [5].

### 2.3. Parámetros probados en la modificación genética de banano.

Con el fin de estandarizar el protocolo de modificación genética en banano, diferentes parámetros fueron probados en cuatro ensayos. El experimento AT1 se centró en la expresión temporal del gen reportero *uidA*<sup>INT</sup> de los diferentes promotores: 35S en el pCAMBIA1301 y los promotores de banano identificados en la variedad 'Three Hand Planty' en los plásmidos pESKUL1 y pESKUL7 [5]. En el experimento AT2 se midió la expresión temporal del plásmido pCAMBIA1301. Debido a la amplia fenolización de las células de banano después de una semana de selección, tres experimentos independientes fueron realizados: diferentes concentraciones de *Agrobacterium tumefaciens* (0.4 y 0.2 DO<sub>600</sub>, experimento AT3) y de los antibióticos usados (50, 25, 20, 15 y 12.5 µg mL<sup>-1</sup> de higromicina; 200 y 100 µg mL<sup>-1</sup> de mezcla de Timentín® (mezcla que contiene sal disódica ticarcilina y clavulanato de potasio SIGMA en relación 15:1), experimentos AT4.1 y AT4.2) fueron probados para evitar la fenolización de las líneas de células de banano durante el período de selección.

### 2.4. Protocolo de transformación

La transformación de Suspensiones de Células Embriogénicas (SCE) de banano mediada por *Agrobacterium* fueron descritas por Remy *et al.* [8], Pérez-Hernández *et al.* [9] y Santos-Ordóñez [5]. El

*Agrobacterium* fue co-cultivado con la suspensión de células embriogénicas de banano del cultivar 'Williams'. El protocolo estándar de las muestras infectadas contiene 200 µL de células a una concentración del 33% del volumen de SCE, lo cual equivale aproximadamente a 50 mg de peso fresco de células mezcladas con 1000 µL de bacteria inducida con una DO<sub>600</sub> de 0.4.

### 2.5. Determinación de la actividad del gen reportero *uidA*<sup>INT</sup>

Luego de siete días de co-cultivo con *A. tumefaciens*, la actividad del gen *uidA*<sup>INT</sup> fue evaluada. Las mallas de poliéster con las mezclas de células transformadas fueron transferidas a una caja Petri de 5-cm de diámetro, cada una con un papel filtro esterilizado en autoclave, y luego histoquímicamente teñidas para medir la actividad temporal del GUS en presencia del sustrato X-Gluc de acuerdo a Jefferson *et al.* [10] y Santos-Ordóñez [5]. La frecuencia de la actividad temporal del gen GUS (ATG) fue expresada como el número de puntos azules por muestra de 50 mg de peso fresco de células de dos a ocho repeticiones. El conteo de los puntos azules fue realizado usando un estereoscopio y las imágenes fueron tomadas con una cámara digital. Las colonias transformadas estables fueron histoquímicamente teñidas como fue descrito previamente luego de ocho semanas bajo presión selectiva con higromicina. El análisis fluorométrico para medir la actividad enzimática del GUS fue desarrollada de acuerdo a los procedimientos modificados de Jefferson *et al.* [10] y Santos-Ordóñez [5]. Después de siete días de co-cultivo, se usaron entre 100 a 200 mg de peso fresco aproximadamente para el análisis fluorométrico.

### 2.6. Selección de colonias celulares modificadas genéticamente.

Luego de siete días de co-cultivo, las mezclas celulares fueron transferidas a medio ZZ sólido con una concentración de 50 µg mL<sup>-1</sup> de higromicina (Invitrogen) para la selección de las células modificadas genéticamente, y 200 µg mL<sup>-1</sup> de mezcla de Timentín® para la eliminación de la agrobacteria. Las células fueron incubadas en oscuridad a 26 ± 2°C, con un subcultivo cada dos semanas de dos a tres meses. Diferentes concentraciones de higromicina fueron probadas durante el proceso de selección, éstas incluyen concentraciones de 50, 25, 20, 15 y 12.5 µg mL<sup>-1</sup>. Para la regeneración, las colonias celulares de banano, putativamente transgénicas, fueron transferidas a medio RD1 (medio MS diluido a la mitad, suplementado con 100 mg L<sup>-1</sup> de mioinositol) para la inducción de embriones de acuerdo a Santos-Ordóñez (2008).

## 2.7. Determinación molecular de líneas modificadas genéticamente de banano.

Para la determinación de la presencia del ADN de transferencia (ADN-T) de los plásmidos utilizados, se desarrolló la reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando los iniciadores GUSF-1 (TTCTTGGTTAGGACCTTTTCTC) y GUSR-1 (GACCCACACTTTGCCGTAAT) que se anillan específicamente al gen reportero GUS. El aislamiento de ADN y las condiciones de PCR se realizaron de acuerdo a Santos-Ordóñez [5].

## 3. Resultados y discusión

### 3.1. Expresión temporal del gen reportero *uidA*<sup>INT</sup>

Se midió la actividad temporal del gen *uidA*<sup>INT</sup> de dos muestras por tratamiento (Tabla 1) en el primer experimento (AT1). Como se esperaba, los controles mostraron 0 puntos azules, mientras que el pCAMBIA1391Z que no contenía promotor en el gen *uidA*<sup>INT</sup> mostró un punto azul luego de 48 y 120 horas de incubación con X-Gluc en una muestra. Debido a las propiedades de actividad del aumentador del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor [11] que expresa el marcador de selección para resistencia a la higromicina, la expresión del gen reportero puede observarse ocasionalmente. Por lo tanto, el pCAMBIA1391Z es usado como control negativo de los eventos de transformación como es sugerido en CAMBIA

([http://www.cambia.org/daisy/bioforge\\_legacy/3725.html](http://www.cambia.org/daisy/bioforge_legacy/3725.html)) debido a la presencia del promotor 35S del marcador del gen de selección en los vectores pESKUL1, pESKUL7 y pCAMBIA1301. Aunque uno de los puntos azules fue observado solo en una muestra, la actividad de los promotores de banano probados fue confirmada en las células embriogénicas transformadas con el pESKUL1 (12 y 0 puntos azules) y el pESKUL7 (26 y 17 puntos azules). Sin embargo, se observó una actividad más alta en las células transformadas con el pCAMBIA1301 en comparación con las líneas pESKUL1 y el pESKUL7 (Tabla 1). Estos resultados confirman la baja actividad de los promotores de banano observados en otros cultivares incluyendo en las variedades de banano ‘Three hand Planty’ (grupo genómico AAB) y ‘Gran Enano’ (AAA) cuando son comparados con otros promotores como el del 35S [5] (contenido en el vector pCAMBIA1301) y de ubiquitina de maíz [6].

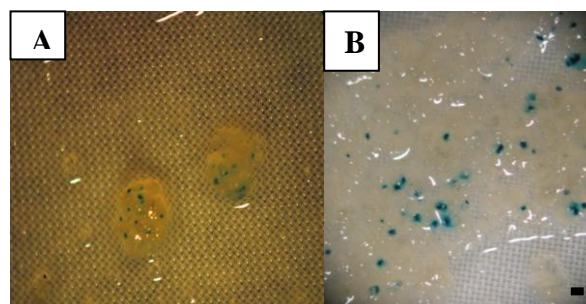
Un experimento independiente de transformación (AT2) fue desarrollado usando solo el vector pCAMBIA1301 para la verificación de la eficiencia de transformación debido al gran número de puntos

azules contabilizados (Tabla 1). La expresión del gen GUS fue medida (Figura 1) notándose que el número de puntos azules se duplicó en comparación con el tratamiento del pCAMBIA1301 del experimento anterior (Tablas 1 y 2). El análisis histoquímico es un indicador de la eficiencia de transformación al contabilizar el número de puntos azules después de 1 semana de co-cultivo de SCE de banano con *A. tumefaciens*. Diferentes SCE del cultivar ‘Williams’ fueron usadas en los dos experimentos independientes (AT1, AT2) y puede ser la causante de la variación, indicando que la segunda SCE tiene una mayor competencia para la transformación.

**Tabla 1.** Actividad temporal del gen *uidA*<sup>INT</sup> en el experimento AT1.

Tratamiento	Número de puntos azules		
	24	48	120
control	0	0	0
control	0	0	0
pCAMBIA1391Z	0	1	1
pCAMBIA1391Z	0	0	0
pESKUL1	0	11	12
pESKUL1	0	0	0
pESKUL7	19	19	26
pESKUL7	7	12	17
pCAMBIA1301	90	242	244
pCAMBIA1301	220	247	246

Las muestras contienen aproximadamente 50 mg de tejido fresco de células embriogénicas de banano luego de ser co-cultivadas con *A. tumefaciens* conteniendo distintos plásmidos (tratamientos) por siete días. Las muestras fueron incubadas con el sustrato X-Gluc a 37°C por 4-5 horas y el número de puntos azules fue contabilizado a las 24, 48 y 120 horas. Las muestras fueron mantenidas en oscuridad a temperatura ambiente luego de la incubación a 37°C. Control: células embriogénicas de banano no transformadas.



**Figura 1.** Expresión del gen GUS de los experimentos AT1 (A) y AT2 (B) tratamientos realizados usando el vector pCAMBIA1301. Las muestras que contenían 50 mg de peso fresco de células embriogénicas de banano co-cultivadas con *A. tumefaciens* con el plásmido pCAMBIA1301 fueron incubadas a 37°C durante 4-5 horas en presencia de X-Gluc y el conteo de los puntos azules fue llevado a cabo luego de 48 horas después de la incubación. Los puntos azules indican la transformación temporal de las células embriogénicas de banano. La barra representa 200 μm.

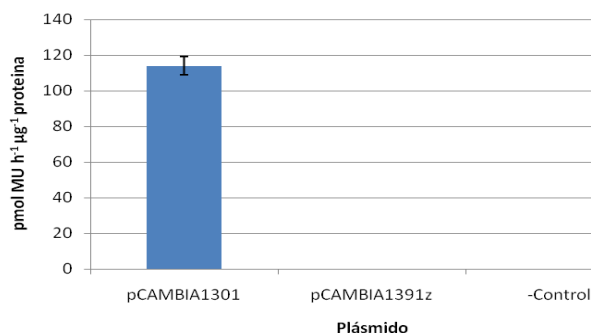
**Tabla 2.** Actividad temporal del gen *uidA*<sup>INT</sup> en el experimento AT2.

Tratamiento	Número de puntos azules
control	0
control	0
control	0
pCAMBIA1391Z	0
pCAMBIA1391Z	0
pCAMBIA1391Z	0
pCAMBIA1391Z	0
pCAMBIA1301	509
pCAMBIA1301	473
pCAMBIA1301	287
pCAMBIA1301	484

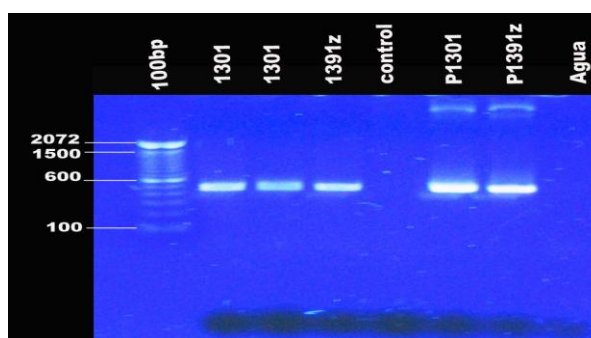
Las muestras contienen 50 mg aproximadamente de peso fresco de células embriogénicas de banano luego de ser co-cultivadas con *A. tumefaciens* con distintos plásmidos (tratamientos) por siete días. Las muestras fueron incubadas a 37°C entre 4 a 5 horas y el número de puntos azules fue contabilizado 48 horas luego de la incubación. Las muestras fueron mantenidas en la oscuridad a temperatura ambiente luego del tratamiento a 37°C. Los controles se refieren a células embriogénicas de banano no transformadas.

Complementario al análisis histoquímico, el ensayo fluorométrico cuantitativo de la enzima GUS fue realizado a partir de extractos de colonias combinadas de banano luego de una semana de co-cultivo con *Agrobacterium* (Figura 2). Como se observó en el análisis histoquímico (Figura 1) la actividad enzimática de GUS fue claramente detectada en las colonias celulares que contienen el ADN-T de pCAMBIA1301 (Figura 2). El promedio de la actividad alcanzada fue de 114 pmol MU h<sup>-1</sup> μg<sup>-1</sup> de proteína en el tratamiento con pCAMBIA1301 mientras que en las células transformadas con pCAMBIA1391Z (ausencia de promotor en gen reportero) no se detectó actividad alguna del GUS, así como en las células no transformadas. El análisis cuantitativo confirmó el éxito en la transformación genética de banano.

Finalmente, la comprobación de la integración del ADN-T en el genoma de las células embriogénicas de banano, se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa con el ADN de las muestras de células embriogénicas transformadas, usando iniciadores específicos que se anillan al gen reportero *uidA*<sup>INT</sup> presente tanto en el plásmido pCAMBIA1301 como en el pCAMBIA1391Z. Las células embriogénicas no transformadas y el control del PCR (agua) fueron usadas como controles negativos, mientras como controles positivos se usaron directamente los plásmidos. Se detectaron amplicones en las muestras de ADN de células transformadas con los plásmidos pCAMBIA1301 y pCAMBIA1391Z confirmando la transformación genética de las células de banano (Figura 3).



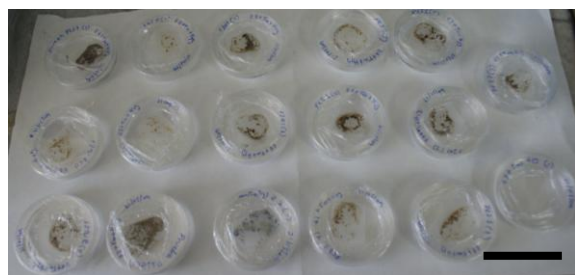
**Figura 2.** Actividad enzimática del GUS en las células embriogénicas de banano luego de una semana de co-cultivo con *A. tumefaciens*. Las muestras contenían aproximadamente 150 mg de tejido fresco de células embriogénicas que fueron analizadas para determinar la expresión del gen GUS. Los plásmidos usados para la transformación fueron pCAMBIA1301 (promotor 35S que expresa el gen reportero *uidA*<sup>INT</sup>) y pCAMBIA1391Z (gen reportero *uidA*<sup>INT</sup> sin promotor). Las células no transformadas se representan como '-Control'. La actividad enzimática del GUS es expresada como pmol MU h<sup>-1</sup> μg<sup>-1</sup> de proteína. Cada valor es el promedio de tres mediciones independientes y el error estándar es indicado.



**Figura 3.** Presencia del gen reportero *uidA*<sup>INT</sup> determinado por PCR en células de banano transformadas mediante *A. tumefaciens*. Gel de agarosa al 1.5% con el producto de PCR (469 pb) generado usando los iniciadores GUSF-1 y GUSR-1 de las células embriogénicas (1301 en duplicado, se refiere a las células embriogénicas transformadas usando el plásmido pCAMBIA1301; 1391z a las células embriogénicas transformadas con el plásmido pCAMBIA1391Z). Los controles positivos usados fueron los plásmidos pCAMBIA1301 (P1301) y pCAMBIA1391Z (P1391z). Control se refiere a células no transformadas. Marcador de peso molecular se indica como 100bp y el tamaño en pares de bases de bandas referenciales es ilustrado a la izquierda.

### 3.2. Protocolo de modificación genética para la selección de líneas transgénicas estables de banano.

Después de una semana de selección para los eventos transgénicos en medio ZZ con los antibióticos higromicina ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y la mezcla de Timentín® ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) las células de banano se fenolizaron (Figura 4) y eventualmente no se mostró ningún crecimiento de las mismas en el experimento AT1.



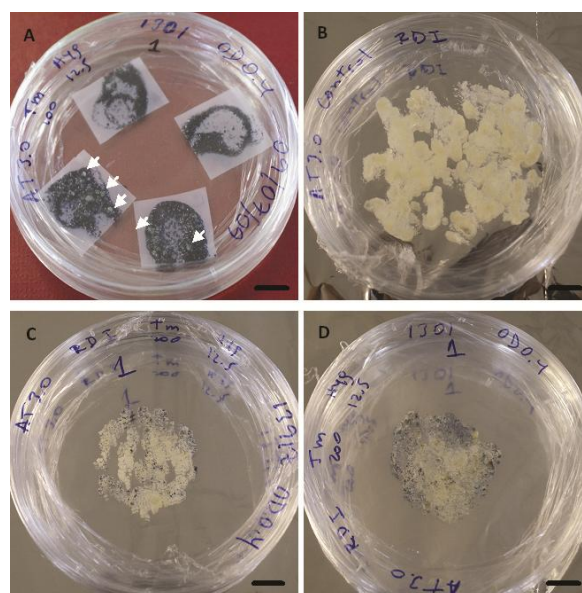
**Figura 4.** Células de banano luego de una semana de selección en medio ZZ con los antibióticos higromicina ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y Timentín® ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). La barra representa 5.5 cm (Experimento AT1).

Debido a la amplia fenolización de las células de banano después de una semana de selección, tres experimentos independientes fueron realizados. Diferentes concentraciones de *Agrobacterium tumefaciens* ( $0.4$  y  $0.2 \text{ OD}_{600}$ , experimento AT3) y de los antibióticos usados ( $50$ ,  $25$ ,  $20$ ,  $15$  y  $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de higromicina;  $200$  y  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Timentín®, experimentos AT4.1 y AT4.2) fueron probados para evitar la fenolización de las líneas de células de banano durante el período de selección.

Una semana después de la selección con antibióticos, no se encontró una diferencia significativa entre los patrones de fenolización entre las muestras con distintas concentraciones de *Agrobacterium* en el experimento AT3 (no ilustrado). El procedimiento de selección en el experimento AT3 (decrecimiento de las concentraciones de higromicina de  $50$  a  $25$  y  $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  durante los primeros tres subcultivos, respectivamente, y luego se mantuvieron en  $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) revela que colonias celulares putativamente transgénicas crecieron después de siete y once semanas de selección (Figura 5). Por lo tanto, dos experimentos adicionales fueron realizados para probar distintas concentraciones del agente selectivo (AT4.1 y AT4.2). Experimentos realizados en otros laboratorios [5] usando los vectores pESKUL1 y pESKUL7 para la transformación mediada por *Agrobacterium* de SCE de banano, revelaron que la concentración de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de higromicina era suficiente para la selección de eventos transgénicos

estables. Sin embargo, el reactivo higromicina usado por Santos-Ordóñez [5] y el usado en el presente estudio sugieren que ambos antibióticos poseen distinta actividad (Lászlo Sági, Serge Remy, comunicación personal).

La concentración de la mezcla de antibióticos (componentes de Timentín®) para la eliminación del *A. tumefaciens* fue determinada por la comparación del crecimiento bacteriano en medio semisólido durante la selección de las líneas transgénicas de banano. A una concentración de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  se detectó crecimiento bacteriano (no ilustrado). Por lo tanto, la concentración óptima de los componentes de Timentín® fue la de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  debido a la ausencia de crecimiento bacteriano (no ilustrado), como fue realizado por Remy *et al.* [8], Pérez-Hernández *et al.* [9] y Santos-Ordóñez [5].



**Figura 5.** Colonias de células transgénicas putativas de banano luego de siete (A) y once semanas (C y D) de selección ( $50$ ,  $25$ , y  $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de higromicina durante los primeros tres subcultivos, respectivamente, y luego se mantuvieron en  $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Las flechas indican colonias de células putativas transgénicas. (A) Muestras transformadas con el pCAMBIA1301 (promotor 35S que expresa el gen reportero *uidA*<sup>INT</sup>) en medio ZZ. (B) Colonias de células no transformadas de banano en medio RD1. (C) Colonias de células putativas transgénicas de banano con el plásmido pCAMBIA1391Z (gen reportero *uidA*<sup>INT</sup> sin promotor) en medio RD1 con el antibiótico higromicina a una concentración de  $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . (D) Colonias de células transgénicas putativas con el pCAMBIA1301 (gen reportero *uidA*<sup>INT</sup> expresado por el promotor 35S) en medio RD1 con el antibiótico higromicina a una concentración de  $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Las barras representan 1 cm (Experimento AT3).

Diez semanas de selección con diferentes concentraciones de higromicina en el experimento AT4.1 (50, 25 y 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) revela la presencia de colonias de células putativas transgénicas en el tratamiento con 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de higromicina ( $194 \pm 24$  colonias de células, promedio de cuatro muestras). Cuatro muestras con aproximadamente 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y tres muestras de cuatro de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  mostraron una fenolización generalizada y no se detectó ninguna colonia de células (no ilustrado). Solo una muestra mantenida a una concentración de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de higromicina mostró 26 colonias de células transgénicas putativas. El análisis histoquímico luego de 12 semanas de selección reveló que las colonias celulares fueron transformadas siendo subcultivadas en higromicina a una concentración de 25 y 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (no ilustrado). Por lo tanto, el análisis histoquímico revela la presencia del ADN-T de pCAMBIA1301 en el genoma de las colonias de células de banano.

Asimismo, diez semanas de selección con diferentes concentraciones de higromicina en el experimento AT4.2 (50, 25, 20, 15 y 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) determinó presencia de colonias transgénicas putativas de banano a partir de muestras mantenidas a 20, 15 y 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de higromicina al encontrar  $67 \pm 31$ ,  $153 \pm 39$  y  $204 \pm 28$  colonias celulares transgénicas putativas, respectivamente, en ocho muestras analizadas por tratamiento. En cambio, no se encontraron colonias celulares sobrevivientes en las muestras mantenidas a 50 y 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Nuevos análisis deben ser realizados aún para confirmar la transformación permanente de las colonias de células, especialmente entre las sobrevivientes en concentraciones bajas de higromicina, entre ellos se incluye el análisis mediante "Southern blot". Actualmente las líneas de banano transformadas se encuentran en proceso de regeneración en vitroplantas.

### 3.3. Protocolo estandarizado de modificación genética de suspensión de células embriogénicas de banano de la variedad 'Williams' mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

A continuación se describe el protocolo estandarizado para transformación genética de banano mediante *A. tumefaciens* de acuerdo al gen de selección usado (*hph*) presente en los plásmidos pCAMBIA1301, pCAMBIA1391z, pESKUL1 y pESKUL7.

Sembrar el *Agrobacterium* transformado con un vector en medio YEP sólido suplementado con

kanamicina (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para luego de 48 horas obtener colonias puras, de las cuales usando una punta de pipeta, transferir una pequeña cantidad a un tubo Falcon de 50 mL con medio YEP líquido suplementado también con kanamicina (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y dejar en una incubadora en agitación a 200 rpm, 28°C por 24 horas. Luego, centrifugar el tubo a 4000 rpm para recolectar las bacterias, posterior a esto resuspender en medio ZZ líquido suplementado con Acetosyringone (200 $\mu\text{M}$ ) para inducir la virulencia de la bacteria. Una vez hecho esto, colocar en una placa de 24 pocillos 200 $\mu\text{L}$  de suspensión de células embriogénicas al 33% junto con 1 mL de *Agrobacterium* inducido con una  $\text{DO}_{600}$  de 0.4, co-cultivar por 6 horas a 30 rpm a 25°C. Después, colocar el contenido del pocillo en una malla que se encuentra sobre papel filtro para que el medio líquido sea absorbido. Luego colocar las mallas en cajas Petri de 5 cm de diámetro con medio ZZ sólido suplementado con Acetosyringone (200 $\mu\text{M}$ ) e incubar en oscuridad a 21°C por siete días. Una vez transcurridos los siete días hacer el análisis histoquímico y fluorométrico, y empezar la selección usando los antibióticos Timentín (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e higromicina (12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por diez semanas. Transcurrido este tiempo, transferir las células a medio RD1 suplementado con higromicina (12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 4-6 semanas, para luego colocarlas en medio ITC-K (Ácido Indol Acético 4  $\text{mL L}^{-1}$ , Kinetin 4  $\text{mL L}^{-1}$  y Benzilaminopurina 4  $\text{mL L}^{-1}$ ) para la fase de regeneración de plantas.

## 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1. Conclusiones

- Los resultados de los análisis histoquímico, fluorométrico y de la reacción en cadena de la polimerasa confirmaron que las células de banano del cultivar 'Williams' co-cultivadas con *A. tumefaciens* fueron modificadas genéticamente obteniendo una eficiencia de transformación de  $194 \pm 24$  y  $204 \pm 28$  colonias transgénicas putativas por muestra después de 10 semanas de transformación en dos experimentos independientes, bajo selección a 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de higromicina.

- El análisis de la expresión del gen reportero *uidA*<sup>INT</sup> revela que los promotores de banano 17-1 y 85-1 obtenidos de la variedad 'Three Hand Planty' tienen una actividad inferior a la del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor en células embriogénicas de banano de la variedad 'Williams'.

- La selección por antibiótico usando higromicina como agente de selección a una concentración de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  mostró ser nocivo para las células embriogénicas transformadas de banano (AT1), con el gen de resistencia a la higromicina expresada con el promotor 35S del CaMV duplicado.

- La concentración óptima de higromicina (obtenida a partir de los ensayos AT4.1 y AT4.2) donde se obtuvo un mayor número de colonias putativas transgénicas es de 12.5 µg mL<sup>-1</sup>.

## 4.2. Recomendaciones

- Cuando se utiliza el antibiótico higromicina como agente de selección es recomendable realizar una curva de mortalidad usando diferentes concentraciones, debido a la necesidad de optimizar el protocolo de selección de líneas de banano transgénicas estables, puesto que el producto puede tener distinta actividad de acuerdo a la marca y lote.

- La verificación de líneas de células de banano transgénicas estables debe ser realizada por análisis de "Southern blot".

## 5. Agradecimientos

Este trabajo se financió a través de la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) del Gobierno del Ecuador (proyecto PIC-08-0000300) y a través del Gobierno Flamenco de Bélgica (VLIR-IUS, programa de cooperación VLIR-ESPOL, Ecuador). Las suspensiones de células embriogénicas fueron suministradas por Sofía Korneva y Joffre Mendoza del CIBE. Los vectores pESKUL1 y pESKUL7 fueron otorgados por la Universidad Católica de Lovaina en Bélgica (KULeuven) a través de Rony Swennen, director del "Laboratory of Tropical Crop Improvement".

## 6. Referencias

- [1] Tazán-Cabezas, L., "El cultivo del plátano en el Ecuador. Ministerio de Agricultura y Ganadería". Subsecretaría Regional del Litoral, Sur y Galápagos. Editorial Raíces, Guayaquil, Ecuador. 72 p. 2003.
- [2] Swennen, R., Arinaitwe, G., Cammue, B. P. A., François, I., Panis, B., Remy, S., Sági, L., Santos, E., Strosse, H., and Van den houwe, I., "Transgenic approaches for resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases in *Musa* spp.," Jacome L, Lepoivre P, Marin D, Ortiz R, Romero R, Escalant JV (ed.), *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. *Proceedings of the 2nd International workshop on Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas*, San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. INIBAP, Montpellier, France, pp. 209-238. Disponible en: <http://bananas.biodiversityinternational.org/files/files/pdf/publications/mycosphaerella.pdf>.
- [3] Sági, L., "Genetic engineering of Banana for disease resistance – Future Possibilities," *Diseases of Banana*, Abacá and Enset. D.R. Jones, editor. CAB International, Wallingford, UK, 1999. pp. 465-515.
- [4] Schouten, H. J., Krens, F. A., and Jacobsen, E., "Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: International regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis," *EMBO Reports* 7, 2006, pp. 750-753.
- [5] Santos-Ordóñez, E. G., "Characterization and isolation of T-DNA tagged banana promoters active during *in vitro* regeneration and low temperature stress," *Dissertationes de agricultura*, Ph.D. thesis 787, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium, Faculteit Bio-Ingenieurswetenschappen. 188 p. 2008.
- [6] Santos, E., Remy, R., Thiry, E., Windelinckx, S., Swennen, R., and Sági L., "Characterization and isolation of a T-DNA tagged banana promoter active during *in vitro* culture and low temperature stress," *BMC Plant Biology* 9, 2009, pp. 77. doi:10.1186/1471-2229-9-77
- [7] Murashige, T., Skoog, F., "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures," *Physiologia Plantarum*, 15, 1962, pp. 473-497.
- [8] Remy, S., Thiry, E., Coemans, B., Windelinckx, S., Swennen, R., and Sagi, L., "Improved T-DNA vector for tagging plant promoters via high-throughput luciferase screening," *Biotechniques*, 38, 2005, pp. 763-70.
- [9] Pérez-Hernández, J. B., Remy, S., Swennen, R., and Sági, L., "Banana (*Musa* sp.)," Wang K. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 344: *Agrobacterium* Protocols 2/e, volume 2. Humana Press Inc., Totowa 2006, NJ, pp. 167-175.
- [10] Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., and Bevan, M. W., "GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants," *EMBO Journal* 6, 1987, pp. 3901-3907.
- [11] Benfey, P. N., and Chua, N. H., "The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants," *Science* 250, 1990, pp. 959-966.