

## **Optimización de algunos parámetros físicos y químicos que afectan la sobrevivencia y expresión transitoria del gen GUS en ápices caulinares *in vitro* de plátano (*Musa* sp. cv. Hartón) transformados mediante biobalística**

Optimization of some physical and chemical parameters affecting survival and GUS transient expression of *in vitro* shoot tips of plantain (*Musa* sp. cv. Harton) transformed by the biolistic method

R. Valerio<sup>1</sup> y E. de García<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Av. Universidad, Cumaná 6101, Venezuela.

<sup>2</sup>Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela, Caracas 1041A, Venezuela.

### **Resumen**

Con el objeto de optimizar algunos parámetros físicos y químicos que afectan la sobrevivencia y expresión transitoria del gen GUS en ápices caulinares *in vitro* de plátano (*Musa* sp. cv. Hartón) transformados por Biobalística, se ensayaron distintas distancias cañón-tejido blanco así como diferentes presiones de helio y concentraciones de ADN. Para cada tratamiento se bombardearon 60 ápices. Las presiones de He ensayadas no afectaron significativamente la tasa de sobrevivencia de los ápices bombardeados, mientras que las distancias de bombardeo sí. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de expresión GUS positiva de los ápices sometidos a distintas distancias y presiones de bombardeo. La sobrevivencia y expresión transitoria del gen GUS en los ápices resultaron favorecidas con el uso de la mayor concentración de ADN probada.

**Palabras clave:** biobalística, *Musa* sp., transformación genética, ápices caulinares, GUS.

## Abstract

Physical and chemical parameters affecting survival and GUS transient expression of *in vitro* shoot tips of *Musa* sp cv. Hartón by using biolistic were optimized by using different helium pressures, distances and DNA concentrations. For each treatment, 60 shoot tips were bombarded. The survival rate was not affected by pressure tested, to contrary of the distance. There were not found significative differences between the positive GUS expression levels showed for the shoot tips treated with distinct distances and He pressure. The survival and transient expression of the shoot tips were favoured with the highest DNA concentration used.

**Key words:** biolistic, *Musa* sp., genetic transformation, shoot tips, GUS.

## Introducción

El plátano (*Musa* sp.) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial debido a su uso no solo como alimento básico, sino como materia prima para la elaboración de numerosos productos derivados de ciertas partes de la planta (4). Ocupa el cuarto lugar en consumo mundial y es uno de los principales productos exportados por Venezuela para Europa, Estados Unidos y las Islas del Caribe. Actualmente, centrados en la búsqueda de variedades de plátano y cambures resistentes a distintas enfermedades, se ha recurrido al uso de distintos métodos de fitomejoramiento tales como la hibridación, mutagénesis, variación somaclonal y transformación genética. Uno de los métodos de transformación genética más utilizados hoy en día lo constituye la biobalística o disparo de

microproyectiles (3), el cual requiere para su aplicación de la estandarización de ciertos parámetros físicos (tamaño y composición química de las micropartículas, distancia y presión de bombardeo, tiempo de inyección, tamaño de la construcción genética usada) químicos (concentración de ADN y micropartículas, composición del medio de cultivo usado para la regeneración *in vitro*) y biológicos: estados fisiológicos del explante y planta donadora (2). En este sentido, la optimización de algunos parámetros físicos y químicos involucrados en este tipo de transformación está bien justificado y se considera un gran aporte para futuras investigaciones relacionadas con el mejoramiento genético del plátano como rubro de considerable importancia comercial.

## Materiales y métodos

Los ápices caulinares bombardeados fueron aislados a partir de plantas de plátano cv. Hartón (AAB)

cultivadas "in vitro" en medio MS con 0.5 mg/L de BAP. Dichos ápices, de 2 mm de diámetro por 3-4 mm de alto,

fueron colocados sobre medio MS con 2,5 mg/L de BAP para su bombardeo en una máquina de baja presión de fabricación nacional compuesta por una cámara metálica rectangular (cámara de vacío) dentro de la cual se colocan las muestras vegetales a bombardear. Este aparato alcanza un vacío máximo de 21 pulgadas de mercurio y presiones de helio desde 0 hasta 400 psi; dispone de controles para seleccionar el tiempo de vacío e inyección del disparo así como también para controlar la carga y descarga del vacío de la cámara (figura 1). Para los eventos de transformación se usaron micropartículas de tungsteno de 1.1  $\mu\text{m}$  de diámetro, esterilizadas y procesadas según protocolo de Klein *et al.* (1988), cubiertas con el plásmido pCAMBIA3201, un vector de 11.459 pb portador de los genes *cat* (resistencia al cloranfenicol) *gus* (gen reportero), *bar* (resistencia al herbicida glufosinato de amonio) y la secuencia promotora constitutiva CAMV35S. Con el objeto de evaluar la influencia de la distancia y presión de bombardeo sobre la sobrevivencia y expresión GUS positiva de los ápices disparados, se ensayaron tres distancias cañón-tejido blanco (8.5 cm, 9.5 cm y 11 cm) combinadas con tres presiones (80 psi, 100 psi y 150 psi) para un total de 9 combinaciones distancia-presión. Para cada tratamiento se bombardearon 60 ápices distribuidos en 5 placas de Petri (12 ápices en cada una).

Transcurridos 14 a 21 días posteriores al bombardeo, se evaluó la sobrevivencia (número total de ápices sobrevivientes al disparo) y la expresión transitoria GUS (número de ápices bombardeados con sectores foliares positivos a la prueba histoquímica de GUS) por placa (5 réplicas). Los datos obtenidos se analizaron mediante las pruebas ANOVA doble con repetición y ANOVA simple (Sokal y Rohlf 1969). El ANOVA doble permitió evaluar la existencia de diferencias entre los niveles de sobrevivencia y expresión transitoria GUS de los ápices con respecto a las distancias y presiones de bombardeo (tratamientos columnas y filas, respectivamente), así como la interacción existente entre estos dos factores. El ANOVA simple permitió analizar las 9 combinaciones distancia-presión como tratamientos separados y la prueba MRS agrupó los tratamientos según la similitud de su comportamiento estadístico. Una vez seleccionadas la presión y distancia óptimas de bombardeo, se evaluó el efecto de la concentración de ADN sobre la expresión transitoria GUS mediante el disparo de dos grupos de ápices con micropartículas portadoras de dos concentraciones de ADN diferentes: 1.25 y 2.0 mg/disparo, y a continuación se tomó nota del porcentaje de ápices bombardeados sobrevivientes y ápices positivos a la prueba histoquímica de la  $\beta$ -glucuronidasa.

## Resultados y discusión

**Sobrevivencia.**- El ANOVA doble reveló la presencia de diferencias altamente significativas ( $P < 0,001$  en-

tre los niveles de sobrevivencia de los ápices bombardeados a las tres distancias de disparo probadas. Asimismo



**Figura 1. Pistola de Helio a baja presión fabricada en el IVIC y ubicada en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del IBE-UCV Caracas. Se observa la cámara de vacío con las plataformas porta-muestras y en la parte inferior de la máquina los botones para regular el tiempo de inyección, descarga de vacío y tiempo de aplicación de la presión de vacío.**

mo, se encontraron diferencias muy significativas ( $P < 0,01$ ) entre la sobrevivencia de los ápices disparados con respecto a las 3 presiones ensayadas; no se encontró interacción entre los factores distancia y presión de bombardeo. De acuerdo con la prueba MRS, las tres distancias y las tres presiones ensayadas no forman grupos entre sí sino que actúan de forma separada obteniéndose la mayor sobrevivencia a una distancia de 11 cm y una presión de 150 psi. Este resultado concuerda con lo señalado por algunos autores quienes han señalado que que «a medida que aumenta la distancia muestra-cañón, disminuye la velocidad de las micropartículas y éstas se distribuyen más amplia y uniformemente sobre el tejido blanco lo cual resulta en un menor daño físico

del mismo..." (2). El ANOVA simple, por su parte, reveló la existencia de diferencias altamente significativas ( $P < 0,001$ ) entre las 9 combinaciones distancia- presión ensayadas. Se formaron 6 grupos de los cuales 3 comparten similitud entre sí y los otros 3 actúan de forma independiente siendo el grupo 6 (tratamiento 9), correspondiente a la combinación 11 cm - 150 psi, el que resultó más efectivo en la obtención del mayor número de ápices sobrevivientes (cuadro 1).

Expresión transitoria del gen GUS.- De acuerdo con el ANOVA doble, no existen diferencias significativas entre los niveles de expresión transitoria de los ápices disparados con respecto a las 3 distancias y a las 3 presiones ensayadas; no obstante se existe interacción entre los dos facto-

**Cuadro 1. Sobrevivencia, medida como número de ápices sobrevivientes al disparo, y expresión transitoria GUS positiva, estimada como número de ápices bombardeados con sectores foliares positivos a la prueba histoquímica de GUS, de ápices caulinares de plátano (Musa sp. Cv. Hartón) sometidos a 9 combinaciones distintas de distancia y presión de bombardeo. T1 a T9: Combinaciones distancia (cm) - presión (psi) de bombardeo. S: Sobrevivencia; ET: Expresión Transitoria.**

	T1 (8,5 - 80)	T2 (9,5 - 80)	T3 (11 - 80)	T4 (8,5-100)	T5 (9,5 -100)	T6 (11- 100)	T7 (8,5 - 150)	T8 (9,5-150)	T9 (11- 150)
S	1,2	1,8	2,8	0	0,8	2	0	3	4,8
ET	0	0	0,8	0,2	0,2	0	0	1,2	0,2

Los valores mostrados corresponden a las medias obtenidas por placa de siembra.

Grupos formados según prueba MRS:

Sobrevivencia: T9 > (T3 =T8) > (T2 = T6) > (T2 = T1) > (T5 = T1) > (T4 = T7)

Expresión transitoria GUS: T8 > T3 > (T4 = T5 = T9) > (T1 = T2 = T6 = T7).

res. El ANOVA simple mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las 9 combinaciones distancia – presión ensayadas. Se obtuvieron 4 grupos de tratamientos, siendo el tratamiento T8, correspondiente a la combinación 9,5 cm – 150 psi, el más efectivo para la obtención del mayor nivel de expresión transitoria en los ápices bombardeados. De acuerdo con estos resultados, una distancia de 11 cm combinada con una presión de 150 psi resultan efectivas para la sobrevivencia de los ápices de plátano Hartón en estudio, mientras que una distancia de 9,5 cm combinada con una presión de 150

psi permiten el nivel más alto de expresión transitoria. En base a esto, se decidió seleccionar como distancia y presión óptimas de bombardeo, 9,5 cm y 150 psi, respectivamente, condiciones bajo las cuales, variando la concentración de ADN utilizada, se observó que los valores de sobrevivencia y expresión GUS positiva de los ápices caulinares resultaron mayores cuando se utilizó una concentración de ADN de 2 mg/disparo, ubicada dentro del rango de concentraciones de ADN (0.5 – 2.5  $\mu$ g) recomendadas en investigaciones anteriores (1, 6).

## Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos, la distancia de 9.5 cm combinada con una presión de bombardeo de 150 psi, permitieron los más altos niveles de sobrevivencia y expresión transitoria GUS en ápices de plátano

Hartón (*Musa* sp.). La sobrevivencia y expresión transitoria GUS de los ápices caulinares son mayores cuando se utiliza una concentración de ADN de 2 mg/disparo.

## Literatura citada

1. Becker, D., B. Dugdale, M. Smith, R. Harding and J. Dale. 2000. Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. «Grand Nain» via microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports* 19: 229-234.
2. Birch, R. and T. Franks. 1991. Development and Optimisation of Microprojectile System for Plant Genetic Transformation. *Aust. J. Plant. Physiol.* 18: 453 – 464.
3. De García E., C. Villarreal y M. Oropeza M. (2004). Avances en la transgénesis de plátano (*Musa* AAB cv. Hartón): Transformación para resistencia al herbicida BASTA. *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ.* Vol 21.
4. Martínez, G. 1996. Los mil y un uso de las musáceas y plantas afines. FONAIAP Divulga N° 62, Edición Especial XXXV Aniversario FONAIAP. Versión electrónica: [www.ceniap.gov.ve](http://www.ceniap.gov.ve).
5. Sokal, R. y J. Rohlf. H. 1969. *Biometría, principios y métodos estadísticos en la investigación biológica.* Blume Ediciones. Madrid, España.
6. Sreeramanan, S. and M. Marziah. 2002. Physical and biological parameters affecting transient and stable GUS gene expression in Pisung rastali (*Musa* sp. AAB) using the biolistic gun. *Memorias XV Reunión Internacional de ACORBAT, Colombia, 2002.* p. 29– 30.