

# **MAESTRÍA EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**Caracterización de líneas de papaya (*Carica papaya* L.)  
transformadas genéticamente con el gen *gltA* de  
*Pseudomonas aeruginosa* que codifica para citrato  
sintasa**

**Tesis que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias presenta:**

**FULGENCIO ALATORRE COBOS**

**Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C.**

**Mérida, Yucatán, México**

**2005**



## **RECONOCIMIENTOS**

Este trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. bajo la dirección de la Dra. Aileen O'Connor Sánchez y el Dr. Jorge Santamaría Fernández.

Este trabajo fue financiado por el proyecto fiscal B20 de la Unidad de Biotecnología y por una beca para estudios de maestría (176792) otorgada a Fulgencio Alatorre Cobos por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

### **A MIS PADRES**

Fulgencio Alatorre Neri y Estela Cobos Medina, a quienes debo todo lo que soy.

### **A MIS HERMANOS**

Germán, Eloísa, Román, Clara, Elsa, Aracely, Omar y Jorge.

### **A MIS SOBRINOS**

Gerardo, Ana Laura y Jesús Román.

## AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Aileen O'Connor Sánchez y Jorge Santamaría Fernández por la dirección y asesoría otorgada a este trabajo. Gracias por todo su apoyo y confianza.

A los Doctores Jorge Santamaría Fernández, Aileen O'Connor Sánchez, Juan Manuel De la Fuente Martínez, Blondy Canto Canché y Tomás González Estrada por sus valiosas sugerencias y revisión del presente escrito.

Al Dr. Luis R. Herrera Estrella por aportar las líneas de papaya genéticamente transformadas, material de estudio de esta tesis.

A Francisco Espadas y Gil, Carlos Talavera May, Ileana Borges, Miguel Keb y Fátima Médina por su apoyo durante la realización experimental de este trabajo.

A todos con quienes compartí mi estancia en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Unidad de Biotecnología: Dr. Jorge Santamaría, M. C. Francisco Espadas, M. C. Carlos Talavera, M. C. Anastasio Cortéz, Yolanda Nava, Felipe Santamaría, Susana Cruz, Nelly Estrella y David Uh.

A quienes siempre me brindaron su apoyo desinteresado: Yolanda Nava, Manuela Reyes, Susana Cruz, Laura Sánsores, Daniel Hernández, Miguel Carballo. Gracias por todo.

Al CONACYT y Fundación Telmex, instituciones que me apoyaron económicamente durante mis estudios de maestría.

# CONTENIDO

Reconocimientos.....	i
Agradecimientos.....	iii
Contenido.....	iv
Lista de tablas.....	vi
Lista de figuras.....	vii
Abreviaturas.....	x
Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
<b>Capítulo I. Antecedentes.....</b>	<b>1</b>
1.1 Importancia de la papaya ( <i>Carica papaya</i> L.).....	1
1.2 Justificación y planteamiento del problema.....	3
1.3 Hipótesis general.....	5
1.4 Objetivos.....	5
1.4.1 Objetivo principal.....	5
1.4.2 Objetivos específicos.....	5
1.5 Estrategia experimental general.....	6
1.6 Literatura citada.....	7
<b>Capítulo II. Pruebas de la expresión del gen reportero <i>uidA</i>, presencia del gen <i>gltA</i> y actividad de la enzima citrato sintasa.....</b>	<b>9</b>
2.1 Introducción.....	9
2.2 Materiales y métodos.....	10
2.2.1 Material vegetal.....	10
2.2.2 Detección histoquímica de la actividad del gen GUS.....	12
2.2.3 Prueba de detección del gen <i>gltA</i> mediante análisis de PCR.....	12
2.2.4 Cuantificación de la actividad de la enzima citrato sintasa (CS) en plantas T0.....	14
2.3 Resultados.....	15
2.3.1 Análisis funcional del gen reportero <i>uidA</i> .....	15
2.3.2 Detección del gen <i>gltA</i> .....	17
2.3.3 Cuantificación de la actividad específica de citrato sintasa (CS) total en plantas T0.....	19
2.4 Discusión.....	20
2.5 Conclusiones.....	22
2.6 Literatura citada.....	23

<b>Capítulo III. Regeneración <i>in vitro</i> y crecimiento <i>ex vitro</i> de líneas transformadas genéticamente de papaya con el gen <i>gltA</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>27</b>
3.1 Introducción.....	27
3.1.1 El fósforo y su deficiencia en los suelos agrícolas.....	27
3.1.2 La exudación de ácidos orgánicos y la toma de fósforo en plantas genéticamente transformadas.....	28
3.2 Materiales y método.....	30
3.2.1 Regeneración <i>in vitro</i> .....	30
3.2.2 Aclimatación y establecimiento <i>ex vitro</i> .....	30
3.2.3 Caracterización morfológica.....	31
3.2.4 Capacidad fotosintética.....	31
3.2.5 Cantidad total de fósforo inorgánico acumulado en hojas...	31
3.2.6 Análisis de datos.....	32
3.3 Resultados.....	33
3.3.1 Regeneración <i>in vitro</i> .....	33
3.3.2 Aclimatación de las plantas regeneradas.....	33
3.3.3 Crecimiento de las líneas establecidas <i>ex vitro</i> .....	35
3.3.4 Capacidad fotosintética en líneas establecidas en invernadero.....	43
3.3.5 Acumulación de fósforo en líneas establecidas en invernadero.....	46
3.4 Discusión.....	47
3.5 Conclusiones.....	50
3.6 Literatura citada.....	51
<b>Capítulo IV. Conclusiones generales.....</b>	<b>55</b>
<b>Capítulo V. Discusión general.....</b>	<b>57</b>
5.1 Literatura citada.....	59
<b>Capítulo VI. Perspectivas.....</b>	<b>61</b>
<b>Capítulo VII. Anexos.....</b>	<b>63</b>
7.1 Anexo I. Esquema de los plásmidos utilizados para la transformación genética.....	63
7.2 Anexo II. Método de transformación genética por biobalística empleado en la generación de las líneas transformadas de papaya.....	64

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 2.1</b> Líneas de papaya presuntamente transformadas con el gen <i>gltA</i> de <i>P. aeruginosa</i> .....	11
<b>Tabla 2.2</b> Oligonucleótidos empleados para la amplificación un fragmento del gen <i>gltA</i> mediante PCR.....	14
<b>Tabla 3.1</b> Líneas regeneradas a partir de embriones somáticos secundarios.....	33
<b>Tabla 3.2</b> Parámetros de crecimiento en el lote I al final del período de evaluación (284 días después del trasplante a invernadero).....	38
<b>Tabla 3.3</b> Parámetros de crecimiento en el lote II al final del período de evaluación (192 días después del trasplante a invernadero).....	38

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Estrategia experimental general empleada en este trabajo.....	6
<b>Figura 2.1</b> Detección histoquímica de la expresión del gen <i>uidA</i> (GUS) en callos embriogénicos de papaya.....	15
<b>Figura 2.2</b> Detección histoquímica de la expresión del gen <i>uidA</i> (GUS) en embriones cigóticos (T1) de la cruce C11-35S X control WT.....	16
<b>Figura 2.3</b> Detección del gen <i>gltA</i> mediante amplificación por PCR.....	17
<b>Figura 2.4</b> Amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>gltA</i> , de aproximadamente 230 pb, usando el par II de oligonucleótidos en las 20 líneas de papaya mantenidas <i>in vitro</i> .....	18
<b>Figura 2.5</b> Amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>gltA</i> , de aproximadamente 230 pb, en plantas adultas regeneradas de callos embriogénicos transformados y plántulas T1.....	19
<b>Figura 2.6</b> Actividad específica de la enzima citrato sintasa (CS) en hojas de plantas T0 mantenidas <i>in vitro</i> .....	20
<b>Figura 3.1</b> Protocolo de aclimatación y establecimiento <i>ex vitro</i> de líneas de papaya genéticamente modificadas.....	32
<b>Figura 3.2</b> Proceso de regeneración de las líneas genéticamente modificadas.....	34
<b>Figura 3.3</b> Aspecto de las algunas líneas regeneradas a partir de callos embriogénicos aproximadamente 20 días después del inicio de la aclimatación.....	35
<b>Figura 3.4</b> Crecimiento <i>ex vitro</i> de las líneas genéticamente transformadas C11-35S y C30-100 Ubi, en comparación con el control WT, durante 284 días.....	36

<b>Figura 3.5</b> Crecimiento <i>ex vitro</i> de las líneas genéticamente transformadas C11-35S y C30-100 Ubi, en comparación con el control WT, durante 192 días.....	37
<b>Figura 3.6</b> Producción de biomasa en líneas genéticamente transformadas C11-35S y C30-100 Ubi y control WT después de 284 días de crecimiento <i>ex vitro</i> (lote I).....	40
<b>Figura 3.7</b> Producción de biomasa en líneas genéticamente transformadas C11-35S y C30-100 Ubi y controles C10 (-) y WT después del 222 días de crecimiento <i>ex vitro</i> (lote II).....	40
<b>Figura 3.8</b> Diferencias en el color de pecíolos de hojas de líneas genéticamente modificadas (C11-35S y C30 Ubi) y plantas control (C10 (-) y Control WT).....	41
<b>Figura 3.9</b> Floración y fructificación en línea genéticamente transformada C11-35S.....	42
<b>Figura 3.10</b> A) Patrón diario de intercambio neto de CO <sub>2</sub> en plantas de papaya (controles WT) de 20 días de edad bajo condiciones naturales de luz (PPFD) y temperatura (B).....	44
<b>Figura 3.11</b> Tasa neta de fijación de CO <sub>2</sub> (Pn) y tasa de conductancia estomática (CS) en plantas transformadas genéticamente y no transformadas con el gen <i>gltA</i> y <i>uidA</i> , evaluadas a los 60 días (A) y 90 días (B) de crecimiento en invernadero.....	45
<b>Figura 3.12</b> Acumulación de fósforo inorgánico soluble en hojas de líneas genéticamente transformadas (C11-35S y C30-100 Ubi) y controles negativos (C10 (-) y control WT).....	46
<b>Figura 3.13</b> Relación entre las variables contenido de fósforo inorgánico soluble y peso seco total acumulado en las líneas genéticamente transformadas (C11-35S y C30-100 Ubi) y control WT.....	47

<b>Figura 5.1</b> Esquema hipotético de cambios asociados con la transformación genética de papaya con el gen <i>gltA</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , que codifica para la enzima citrato sintasa.....	58
<b>Figura 7.1</b> Esquema de la construcción del vector p35CITS, conteniendo la secuencia del gen <i>gltA</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> que codifica para citrato sintasa (CS).....	63
<b>Figura 7.2</b> Esquema de la construcción del vector pUBICITS, conteniendo la secuencia del gen <i>gltA</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> que codifica para citrato sintasa (CS).....	63
<b>Figura 7.3</b> Esquema de la construcción del vector pWRG 1515, conteniendo al gen reportero GUS ( <i>uidA</i> ) y el gen para resistencia a higromicina ( <i>hpt</i> ).....	64

## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
BA	Benciladenina
BITC	bencil isotionato
CIBr indigo	dicloro-dibromo indigo
CS	Citrato sintasa
cs	Conductancia estomática
dATP	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
DMSO	Dimetilsulfoxido
DTNB	5'5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico)
dTTP	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
MS	Murashige y Skoog
NADPH	Nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato reducida
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
Pi	Fósforo inorgánico
Pn	Tasa fotosintética neta
psi	Pounds per square inch (libras por pulgada cuadrada)
PSII	Fotosistema II
RuBP	Ribulosa 1,5 bifosfato
PPFD	Photosynthetic photon flux density (densidad de flujo fotónico fotosintético)
SDS	Dodecilsulfato sódico
X-Gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -d-glucuronido

## RESUMEN

La papaya es una especie cuyo consumo en fresco y amplios usos en la medicina tradicional, industria farmacéutica y alimenticia, la sitúan como uno de los frutales más importantes de las zonas tropicales y subtropicales del mundo. No obstante, la productividad de su cultivo en dichas áreas está limitada por estreses abióticos como la deficiencia de fósforo. El fósforo es uno de los tres principales nutrimentos para las plantas, junto con el nitrógeno y el potasio. Sin embargo, la alta capacidad del fósforo para combinarse con ligandos orgánicos e inorgánicos del suelo provoca su fijación en formas no asimilables por las plantas, y se convierte así, en una de las principales limitantes para la productividad agrícola. Las especies vegetales han desarrollado un conjunto de mecanismos adaptativos para enfrentar el estrés por deficiencia de fósforo, los cuales incluyen cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos para mantener la homeostasis interna del nutrimento. Uno de los mecanismos más estudiados por su eficiencia para mejorar la toma de fósforo, a partir de formas insolubles, es la exudación de ácidos orgánicos hacia la rizósfera. Esta estrategia ha sido aprovechada por la ingeniería genética para sobreexpresar algunos genes que participan en las rutas biosintéticas de dichos compuestos, generando plantas genéticamente modificadas que incrementan su toma de fósforo en condiciones limitantes del elemento. Los resultados de la transformación genética de especies como *Arabidopsis*, tabaco, maíz, canola y eucaliptos, con genes que codifican para citrato sintasa, involucrada en la síntesis de citrato, han dado robustez a esta estrategia para producir plantas más eficientes en la toma de fósforo.

En el presente trabajo se analizaron los efectos de la transformación genética con gen *gltA* de *Pseudomonas aeruginosa*, el cual codifica para la enzima citrato sintasa, sobre el crecimiento y fisiología de plantas de papaya modificadas genéticamente con dicho gen. Se partió de líneas de papaya presuntamente transformadas (T0), en estado de callo

embriogénico, generadas mediante biobalística en trabajos previos. La presencia y herencia del gen *gltA* fue detectada en plantas T0, mantenidas *in vitro*, y plantas T0 y T1 establecidas en invernadero. En paralelo, se cuantificó la actividad de la enzima citrato sintasa, encontrando una actividad tres veces superior en dos líneas que contenían al transgen *gltA* (líneas C11-35S y C30-100 Ubi) respecto a controles sin dicho gen. La inducción en la secreción de ácidos orgánicos en especies sin transformar, como arroz, lupinus blanco y algunas de género *Brassica*, se ha calculado representa una inversión del 2-3 % del peso seco de dichas plantas. La hipótesis para plantas genéticamente modificadas para incrementar la exudación de ácidos orgánicos como citrato o malato, es que en tales plantas, el desgaste energético por la exudación podría comprometer de manera notable el crecimiento por la mayor pérdida de carbono, especialmente en plantas con tasas de crecimiento elevado, como papaya. En nuestro trabajo la acumulación de biomasa no disminuyó descartando esta hipótesis. La acumulación de biomasa total y el contenido de fósforo total soluble en las dos líneas genéticamente modificadas, respecto a los controles, fue estadísticamente significativa, al menos en uno de los dos lotes de plantas establecidas en invernadero. La posible pérdida de carbono por exudación de citrato, lo cual no fue cuantificado en este trabajo, puede estar siendo compensada por una mayor fijación de carbono vía fotosíntesis, lo cual se halló en las dos líneas transformadas de papaya analizadas; la tasa fotosintética ( $P_n$ ) fue superior en las primeras etapas de crecimiento *ex vitro* (60 días) en las líneas C11-35S y C30-100 Ubi, en comparación con los controles sin el gen *gltA* codificante para citrato sintasa. Los incrementos en la  $P_n$  pudieran estar correlacionados con la presencia del transgen, al incrementarse la acumulación de fósforo en las plantas que poseen dicho transgen.

## ABSTRACT

Papaya is an important crop in tropical and subtropical areas around the world, being consumed fresh and used in traditional medicine, in addition to being important to the pharmaceutical and food industry. However, papaya is cultivated in soils with phosphorus deficiency, which is a negative factor to papaya production. Phosphorus is an essential nutriment, the second most important nutriment after nitrogen. Its high combination capacity with organic and inorganic ligands in soils causes it to precipitate in insoluble forms and this results in poor phosphorus availability on many agricultural soils. Plants have developed numerous mechanisms to face phosphorus deficiency; these include morphological, biochemical and physiological changes to maintain phosphorus homeostasis. The exudation of organic acids is one of the most studied mechanisms by to improve the phosphorus uptake from insoluble sources. This plant-derived strategy has been used by genetic engineering to overexpress genes involved in the biosynthetic pathways of organic acids. It has been possible to generate genetically modified plants overproducing enzymes such as citrate synthase, malate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxylase and isocitrate synthase. Enhanced organic acid synthesis in plants like arabidopsis and tobacco has been associated with a higher ability to uptake phosphorus. These results provide support for a reproducible strategy for enhancing phosphorus nutrition of crops under phosphorus limiting conditions.

This study was conducted to investigate the effect of genetic transformation with a bacterial synthase gene (*gltA* gene from *Pseudomonas aeruginosa*) on the development and physiology of papaya. Putative transgenic lines of papaya containing a *gltA* gene have been generated previously by particle bombardment. Plant regeneration and micropropagation of these lines were achieved. The presence and inheritance of transgene *gltA* was verified by PCR analysis in plants T0 and T1, respectively. Citrate synthase (CS) activity in transgenic lines was quantified in vitro

plants T0. Transgenic lines C11-35S and C30-100 Ubi containing a *gltA* gene had up to 3-fold levels CS activity than the control analyzed. Organic acids excretion induction occurs in species like rice, white lupinus and some species of *Brassica* genus. Different studies indicate that such organic acids excretion could represent 2-3 % of the total plant biomass. In genetically modified plants overproducing organic acid, these amounts could be higher, representing a problem to plant development in species like papaya. In our study, biomass accumulation in transgenic lines of papaya was not affected by genetic transformation with a bacterial gene coding for citrate synthase. Total biomass accumulation and soluble phosphorus content in leaves were higher in transgenic lines, at least in a lot of plants established in greenhouse. Possible carbon lost by citrate exudation in the transgenic lines of papaya analyzed may be being compensated by a higher net photosynthetic rate. Two transgenic lines, C11-35S and C30-100 Ubi had higher net photosynthetic rates respect to controls without gene *gltA* during first stages of development *ex vitro*. Higher net photosynthetic rate in plants containing gene *gltA* could be associated with a higher phosphorus content found in leaves of transgenic lines.

## Capítulo I. Antecedentes

### 1.1 IMPORTANCIA DE LA PAPAYA (*Carica papaya* L.)

La papaya (*Carica papaya* L.) es el miembro económicamente más importante de la familia Caricaceae y la única especie dentro del género *Carica*. Aunque se continúa discutiendo su centro de origen, se acepta que este se halla comprendido entre el Sur de México y Panamá. Posiblemente, en esta área ocurrió su domesticación por culturas nativas, de ahí se dispersó a la zona del Caribe y el Sureste Asiático en el siglo XVI y, posteriormente, a la India y África (Morton, 1987; Badillo 2002). Actualmente, la papaya se cultiva en más de 50 países tropicales y subtropicales y es una de las frutas con mayor demanda en el mercado internacional (FAO, 2005).

La papaya generalmente se consume en fresco como fruta. Por ser una fuente buena de calcio y excelente de vitaminas A y C, es considerada una de las frutas más nutritivas. Además del fruto, otras partes de la planta son también utilizadas. Las flores y hojas son consumidas y el tallo puede servir para almacenar granos (OGTR, 2003).

En la industria, la papaya se usa para la extracción de enzimas proteolíticas, principalmente papaína; se emplea además en la fabricación de cosméticos, shampoos, graduación de bebidas alcohólicas, gomas de mascar, y en la elaboración de algunos fármacos y en la industria alimenticia como ablandador de carnes. En la medicina tradicional, la papaya tiene diversos usos: los extractos de raíz, por su contenido de BITC, tienen efectos bactericidas y antihelmínticos; en algunos países africanos, se induce el aborto a mujeres en gestación mediante el consumo de frutos inmaduros. En la medicina moderna cada vez existe mayor investigación sobre las propiedades terapéuticas de la papaya. Se ha comprobado por ejemplo, que el jugo de papaya contiene agentes antihipertensivos (Eno *et al.*, 2000), que los extractos de semillas tienen actividad espermaticida (Lohiya *et al.*, 2000; OGTR, 2003) y que el consumo de la fruta puede tener efectos benéficos en pacientes con desórdenes inflamatorios en genitales, intestinos, hígado y ojos (Rakhimov, 2000).

A nivel mundial, la producción de papaya se ha mantenido relativamente estable en los últimos años. En 2004, según datos de la FAO, existían en todo el mundo 365,846 ha sembradas con este cultivo, de las cuales se obtuvo una producción de aproximadamente 6.5 millones de toneladas. Brasil es el mayor productor mundial al aportar el 26 % de la producción total, seguido de México con un 15 %, Nigeria e India con un 12 % y 11 %, respectivamente. En el año 2004 la producción nacional se calculó alrededor de 800 mil toneladas, siendo los principales productores Veracruz, Chiapas, Yucatán, Oaxaca y Tabasco (SAGARPA, 2005).

En México, al igual que en el resto de los países productores, la papaya se cultiva en suelos tropicales y subtropicales, los cuales van desde ligeramente hasta fuertemente ácidos o alcalinos. En estos tipos de suelo, las deficiencias de nutrientes y toxicidades por elementos presentes son las causas principales que limitan la producción agrícola. En el caso particular de papaya, su alta tasa de crecimiento hace necesaria la aplicación de grandes cantidades de fertilizantes para obtener rendimientos óptimos, lo que repercute en un incremento en los costos de producción. Por ejemplo, en Chiapas, el costo de fertilización en este cultivo representa el 21 % del costo total por hectárea, y en otros como en Colima se eleva al 37 %. Esto ha hecho que la fertilización sea una práctica casi nula en el caso de pequeños productores, lo que conlleva a la obtención de rendimientos sumamente bajos (ASERCA, 1999).

Dentro de los nutrimentos esenciales, la disponibilidad del fósforo (P) es un problema tanto en la agricultura intensiva como extensiva en México y en la mayoría de los países desarrollados y en vías de desarrollo. Se sabe, por ejemplo, que para obtener un rendimiento de 6-9 ton ha<sup>-1</sup> de maíz se requiere que el cultivo tome de 30-50 kg de fósforo ha<sup>-1</sup>. No obstante, las aplicaciones de fertilizantes fosfatados deben ser mayores dado que solo el 20 %, o menos, de la cantidad aplicada es tomada por los cultivos y el resto se retiene en el suelo. El fósforo retenido finalmente se pierde de los suelos por procesos de lixiviación y termina en ríos, lagos y estuarios marinos, donde ocasiona la eutroficación e hipoxia de estos cuerpos de agua. Junto a estos problemas ambientales, se estima que las reservas de roca fosfórica (fuente de donde se obtienen los fertilizantes fosfatados) podrían agotarse en 80 años, dado el uso excesivo de fósforo en la

agricultura en los últimos 40 años, durante los cuales las cantidades utilizadas se incrementaron 5 veces (Vance *et al.*, 2003).

Si a esta crisis se le suma el hecho de que los fertilizantes con fósforo son usualmente escasos en los trópicos y subtrópicos del mundo, donde vive la mayor parte de la población mundial, el desarrollo de variedades vegetales más eficientes en la toma de fósforo representa la mejor alternativa para disminuir la cantidad de fertilizantes fosfatados, abatir los costos de producción y reducir los efectos dañinos al ambiente, logrando así una agricultura más sustentable (López-Bucio *et al.*, 2000; Kawazu *et al.*, 2003).

La obtención de plantas de papaya modificadas con el gen de citrato sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* (De la Fuente *et al.*, 1997), que en tabaco confiere una mayor tolerancia a los efectos adversos de la toxicidad por aluminio e incrementa la toma de fósforo de formas insolubles, representa una excelente alternativa para el campo mexicano, donde la papaya es cultivo de enorme importancia económica, y una valiosa fuente de vitamina A, nutrimento sumamente importante y usualmente escaso en los trópicos del mundo entero.

## 1.2 JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En 1997, De la Fuente y colaboradores lograron expresar el gen bacterial *gltA* que codifica a la enzima citrato sintasa de *Pseudomonas aeruginosa*, bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, en plantas de tabaco y papaya. En papaya, la transformación genética fue mediante biobalística, y se obtuvieron líneas genéticamente modificadas que expresaban de dos a tres veces mayor actividad de citrato sintasa respecto al control transformado solo con el vector, y este cambio se asoció con un incremento en la tolerancia al aluminio.

Además del incremento en la síntesis de citrato en el citosol, la expresión del gen *gltA* en las plantas transformadas pudo haber ocasionado ajustes en la tasa de biosíntesis y tráfico de precursores de citrato y subproductos de éste, así como un cambio en el estatus energético total de la planta. Por ejemplo, si se analiza la cantidad reportada de citrato citosólico producido en las plantas transformadas de tabaco, dicha cifra representaría el 86 % del peso fresco total de las

raíces (Rengel, 2002). En la naturaleza, se conocen especies que destinan una parte importante de sus recursos energéticos ante estreses ambientales como la deficiencia de fósforo. Por ejemplo, en arroz, la cantidad de sustancias exudadas durante el estrés representa el 2-3 % del peso seco total de la planta, y en plantas del género *Lupinus* y *Brassica*, la exudación de ácidos orgánicos como malato y citrato significa utilizar hasta el 25 % de los azúcares producidos durante la fotosíntesis (Lynch y Ho, 2005).

En plantas tropicales, con tasas de crecimiento elevadas, y que han sido transformadas genéticamente para sobreproducir ácidos orgánicos, como es el caso de papaya, aún no se ha determinado el efecto de dicha transformación sobre la acumulación de biomasa, capacidad fotosintética y toma de fósforo en suelos alcalinos. Koyama *et al.* (2000), López-Bucio *et al.* (2000) y Takita (1999) coinciden en señalar que existe una correlación positiva entre la característica de sobreproducir ácidos orgánicos y una mayor acumulación de biomasa. Sin embargo, Tesfaye y colaboradores (2001) reportaron que las plantas de alfalfa que sobreexpresaban la enzima malato deshidrogenasa presentaron, durante el primer año de crecimiento en suelos con pH neutro y ligeramente alcalino, menor acumulación de biomasa en comparación con plantas control. Dado que la exudación de ácidos orgánicos involucra una pérdida de carbono para cualquier planta, transformada genéticamente o no, deben ocurrir ajustes entre la pérdida y entrada de este elemento a la planta. Esto cambia el estatus energético de la planta; por una parte la planta pierde materia seca en forma de exudados, pero en condiciones de deficiencia de fósforo, puede incrementar la toma de este elemento, el cual es vital para el balance energético y crecimiento de cualquier organismo. En cultivos agrícolas transformados genéticamente con genes que participan en la biosíntesis de ácidos orgánicos, y que poseen tasas de crecimiento muy elevadas, como papaya, es necesario caracterizar cada línea transgénica producida, dado que cada una de ellas representa un evento de transformación independiente, donde la presencia y expresión de los transgenes puede ser distinta. Por lo tanto, en este trabajo se busca determinar el efecto de la transformación genética de papaya con el gen *gltA*, que codifica la enzima citrato sintasa, sobre la asimilación de CO<sub>2</sub>, la toma de fósforo y el crecimiento de plantas T0, bajo condiciones de invernadero.

### 1.3 HIPÓTESIS GENERAL

La expresión constitutiva de un gen exógeno de citrato sintasa en el genoma de papaya puede ocasionar un incremento en la toma de fósforo y una alteración en el metabolismo del carbono, debida a la sobreproducción de citrato a nivel celular, lo cual a su vez puede ocasionar cambios fisiológicos en los procesos relacionados con fotosíntesis y afectar el crecimiento y la reproducción de las plantas genéticamente modificadas.

### 1.4 OBJETIVOS

#### 1.4.1 Objetivo principal

- ❖ Caracterizar morfológica y fisiológicamente la generación T0 de líneas genéticamente transformadas de papaya que contienen el gen *gltA* de *Pseudomonas aeruginosa* que codifica a la enzima citrato sintasa.

#### 1.4.2 Objetivos específicos

- ❖ Corroborar la presencia del transgen *gltA*, que codifica a la enzima citrato sintasa, y del gen reportero *uidA*, que codifica a la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, en callos embriogénicos de papaya presuntamente transformados.
- ❖ Determinar si existe una relación entre la actividad de la enzima citrato sintasa y la presencia del transgen *gltA*, en condiciones *in vitro*.
- ❖ Evaluar si la inserción del transgen *gltA* en plantas de papaya tiene efectos sobre el crecimiento, asimilación de CO<sub>2</sub> y toma de fósforo.

## 1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL

Para alcanzar los objetivos particulares se diseñaron una serie de actividades a lo largo de este trabajo, las cuales se muestran en la figura 1.1. Durante el cultivo y regeneración *in vitro* de las líneas de papaya se pudo determinar la relación entre la actividad de la enzima citrato sintasa y la presencia del transgen de interés, el gen *gltA*. En las líneas establecidas en invernadero, donde se confirmó nuevamente la presencia del gen *gltA*, se midieron algunos parámetros de crecimiento y fisiológicos, que permitieron establecer diferencias entre plantas genéticamente transformadas y no transformadas.

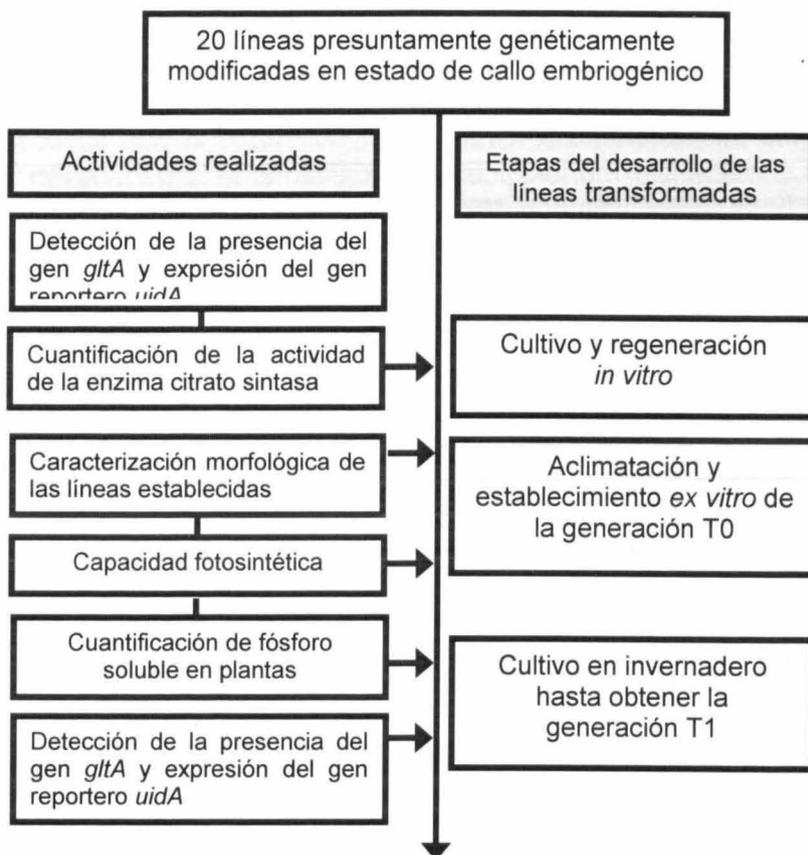


Figura 1.1. Diagrama de flujo del trabajo experimental realizado

## 1.6 LITERATURA CITADA

- ASERCA (1999) Papaya y maíz. Claridades Agropecuarias. No. 67: 1-34.
- Badillo, VM (2002) *Carica L.* vs *Vasconcella St. Hil* (Caricaceae) con la rehabilitación de éste último. *Ernstia* 10:74-79.
- De la Fuente JM, Ramírez-Rodríguez V, Cabrera-Ponce JL and Herrera-Estrella L (1997) Aluminium tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthase. *Science* 276 (6): 1566-1568.
- Eno AE, Owo OI, Itam EH, Konya RS (2000) Blood pressure depression by the fruit juice of *Carica papaya* (L.) in renal and DOCA-induced hypertension in the rat. *Phytother Res J* 14 (4):235-9.
- FAO (2005) Food and Agriculture Organization of the United Nation. Disponible en: [www.fao.org](http://www.fao.org).
- Kawazu T, Susuki Y, Wada T, Kondo K and Koyama H (2003) Overexpression of a plant mitochondrial citrate synthase in *Eucalyptus* trees. *Plant Biology* 2003. Honolulu, Hawaii, USA. Nutrient Biology. Disponible en: <http://abstracts.aspb.org/pb2003/public/P39/0313.html>.
- Koyama H, Kawamura A, Kihara T, Hara T, Takita E, Shibata D (2000) Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. *Plant Cell Physiol* 41(9):1030-1037.
- Lohiya NK, Kothari LK, Manivannan B, Mishra PK, Pathak N (2000) Human sperm immobilization effect of *Carica papaya* seed extracts: an in vitro study. *Asian J Androl* 2(2):103-9.
- Lynch JP, Ho MD (2005) Rhizoeconomics: carbon costs of phosphorus acquisition. *Plant Soil* 269 (1-2): 45-56
- López-Bucio J, Martínez de la Vega O, Guevara-García A and Herrera-Estrella L (2000) Enhanced phosphorus uptake in transgenic

tobacco plants that overproduce citrate. *Nat Biotechnol* 18 (4): 450-453.

Morton J (1987) Papaya. *In: Fruits of warm climates*. Morton J. (Ed.) Miami, EUA. 203 -212.

OGTR (Office of the Gene Technology Regulator) (2003) The biology and ecology of papaya (paw paw), *Carica papaya* L., in Australia. OGTR. Australia. 18 p.

Rakhimov MR (2000) Pharmacological study of papain from the papaya plant cultivated in Uzbekistan. *Eksp Klin Farmakol* 63 (3): 55-57.

Rengel Z (2002) Genetic control of root exudation. *Plant Soil* 245: 59-70.

SAGARPA (2005) Siembras y cosechas perennes 2004. Cultivo Papaya. Disponible en: [www.sagarpa.mx](http://www.sagarpa.mx).

Takita E, Koyama H, Hara T (1999) Organic acid metabolism in aluminum-phosphate utilizing cells of carrots (*Daucus carota* L.) *Plant Cell Physiol* 40: 489-495.

Tesfaye M, Temple SJ, Allan DL, Vance CP, Samac DA (2001) Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminium. *Plant Physiol* 127: 1836-1844.

Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157: 423-447.

## Capítulo II. Pruebas de la expresión del gen reportero *uidA*, presencia del gen *gltA* y actividad de la enzima citrato sintasa

### 2.1 INTRODUCCIÓN

Después de un proceso de transformación genética *in vitro*, independientemente del método usado, suele seguirse un proceso de selección de las clonas presuntamente genéticamente modificadas. El uso de construcciones genéticas generadas *in vitro*, que incluyen tanto un gen de interés como a un gen marcador (marcador genético), ha facilitado la tarea de seleccionar las clonas transformadas, además de proporcionar información sobre la regulación o acción de un gen diferente (Herrera-Estrella *et al.*, 1988).

Los marcadores genéticos desarrollados para usarse en células vegetales en general han sido derivados de fuentes bacterianas o vegetales y pueden ser divididos en dos tipos: marcadores de selección y reporteros. Los marcadores de selección son aquellos que permiten la sobrevivencia y/o replicación solo de las células transformadas, en presencia de antibióticos, herbicidas u otros agentes denominados selectivos. Los genes reporteros codifican productos cuyas actividades enzimáticas pueden ser fácilmente detectables, permitiendo no solo la identificación de los transformantes, sino también la estimación de los niveles de expresión del transgen (Sankara y Rohini, 2004).

Uno de los genes reporteros más comúnmente usados es el gen *uidA* (gen GUS), aislado de *E. coli*, que codifica la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, una hidrolasa ácida que cataliza el rompimiento de varios  $\beta$ -glucurónidos (Jefferson *et al.*, 1986). El método histoquímico para la detección de la actividad del gen GUS ideado por Jefferson (1987) utiliza sustratos cromogénicos tales como el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -d-glucuronido (X-Gluc). Si la expresión del gen *uidA* ocurre en presencia de X-Gluc, la reacción procede a través de un intermediario indolil incoloro inestable, el cual sufre una dimerización oxidativa produciendo un compuesto azul insoluble en agua llamado diclorodibromo indigo (ClBr indigo) (Sankara y Rohini, 2004).

Otra de las técnicas ampliamente usadas para detectar transformantes es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR ("Polymerase Chain Reaction"). Esta técnica se utiliza para sintetizar *in*

*vitro* fragmentos específicos de ADN con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma de un individuo. El método, desarrollado por Kary Mullis en 1985, consiste en el uso de la enzima ADN polimerasa y oligonucleótidos iniciadores específicos para identificar un gen o secuencia de ADN particular, de tal modo que al usarse en una reacción de PCR, bajo condiciones particulares, sintetizarán y replicarán un gran número de copias del segmento respectivo, en caso de encontrar la complementariedad de bases correspondientes (Saiki *et al.*, 1985; Valadez y Kahl, 2000).

En trabajos realizados anteriormente en el Cinvestav Unidad Irapuato, 20 líneas de papaya (*Carica papaya*) presuntamente transformadas con el gen *gltA* de *Pseudomonas aeruginosa*, que codifica para citrato sintasa, fueron obtenidas mediante biobalística. En la presente tesis, con el objetivo de probar si estas líneas eran en efecto genéticamente modificadas y caracterizarlas en condiciones de invernadero se realizó la detección de los transgenes *uidA* (gen reportero) y *gltA* (gen de interés) en los callos embriogénicos (T0) de las 20 líneas presuntamente transformadas y en la generación T1 de una de las líneas. Para la caracterización fisiológica y morfológica *ex vitro* se usaron solo dos de las líneas transformadas genéticamente y dos líneas control.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Material vegetal

Las 20 líneas de callos embriogénicos de papaya presuntamente transformados (tabla 2.1) fueron obtenidas en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato.

El método de transformación genética empleado fue biobalística (ver anexo II para protocolo de transformación usado). Para ello se emplearon los siguientes plásmidos: el plásmido pWRG 1515 que contenía el gen *hpt* y el gen *uidA*, cada uno bajo la regulación del promotor 35S y con el terminador *nos* del gen nopalina sintasa (ver anexo I, figura 6.3); el gen *gltA*, de *Pseudomonas aeruginosa*, que codifica para la enzima citrato sintasa, se incluyó en dos construcciones genéticas: una teniendo como promotor al 35S del Virus del Mosaico de

la Coliflor (p35SCITS, ver anexo I, figura 6.1), y otro bajo el control del promotor UBI1 de la ubiquitina 1 del trigo (pUBICITS ver anexo I, figura 6.2). Precediendo al gen *gltA* en ambos plásmidos, se clonó un intrón, y se usó el terminador de *nos*. Estos dos últimos plásmidos fueron mezclados, por separado, en proporciones equimolares, con el pWRG 1515, y usados para el bombardeo.

**Tabla 2.1** Líneas de papaya presuntamente transformadas con el gen *gltA* de *P. aeruginosa*.

Clave original asignada a cada línea presuntamente transformada	Plásmido usado en el bombardeo*	Clave asignada a cada línea en este trabajo**
1	p35SCITS	C1-35S
016-3-620-B2	-----	016-3-620-B2 (3)
4	pUBICITS	C4-100 Ubi
5	pUBICITS	C5-100 Ubi
6	pUBICITS	C6-100 Ubi
GHY 9 A1	-----	GHY 9 A1 (8)
10	p35SCITS	C10-35S
11	p35SCITS	C11-35S
14	p35SCITS	C14-35S
15	p35SCITS	C15-35S
16	pUBICITS	C16-100 Ubi
17	p35SCITS	C17-35S
18	pUBICITS	C18-100 Ubi
19	pUBICITS	C19-100 Ubi
22	pUBICITS	C22-100 Ubi
23	pUBICITS	C23-100 Ubi
24	pUBICITS	C24-100 Ubi
25	pUBICITS	C25-100 Ubi
27	p35SCITS	C27-35S
30	pUBICITS	C30-100 Ubi

\*El plásmido indicado en la columna se mezcló con el plásmido pWRG 1515

\*\* La letra C y el número que preceden al guión se refieren a la clave original de cada línea; 35S y 100 Ubi indican el promotor usado para dirigir la expresión del gen *gltA* en cada línea.

## 2.2.2 Detección histoquímica de la actividad del gen GUS

Para la detección de la expresión del gen reportero GUS en las 20 líneas en estado de callo embriogénico se empleó el método histoquímico de Jefferson (1987).

Primero se seleccionaron callos en crecimiento que no presentaran áreas necrosadas o fenolizadas para evitar falsos negativos. La selección de los callos se realizó utilizando un microscopio estereoscópico. Posteriormente, los callos seleccionados fueron colocados en una placa multipozos. Como controles negativos se utilizaron callos de plantas micropropagadas sin transformar. Para la detección del patrón de expresión de GUS, se agregaron 150  $\mu\text{l}$  de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 5.0 por pozo de la placa, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se desechó el buffer. Posteriormente, se añadieron 150  $\mu\text{l}$  de buffer de fosfatos conteniendo 1  $\mu\text{l ml}^{-1}$  de X-Gluc (0.005 g de X-Gluc se disolvieron previamente en 100  $\mu\text{l}$  de NN-dimetilformamida). La placa se sometió al vacío por 10 minutos para posteriormente incubarla a 37 °C, en oscuridad total, por 15 horas. Después de este tiempo, las muestras fueron revisadas al microscopio estereoscópico para visualizar las zonas azules.

La extracción de embriones cigóticos de la generación T1 se realizó usando el protocolo de Wakui *et al.* (2004); el proceso histoquímico para la detección de GUS en los embriones se realizó de la misma manera que se explicó para callos T0. Tanto para los callos embriogénicos T0, como para los embriones cigóticos T1, las pruebas funcionales de GUS se realizaron por duplicado. Las imágenes se obtuvieron usando una cámara digital NIKON Coolpix 990, acoplada a un microscopio estereoscópico Zeiss Stemi SVII, en condiciones estándar para todas las muestras de luz fría, filtros de corrección para luz azul y una temperatura color de aproximadamente 5000 °K.

## 2.2.3 Prueba de detección del gen *gltA* mediante análisis de PCR

La detección del transgen de interés, el gen *gltA* que codifica para la enzima citrato sintasa, se realizó mediante análisis de PCR. La detección se realizó en callos embriogénicos; posteriormente, la presencia del transgen se confirmó en plantas adultas regeneradas a partir de dichos callos, y en la progenie T1 de la cruce realizada entre la línea C11-35S x control WT.

La extracción de ADN para los análisis de PCR se hizo en callos y hojas de T0, y en hojas de plantas T1, empleando el protocolo estándar de Sambrook *et al.* (1999), con modificaciones hechas por Martínez *et al.* (2003). La extracción se realizó usando un buffer que contenía 10 M de urea, 0.6 M de NaCl, 100 mM de Tris pH 7.5, 40 mM de EDTA, 4 % SDS y 4.8 % de fenol estabilizado, y una mezcla de fenol estabilizado: cloroformo: alcohol isoamílico, en proporción 25:24:1. La precipitación del ADN se realizó usando alcohol etílico absoluto. La calidad de las extracciones se visualizó mediante electroforesis de geles de agarosa al 0.8 %, teñidos con bromuro de etidio, corridos a 80 volts. La cantidad de ADN fue estimada usando un espectrofotómetro Beckman DU-600, leyendo a una longitud de onda de 260 nm. La pureza de los ácidos nucleicos fue calculada con base a la relación entre las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm ( $DO_{260/280}$ ).

Para los análisis de PCR se probaron dos pares de oligonucleótidos específicos, diseñados previamente por O'Connor (2002). El par I amplificaba un fragmento de 513 pb, y el par II un fragmento de 230 pb (Tabla 2.2).

Inicialmente, ambos pares de oligonucleótidos se probaron en los controles positivos (ADN plasmídico de p35SCITS y pUBICITS, a una concentración final de  $4 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ). En todas las reacciones se empleó el kit PCR SuperMix, de Invitrogen, cuyos componentes son: 22 mM Tris-HCl (pH 8.4), 55 mM KCl, 1.65 mM  $\text{MgCl}_2$ , 220  $\mu\text{M}$  dGTP, 220  $\mu\text{M}$  dATP, 220  $\mu\text{M}$  dTTP, 220  $\mu\text{M}$  dCTP, 22 U ADN polimerasa *Taq* recombinante/ml y estabilizadores. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 15  $\mu\text{l}$ ; 12  $\mu\text{l}$  correspondían al PCR Supermix, 1.5  $\mu\text{l}$  al ADN templado a ( $200 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ), 1.5  $\mu\text{l}$  al par de oligonucleótidos (cada uno a una concentración final de 0.5  $\mu\text{M}$ ). El programa para PCR usado fue el siguiente: desnaturalización previa (94 °C por 3 min); desnaturalización (94 °C por 1 min), alineamiento (55 °C por 1 min), extensión (72 °C por 30 s) 30 ciclos; extensión adicional (72 °C por 10 min).

**Tabla 2.2** Oligonucleótidos empleados para la amplificación de un fragmento del gen *gltA* mediante PCR.

	Secuencia
Par I (513 pb)	
Oligonucleótido 1 ("Forward")	5' GCGCCAAGGTCATGA AGCAGACC 3'
Oligonucleótido 2 ("Reverse")	5' GTC GACGCGCCGCTGAACACC 3'
Par II (230 pb)	
Oligonucleótido 3 ("Forward")	5' CGCCCGCCACGACCCCTACTT3'
Oligonucleótido 4 ("Reverse")	5' CGGTGA AGTCGCGCTGGGTGTGG 3'

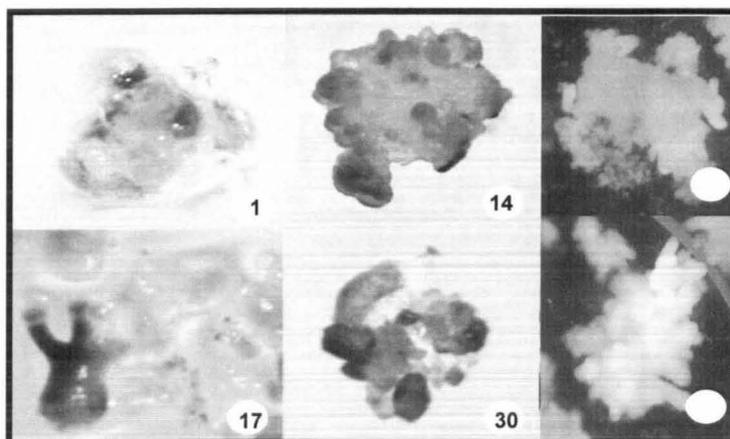
#### **2.2.4 Cuantificación de la actividad de la enzima citrato sintasa (CS) en plantas T0**

La actividad de CS se cuantificó mediante el método espectrofotométrico reportado por Srere (1967). Para lo anterior, se tomaron muestras (0.2 g) de hojas de plantas *in vitro*, las cuales se maceraron con nitrógeno líquido y buffer TBE 1X, y se centrifugaron a 13 000 rpm por 10 min, a 4 °C. El sobrenadante crudo recuperado se utilizó para cuantificar proteínas totales solubles por el método de Bradford (1976). Para medir actividad de CS se utilizó 1 µg de proteína soluble total, 10 mM de Acetil-coenzima A, 10 mM de DTNB, 10 mM de oxalacetato, en un volumen final de 1 ml. La producción del ión mercáptido, equimolar a la producción total de citrato, se cuantificó a 412 nm, durante un curso temporal de 1.5 min.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Análisis funcional del gen reportero *uidA*

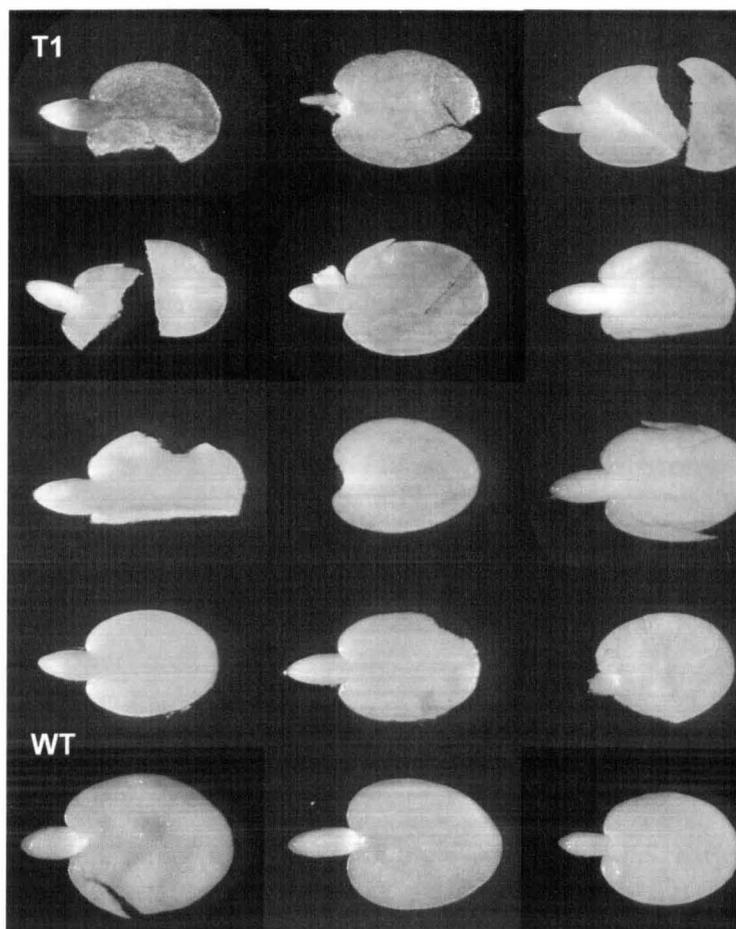
De las 20 líneas que presuntamente contenían el gen reportero *uidA*, contenido en el plásmido pWRG 1515, solo en cuatro se pudo observar el compuesto azul índigo, producto de la reacción de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa con el reactivo X-Gluc. En la figura 2.1 se muestran callos embriogénicos y embriones somáticos teñidos de las cuatro líneas donde se detectó la expresión del gen *gus*. Mediante este método no se detectó actividad endógena de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa en los controles negativos usados.



**Figura 2.1** Detección histoquímica de la expresión del gen reportero *uidA* (GUS) en callos embriogénicos de papaya. El número inferior derecho indica el número asignado a cada línea.

La herencia del gen reportero GUS de transformantes T0, regenerados a partir de callos embriogénicos, a la generación T1 se pudo corroborar mediante el análisis funcional de la expresión de dicho gen en embriones cigóticos. Estos embriones provenían de semillas obtenidas después de realizar cruza controladas entre la línea C11-35S y el control WT. La actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa fue evidente en las hojas cotiledonales de los embriones y en la zona de

elongación del hipocótilo, pero no en los ápices (figura 2.2). proporción de embriones cigóticos positivos, respecto a los que presentaron la actividad fue 1:1.

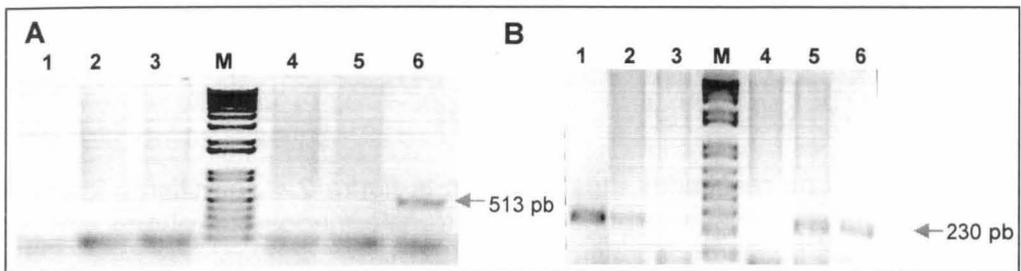


**Figura 2.2** Detección histoquímica de la expresión del gen *uidA* (G) en embriones cigóticos (T1) de la cruce C11-35S X control WT. controles negativos (WT) se muestran en la última fila de la figura.

### 2.3.2 Detección del gen *gltA*

Los dos pares de oligonucleótidos se probaron primero en los controles positivos (ADN plasmídico), y algunas líneas. Con el par I de oligonucleótidos se logró amplificar un fragmento del gen *gltA* del tamaño esperado, de aproximadamente 513 pb, en el control positivo p35SCITS, pero no en pUBICITS, control WT ni las tres líneas probadas (C11-35S, C16-100 Ubi y C30-100 Ubi) (figura 2.3 A).

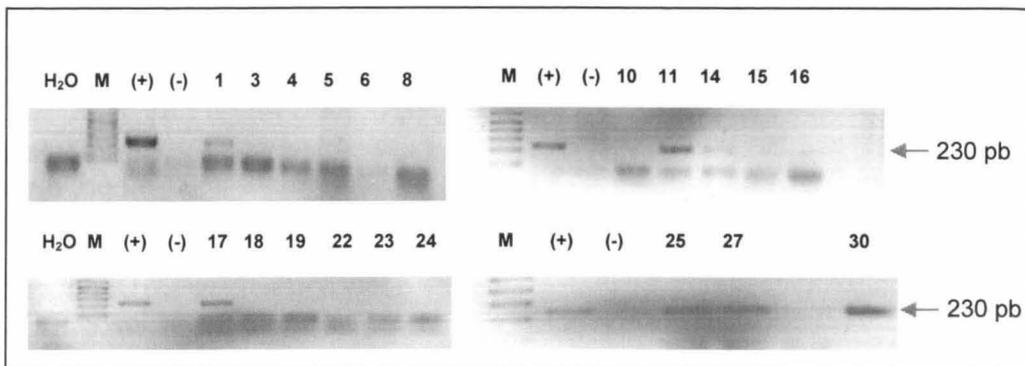
Con el par II de iniciadores hubo amplificación de un fragmento del gen *gltA* del tamaño esperado, de aproximadamente 230 pb, en los dos controles positivos (p35SCITS y pUBICITS), así como en las líneas C11-35S y C30-100 Ubi. No hubo amplificación en el control negativo (control WT) ni en la línea C16-100 Ubi (figura 2.3 B). Dado estos resultados se optó por utilizar este par de oligonucleótidos para los análisis por PCR en las 20 líneas mantenidas *in vitro*.



**Figura 2.3** Detección del gen *gltA* mediante amplificación por PCR.

A) Usando el par I de oligonucleótidos: 1= pUBICITS; 2 = C11-35S; 3 = control negativo WT; 4 = C16-100 Ubi; 5 = C30-100 Ubi; 6 = p35SCITS.  
B) Usando el par II de oligonucleótidos: 1 = p35SCITS; 2 = C11-35S; 3 = control negativo WT; 4 = C16-100 Ubi; 5 = C30-100 Ubi; 6= pUBICITS. M = Marcador 1Kb

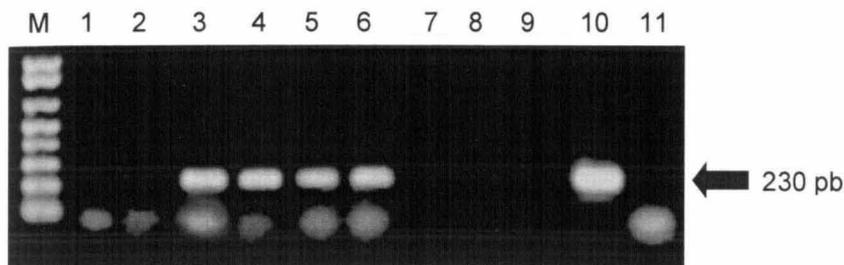
Solo en 7 de las 20 líneas mantenidas *in vitro* se pudo amplificar el fragmento de 230 pb, que indica la presencia del transgen *gltA*. Las líneas que contienen al transgen *gltA* son la 1, 11, 14, 17, 25, 27 y 30 (figura 2.4).



**Figura 2.4** Amplificación por PCR de un fragmento del gen *gltA*, de aproximadamente 230 pb, usando el par II de oligonucleótidos en las 20 líneas de papaya mantenidas *in vitro*. El número arriba de cada carril corresponde a la línea analizada. M = Marcador de peso molecular de 1 Kb.; (+) = p35SCITS; (-) = Control WT.

Los resultados mostrados en la figura 2.4 permitieron identificar las líneas de callos embriogénicos transformados con el gen *gltA*. Dos de estas líneas genéticamente transformadas pudieron ser regeneradas *in vitro* y establecidas en condiciones de invernadero: C11-35S y C30-100 Ubi. Como línea control negativa se utilizó la línea C10-35S en la cual no se detectaron los transgenes *gltA* y *uidA*.

Una vez establecidas las tres líneas en invernadero, se confirmó nuevamente la presencia del gen *gltA* al amplificar por PCR un fragmento de dicho gen de aproximadamente 230 pb (figura 2.5). La detección de este transgen también se realizó en plántulas T1 que provenían de la cruce por polinización artificial entre la línea C11-35S y el control WT (figura 2.5 carril 4 y 5).

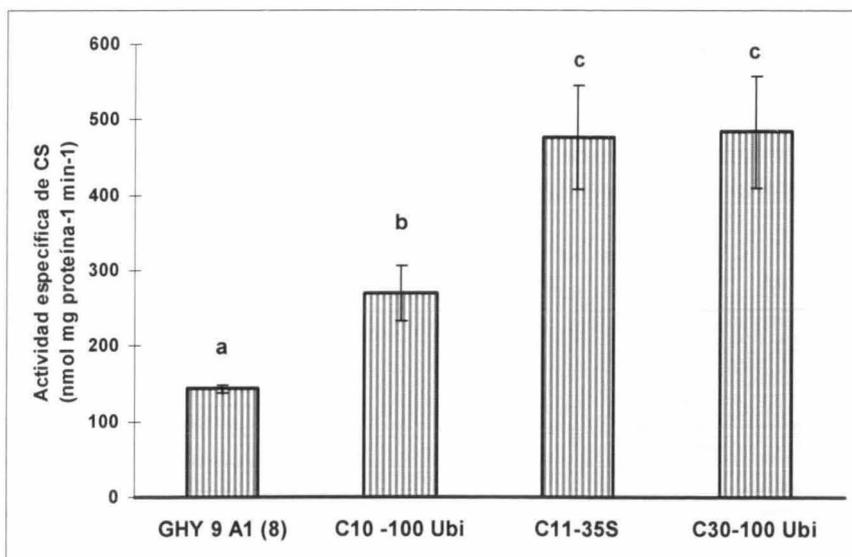


**Figura 2.5** Amplificación por PCR de un fragmento del gen *gltA*, de aproximadamente 230 pb, en plantas adultas regeneradas de callos embriogénicos transformados y plántulas T1. MP = Marcador de peso molecular de 1Kb. Carriles 1 = Control WT; 2 = C10-35 Ubi; 3 = C11-35S; 4 y 5 = plántula T1 (C11-35S x Control WT); 6 = C30-100 Ubi; 7-9 = carriles vacíos; 10 = p35CITS; 11= agua.

### 2.3.3 Cuantificación de la actividad específica de citrato sintasa (CS) total en plantas T0

La actividad específica de la enzima CS en hojas de plantas T0, mantenidas *in vitro*, fue superior en las dos líneas transformadas genéticamente analizadas, C11-35S y C30-100 Ubi, en comparación con las dos líneas que no contenían al transgen *gltA* (figura 2.6).

La actividad específica de CS en la línea C11-35S ( $476.17 \pm 69.22$  nmol mg proteína<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) y C30-100 Ubi ( $483.91 \pm 36.30$  nmol mg proteína<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) fue 3.3 veces superior respecto a la hallada en la línea GHY 9 A1 (8) transformada solo con el pDP620 ( $143.39 \pm 4.96$  nmol mg proteína<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>), y 1.8 veces mayor en comparación con la línea C10-100 Ubi ( $269.09 \pm 36.30$  nmol mg proteína<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>), donde no se detectó la presencia del gen *gltA* mediante PCR.



**Figura 2.6** Actividad específica de la enzima citrato sintasa (CS) en hojas de plantas T0 mantenidas *in vitro*. Las barras representan el promedio de dos replicas, y la letra sobre cada una de ellas indica diferencia estadística significativa ( $\alpha= 0.05$ ).

## 2.4 DISCUSIÓN

El bajo número de líneas encontradas que contenían los dos transgenes analizados, *uidA* y *gltA*, parece ser resultado de una baja presión de selección durante el cultivo *in vitro*. No existen reportes previos a este trabajo de actividad endógena tipo  $\beta$ -glucuronidasa en papaya, lo cual coincide con nuestros resultados donde no se detectó la actividad de dicha enzima en callos que provenían del plantas micropropagadas de papaya (control WT).

A pesar que se ha demostrado que el silenciamiento de transgenes depende principalmente de la estructura del ARN formado por el gen introducido, más que por el método de transformación (Grant, 1999; Vaucheret *et al.*, 1998; Fagard y Vaucheret, 2000), no se descarta que la construcción genética que contenía al gen reportero *uidA* haya sufrido rearrreglos, la ocurrencia de inserciones múltiples en algunas de

las líneas obtenidas, la influencia del genoma receptor, o el sitio o vecindad dentro del genoma donde ocurrió la inserción impidan la expresión del gen reportero (Yin *et al.*, 2004). La ausencia de expresión del gen *uidA* por inserciones múltiples se ha demostrado en trabajos de transformación genética en especies como petunia (Linn *et al.*, 1990) y *Lolium perenne* (van der Maas *et al.*, 1994).

El patrón de teñido azul distinto dentro del mismo tejido de los callos embriogénicos donde se observó la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa pudiera sugerir la existencia de quimeras; sin embargo, esto pudiera descartarse al corroborarse la herencia y una expresión del gen reportero en embriones cigóticos T1, para al menos una de las líneas. Lo que sí es posible es un efecto del sitio de inserción, o bien, una disminución de la actividad del transgen dentro del mismo tejido y a lo largo del tiempo de subcultivos. Aquí cabe recordar que los callos embriogénicos de todas las líneas analizadas llevan más de 7 años de haber sido producidos. Se ha demostrado, para el caso particular del gen *uidA*, que éste puede disminuir su expresión o incluso ser suprimido a lo largo del tiempo (van der Maas *et al.*, 1994), y que a pesar que el promotor es un factor que influencia el nivel y estabilidad del transgen (McCabe *et al.*, 1999), los niveles de expresión del gen *uidA* puede variar incluso dentro de una misma planta, sin importar el tipo de promotor utilizado (Kamo, 2003).

Por otra parte, la integración del transgen de interés, el gen *gltA*, solo se detectó en el 35 % de las líneas analizadas (7 de 20). Sin embargo, se desconoce la frecuencia de rearrreglos que sufren los transgenes en esta especie; esto podría explicar por qué tres de las líneas resultaron positivas por PCR y negativas en la prueba de GUS.

Respecto a la actividad de la enzima citrato sintasa, ésta fue tres veces superior en las líneas transformadas con el gen *gltA*, en comparación con los dos controles negativos empleados. Estos resultados coinciden con los reportados por De la Fuente *et al.* (1997), los cuales demuestran que la transferencia del gen *gltA* a plantas de tabaco incrementa de dos a tres veces los niveles de CS respecto a controles sin transformar. Takita y colaboradores, en 1999, hallaron que la actividad de citrato sintasa mitocondrial estaba 1.5 veces por arriba de los controles en células que sobreexpresaban dicha enzima. En el año 2000, Koyama y colaboradores reportaron que esta misma enzima al sobreexpresarse en *Arabidopsis* aumentaba su actividad tres veces

más en comparación con controles negativos. En este mismo año, una vez más se demostró que el gen *gltA* de *Pseudomonas aeruginosa* podía incrementar 2.6 los niveles de citrato sintasa en tabaco (López-Bucio *et al.*, 2000). Sin embargo, en 2001, Delhaize y su grupo de trabajo no hallaron diferencias significativas entre la actividad total de CS entre plantas de tabaco transformadas con el gen *gltA* y plantas no modificadas genéticamente. Estos resultados contrastan con todos los anteriores y parecen ser un caso particular, pues en 2003, Anoop y colaboradores demostraron nuevamente que la sobreexpresión de la enzima citrato sintasa mitocondrial en canola podía elevar los niveles totales de CS hasta 4 veces, respecto a controles sin transformar. No obstante, se ha demostrado que existe una correlación positiva entre el incremento de la actividad de CS, el contenido intracelular de citrato y la exudación de citrato en plantas que sobreexpresan la enzima citrato sintasa (De la Fuente *et al.*, 1997; Koyama *et al.*, 2000; López-Bucio *et al.*, 2000), éstos dos últimos parámetros pudieran estar influenciados por otro tipo de factores como lo señalan Delhaize *et al.* (2001 y 2003) y Anoop *et al.* (2003).

## 2.5 CONCLUSIONES

- ❖ Los análisis funcionales para el gen *uidA* indican que dicho gen puede mantener su expresión estable en las líneas estudiadas y es capaz de heredarse a las generaciones siguientes.
- ❖ La integración del gen de interés, gen *gltA*, al igual que la del gen reportero *uidA*, solo es detectable mediante el protocolo usado en algunas líneas de papaya. En el caso analizado, ambos transgenes, *uidA* y *gltA*, se heredan a la generación siguiente de transformantes, y la presencia de *gltA* coincide con un incremento en la actividad de citrato sintasa.

## 2.6 LITERATURA CITADA

- Anoop VM, Basu U, McCammon MT, McAlister-Henn L and Taylor GJ (2003) Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol* 132: 2205–2217.
- Delhaize E, Hebb DM, Ryan PR (2001) Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol* 125: 2059-2067.
- Delhaize E, Ryan PR, Hocking PJ and Richardson AE (2003) Effects of altered citrate synthase and isocitrate dehydrogenase expression on internal citrate concentrations and citrate efflux from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) roots. *Plant Soil* 212: 465-471.
- De la Fuente JM, Ramírez-Rodríguez V, Cabrera-Ponce JL and Herrera-Estrella L (1997) Aluminium tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthase. *Science* 276 (6): 1566-1568.
- Fagard M and Vaucheret H (2000) (Trans) Gene silencing in plants: how many mechanisms? *Annu Rev Plant Physiol* 51: 167-194.
- Grant SR (1999) Dissecting the mechanisms in posttranscriptional gene silencing: divide and conquer. *Cell* 96: 303-306.
- Herrera-Estrella L, Teemu H T, Simpson J (1988) Use of reporter genes to study gene expression in plant cells. *In: Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Bélgica. 1-22.
- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D (1987)  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8447-8451.
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the Gus gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5: 387-405

- Kamo KK (2003) Long-term expression of the *uidA* gene in *Gladiolus* plants under control of either the ubiquitin, rolD, mannopine synthase, or cauliflower mosaic virus promoters following three seasons of dormancy. *Plant Cell Rep* 21: 797-803.
- Koyama H, Kawamura A, Kihara T, Hara T, Takita E, Shibata D (2000) Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. *Plant Cell Physiol* 41(9): 1030-1037.
- Lynn F, Heidmann I, Saedler H, Meyer P (1990) Epigenetic changes in the expression of the maize *A1* gene in *Petunia hybrida*: role of numbers of integrated gene copies and state of methylation. *Mol Gen Genet* 222: 329-336.
- López-Bucio J, Martínez de la Vega O, Guevara-García A and Herrera-Estrella L (2000) Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nat Biotechnol* 18 (4):450-453.
- Martínez-Hernández A, Burgeff D C, O'Connor S A, Lara R J (2003) Fundamentos de las técnicas básicas de biología molecular. Programa de Educación Continúa Ago-Sept 2003. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, México. 31 p.
- McCabe MS, Schepers F, van der Arend A, Mohapatra U, de Laat AMM, Power JB and Davey MR (1999) Increased stable inheritance of herbicide resistance in transgenic lettuce carrying a *petE* promoter-bar gene compared with a CaMV 35S-bar gene. *Theor Appl Genet* 99: 587-592.
- O'Connor Sánchez IA (2002) Transformación genética de líneas tropicales y subtropicales de maíz y obtención de maíz transgénico tolerante a la toxicidad por aluminio. Tesis doctoral. CINVESTAV – Unidad Irapuato, México. 96 p.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 23: 1350-1354.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: laboratory manual. 2a. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. Nueva York, EUA. 840 p.
- Sankara K, Rohini, VK (2004) Plant transformation and genetic markers. Institute of Science. Bangalore, India Disponible en: [www.fbae.org/Channels/tools\\_in\\_biotechnology/plant\\_transformation\\_genetic.htm](http://www.fbae.org/Channels/tools_in_biotechnology/plant_transformation_genetic.htm).
- Srere PA (1967) Citrate synthase. Methods Enzymol 13: 3-11.
- Takita E, Koyama H, Shirano Y, Shibata D and Hara T (1999) Structure and expression of the mitochondrial citrate synthase gene in carrot cells utilizing Al-Phosphate. Soil Sci Plant Nutr 45 (1): 197-205.
- Van de Maas HM, de Jong ER, Rueb S, Hensgens LAM and Krens FA (1994) Stable transformation and long-term expression of the gusA reporter gene in callus lines of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) Plant Mol Biol 24: 401-405.
- Valadez-Moctezuma E, Kahl G (2000) Huellas de ADN en genomas de plantas. Mundi-Prensa-UACH. México, D.F. 39-43.
- Vaucheret H, Béclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Gordon C, Morel JB, Mourrain P, Palauqui JC and Vernhettes S (1998) Transgene-induced gene silencing in plants. Plant J 16 (6): 651-659.
- Yin Z, Placer W and Malepszy S (2004) Transgene inheritance in plants. J Appl Genet 45 (2): 127-144.



## Capítulo III. Regeneración *in vitro* y crecimiento *ex vitro* de líneas transformadas genéticamente de papaya con el gen *gltA* de *Pseudomonas aeruginosa*

### 3.1 INTRODUCCIÓN

#### 3.1.1 El fósforo y su deficiencia en los suelos agrícolas

El fósforo (P) es vital para el crecimiento y reproducción vegetal; es el segundo nutrimento más importante para las plantas, después del nitrógeno. Su alta capacidad para combinarse eficientemente con diversos ligandos del suelo hacen que 67 % de la superficie agrícola mundial contenga niveles muy bajos de fósforo disponible (Carmak, 2002). En los suelos ácidos, el P forma complejos escasamente solubles con el aluminio y el hierro, y en suelos alcalinos con el calcio y el magnesio (Marschner, 1995), representando esto una limitante para la producción agrícola del mundo.

El fósforo está involucrado en el almacenamiento y transferencia de energía, en fotosíntesis, en la transformación de azúcares y almidón, y es un componente estructural de las moléculas de ADN y ARN. En el aparato fotosintético, el P tiene una función regulatoria en la biosíntesis de almidón y sacarosa, funciona además como metabolito en los productos intermediarios fosforilados del Ciclo de Calvin, y tiene un papel fundamental en la disponibilidad de energía (ATP y NADPH). Su deficiencia afecta la distribución de la materia seca, disminuye la tasa fotosintética y afecta negativamente el crecimiento (Fujita *et al.*, 2003), tanto en plantas C3 como C4 (Jacob y Lawlor, 1992).

En alfalfa se ha demostrado que la limitación de P no afecta el transporte de electrones en el fotosistema II (PSII), sino más bien tiene efectos en pasos bioquímicos durante la fotosíntesis (Teixeira-Gomes *et al.*, 2003). La disminución de la tasa fotosintética, consecuencia de la deficiencia de P, parece estar estrechamente relacionada con la disminución de Pi libre, lo cual afecta la tasa de exportación de triosas-fosfatos del cloroplasto al citoplasma, lugar de síntesis de los azúcares. Se afecta además la formación de moléculas acumuladoras de energía (ATP y NADPH), la regeneración de la RuBP y la actividad de la rubisco, una de las dos enzimas en la naturaleza encargadas de fijar el CO<sub>2</sub> en las plantas (Swada *et al.*, 1992).

Bajo la deficiencia de fósforo, existe evidencia de que las plantas monocotiledóneas modifican la rizósfera en la mayoría de los suelos con el objetivo de incrementar la toma de P a partir de formas insolubles. Las modificaciones pueden incluir cambios en la longitud y densidad de las raíces y pelos radicales, liberación de fosfatasas, asociación con hongos micorrízicos, y exudación de ácidos orgánicos y  $H^+$  para solubilizar fósforo inorgánico (Jones, 1998; Ryan *et al.*, 2001).

### **3.1.2 La exudación de ácidos orgánicos y la toma de fósforo en plantas genéticamente transformadas**

Debido a su alta afinidad por cationes divalentes y trivalentes, el citrato y otros ácidos orgánicos como el malato pueden desplazar al fósforo (P) de complejos insolubles, haciéndolo más disponible para las plantas (Jones, 1998). De hecho, se ha estimado que la exudación de citrato puede llegar a incrementar de dos a tres veces la concentración de fósforo soluble en la rizósfera (Zhang *et al.*, 1997).

Esta estrategia eficiente para aumentar la toma de P ha sido tomada en cuenta en trabajos de ingeniería genética para sobreexpresar que genes que codifican para enzimas como citrato sintasa, malato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa, las cuales intervienen en la ruta de biosíntesis de ácidos orgánicos. A pesar de que el objetivo del trabajo reportado por De la Fuente y colaboradores, en 1997, fue incrementar la exudación de citrato en tabaco y papaya para aminorar la toxicidad por aluminio, sus resultados constituyeron la primera demostración fehaciente de que era posible incrementar la producción y exudación de ácidos orgánicos en plantas genéticamente transformadas. Posteriormente, Takita y su grupo de trabajo (1999) reportaron que la sobreexpresión de la enzima citrato sintasa mitocondrial en líneas celulares de zanahoria estaba relacionada directamente con una mayor toma de P, y que esto repercutía en mayores tasas de crecimiento. Por su parte, Koyama y col. (2000) lograron sobreexpresar la misma enzima pero ahora utilizando plantas de *Arabidopsis thaliana*, y confirmaron nuevamente que una mayor actividad de citrato sintasa estaba estrechamente relacionada con un incremento en la acumulación de fósforo. Un año más tarde, Tesfaye y colaboradores trabajando con plantas de *Medicago sativa* transformadas con el gen que codifica para malato deshidrogenasa encontraron que, en suelos ácidos y solución hidropónica, las líneas

transformadas no solo tenían una mayor tolerancia al aluminio sino mejoraban su contenido de fósforo 1.6 veces con respecto a las líneas no transformadas.

Existen pocos trabajos sobre el comportamiento de plantas genéticamente transformadas que sobreexpresan las enzimas citrato sintasa o malato deshidrogenasa en suelos alcalinos. Una de las evaluaciones reportas fue hecha por López-Bucio y colaboradores en el año 2000, quienes cuantificaron el incremento de la toma de fósforo en plantas de tabaco modificadas genéticamente que sobreproducen citrato en condiciones artificiales limitantes de fósforo y suelo alcalino. Ellos encontraron que las líneas genéticamente transformadas eran altamente eficientes para obtener fosfatos a partir de fuentes insolubles como compuestos de calcio y fósforo, y ello traía como consecuencia una mayor cantidad de biomasa y un menor requerimiento de fertilizantes fosfatados para lograr un crecimiento óptimo. En plantas silvestres no micorrízicas, la exudación de ácidos orgánicos puede ser estimulada por la deficiencia de fósforo. Esta respuesta permite la sobrevivencia de las plantas bajo el estrés, pero también involucra un mayor desgaste energético; por ejemplo, algunas plantas destinan cerca del 25 % de sus fotosintatos para la producción de ácidos orgánicos que serán exudados a la rizósfera, y otras especies llegan a perder hasta el 3 % de la biomasa total de su sistema radical (Lynch y Ho, 2005). En plantas transformadas genéticamente donde se ha logrado la sobreexpresión de genes involucrados en la biosíntesis de ácidos orgánicos se puede estar afectando el balance de carbono en la planta. En plantas de tabaco transformadas con el gen de citrato sintasa se ha reportado un incremento en la ganancia de biomasa total (López-Bucio *et al.*, 2000). En contraste, en alfalfa transformada con el gen de malato deshidrogenasa, las plantas mostraron menor crecimiento cuando crecieron en un suelo con pH neutro y ligeramente alcalino (Tefaye *et al.*, 2001).

En cultivos tropicales con tasas de crecimiento elevadas, como papaya, el efecto de la transformación genética con genes involucrados en la biosíntesis de ácidos orgánicos sobre el crecimiento de las plantas aún no ha sido evaluado. Por lo tanto, en esta segunda parte del trabajo, se tuvo como objetivo evaluar el efecto de la transformación genética con un gen bacteriano que codifica la enzima citrato sintasa sobre el crecimiento *ex vitro*, capacidad fotosintética y toma de fósforo de las líneas de papaya transformadas genéticamente.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODO

### 3.2.1 Regeneración *in vitro*

Se partió de 20 líneas de papaya presuntamente transformadas genéticamente, derivadas de eventos de transformación independientes mediante biobalística (tabla 2.1). Estas líneas fueron generadas por el grupo del Dr. Luis Herrera Estrella, del Cinvestav, Unidad Irapuato, México, y su obtención fue reportada por De la Fuente y colaboradores en 1997.

Para la regeneración de las líneas se utilizó el método de Cabrera *et al.* (2000), con modificaciones en la etapa de crecimiento y enraizamiento. Para inducir la embriogénesis somática secundaria se utilizó un medio semisólido con 2.16 g l<sup>-1</sup> de sales Murashige y Skoog (1962), mio-inositol 2.5 g l<sup>-1</sup>, glicina 0.1 g l<sup>-1</sup>, piridoxina-HCl 0.025 g l<sup>-1</sup>, ácido nicotínico 0.025 g l<sup>-1</sup>, tiamina-HCl 0.005 g l<sup>-1</sup>, glutamina 0.4 g l<sup>-1</sup>, 2, 4-D 10 mg l<sup>-1</sup>, sacarosa 6 % y agar al 0.8 %. El pH del medio se ajustó a 5.8. Los subcultivos se realizaron cada 30 días. Todas las líneas se mantuvieron en completa oscuridad, a 25 °C, hasta la obtención de embriones somáticos completamente desarrollados (estado cotiledonal). Para la germinación de los embriones somáticos maduros, éstos se cultivaron bajo luz artificial (40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), fotoperiodo 16 x 8 h, 25 °C, en un medio semisólido con 4.31 g l<sup>-1</sup> de sales MS (1962), benciladenina (BA) 0.2 mg l<sup>-1</sup>, cinetina 0.1 mg l<sup>-1</sup>, sacarosa 3 %, gelrite 0.025 % y pH 5.7. El crecimiento y enraizamiento de las plántulas obtenidas se realizó en un medio con 4.31 g l<sup>-1</sup> de sales Murashige y Skoog (1962), BA 0.05 mg l<sup>-1</sup>, ácido naftalenacético 0.05 mg l<sup>-1</sup>, sulfato de adenina 160 mg l<sup>-1</sup>, sacarosa 3 %, gelrite 0.025 % y pH 5.7. En esta etapa los subcultivos se realizaron cada 20 días.

### 3.2.2 Aclimatación y establecimiento *ex vitro*

Las plantas regeneradas *in vitro* se transfirieron a invernadero cuando tenían al menos 4 hojas bien desarrolladas, y una altura de aproximadamente 3-4 cm. Para la aclimatación de las plantas se desarrolló un protocolo, el cual se detalla en la figura 3.1. Las plantas aclimatadas de todas las líneas crecieron en macetas con una mezcla 2:1 de suelo y turba. El suelo utilizado provino de un suelo tipo Leptosol rendzico (INEGI, 1988), con presencia de material calcáreo, y un pH fuertemente alcalino (9.32 ± 0.07). El pH se midió en una muestra

compuesta de suelo usando un potenciómetro Oakton®, calibrado para un intervalo de pH de 4 a 10, a 21 °C.

### **3.2.3 Caracterización morfológica**

La evaluación del crecimiento y morfología de las plantas establecidas se realizó cada 15 días durante un periodo de 10 meses. Se estimó la altura de las plantas, diámetro del tallo, número de hojas producidas, forma de las hojas, color de pecíolos y hojas, tipo y color de flor, tamaño, peso, y número de frutos, y número de semillas por fruto. Para evaluar estos parámetros se tomaron en cuenta las recomendaciones para descriptores de papaya (IBPGRI, 1988). La biomasa total acumulada por planta (peso seco) se obtuvo al sumar la masa de raíces, tallos y hojas. Las muestras (n = 3) se secaron a 60 °C hasta obtener un peso constante.

### **3.2.4 Capacidad fotosintética**

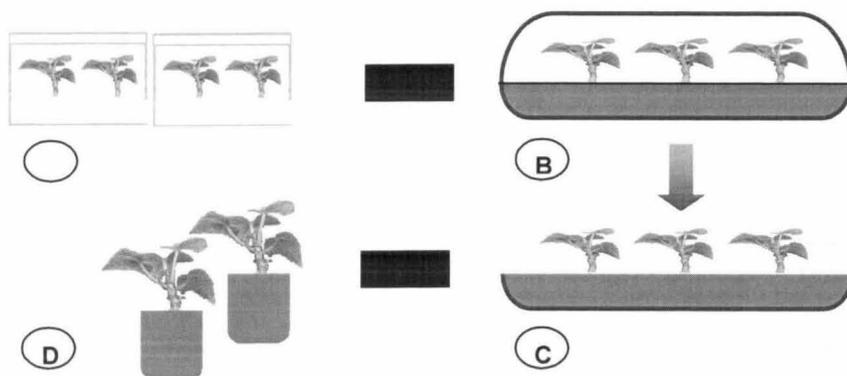
La capacidad fotosintética de las líneas establecidas se determinó cuantificando la tasa neta de fijación de CO<sub>2</sub> (Pn) y la conductancia estomática (cs). Los datos se tomaron en la hoja más joven completamente expandida (7<sup>a</sup> hoja del ápice hacia la base); el número de plantas analizadas por línea fue 3, tomando 5 lecturas por planta. Para medir Pn y CS se usó un analizador de gas infrarrojo portátil (Modelo LI-6200, Licor, USA), bajo luz natural (380-400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a una temperatura ambiente de 28-32 °C y una concentración inicial de CO<sub>2</sub> de 380-390  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ . Estas condiciones ambientales de luz y temperatura corresponden a las condiciones que prevalecían durante el intervalo del día donde se presentó la máxima Pn en controles WT.

### **3.2.5 Cantidad total de fósforo (P) inorgánico acumulado en hojas**

La cantidad total de P inorgánico acumulado en hojas se cuantificó espectrofotométricamente mediante el método de Murphy-Riley (Murphy y Riley, 1962; Watanabe y Olsen, 1965). Para estos análisis se tomaron muestras de tejido de la hoja más joven completamente expandida, en tres plantas por línea, al final del periodo de evaluación. El tejido se liofilizó, se homogenizó en un molino tipo Wiley y se tomó una muestra de 0.25 g para cuantificar la cantidad de P inorgánico presente en ella. Se analizaron tres muestras por línea.

### 3.2.6 Análisis de datos

Todos los datos de crecimiento, capacidad fotosintética y P inorgánico acumulado fueron analizados estadísticamente como un experimento completamente al azar, con el programa Statgraphics 4.0 para Windows. Las diferencias significativas entre datos se detectaron mediante pruebas de rango múltiple, con un nivel de confianza del 95 % ( $\alpha = 0.05$ ). Los datos graficados corresponden al promedio de al menos 3 réplicas  $\pm$  desviación estándar.



**Figura 3.1** Protocolo de aclimatación y establecimiento *ex vitro* de líneas de papaya genéticamente modificadas.

A. Las cajas magenta conteniendo a las plantas se sacaron del cuarto de cultivo y se mantuvieron en invernadero por 24 horas, sin abrir las tapas de la cajas magentas. Después de este tiempo, se permitió una mayor ventilación de la caja magenta, dejando una pequeña abertura entre la tapa y la caja magenta, manteniéndolas así de 2 a 3 días.

B. Las plantas se transfirieron a charolas que contenían turba húmeda, y se les colocó una cubierta plástica para mantener una humedad relativa alta.

C. La cubierta plástica fue retirada y las plantas permanecieron en la charola por aproximadamente 20 días.

D. Una vez que las plantas enraizaron, se transfirieron a bolsas de plástico, y posteriormente a macetas con una mezcla de suelo y turba (Sun-shine®), en una proporción 2:1 respectivamente.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Regeneración in vitro

En las 20 líneas se obtuvieron embriones somáticos secundarios. Sin embargo, solo se logró la germinación de éstos en 14 líneas (tabla 3.1). En 13 líneas se pudieron regenerar plantas; en la línea 016-3-620-B2 (3) los embriones presentaron germinación precoz y degeneraron formando estructuras amorfas. La capacidad de germinación y el vigor *in vitro* fueron distintos entre las líneas, sobresaliendo por su capacidad germinativa y vigor de las plántulas, las líneas C11-35S y la C30-100 Ubi (Figura 3.2, panel C).

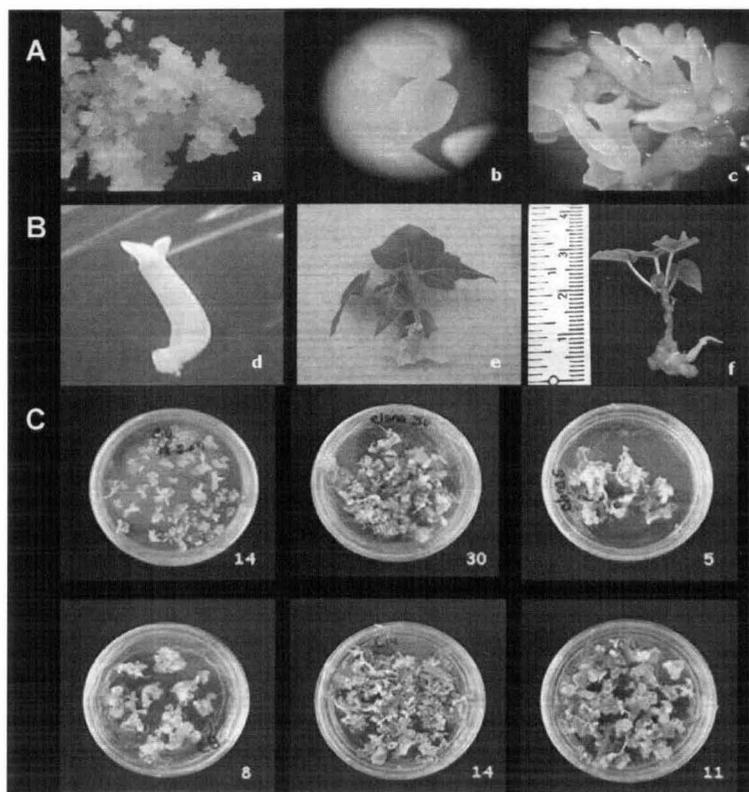
**Tabla 3.1** Líneas regeneradas a partir de embriones somáticos secundarios.

Líneas regeneradas	
C4-100 Ubi	C10-35S
C5-100 Ubi	C11-35S
C6-100 Ubi	C14-35S
C16-100 Ubi	C17-35S
C24-100 Ubi	C27-35S
C25-100 Ubi	016-3-620-B2 (3)
C30-100 Ubi	GHY 9 A1 (8)

#### 3.3.2 Aclimatación de las plantas regeneradas

El protocolo de aclimatación se empleó en dos ocasiones. Se aclimataron aquellas líneas que regeneraron con mayor rapidez y que produjeron mayor número de plántulas. La línea GHY 9 A1 (8) no se pudo establecer por presentar baja capacidad de regeneración. En la primera aclimatación (lote 1) se lograron establecer 2 líneas genéticamente modificadas que contenían los genes *gltA* y *uidA*: C11-35S y C30-100 Ubi; como control negativo de este lote se usaron plantas micropropagadas sin transformar (control WT). En la segunda aclimatación (lote 2) se establecieron 5 líneas: C5-100 Ubi, C6-100 Ubi, C10-35S, C11-35S y C30-100 Ubi. En estas primeras tres líneas no sé

detectó actividad de GUS ni presencia del transgen *gltA* (ver figuras 2.1 y 2.6), por lo que se eligió a la línea C10-100 Ubi como control negativo del lote 2. La sobrevivencia promedio para ambos lotes, al momento del transplante, fue de 70 %.

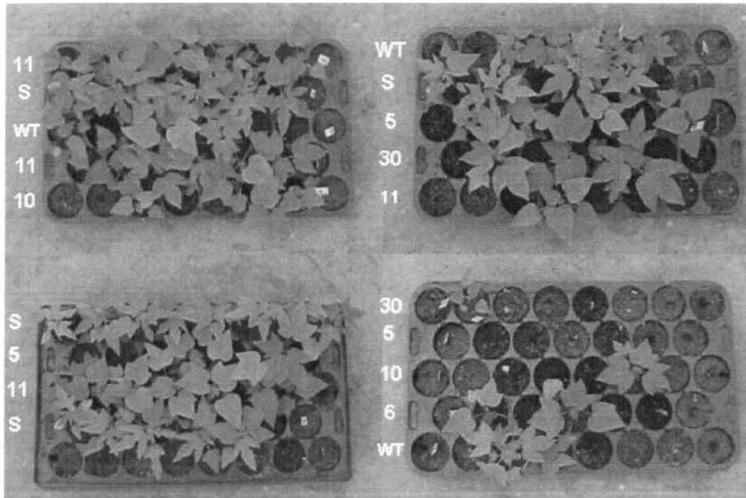


**Figura 3.2** Proceso de regeneración de las líneas genéticamente modificadas.

A) Inducción a embriogénesis somática secundaria: (a) y (b) Formación de embriones somáticos; (c) embriones en estado cotiledonal.

B) Germinación y crecimiento *in vitro* de las líneas: (d) Germinación de embrión; (e) plántula regenerada de 30 días de edad; (f) plántula lista para aclimatar.

C) Capacidad de germinación de las líneas: Embriones de diferentes líneas en un medio de germinación; el número que se muestra en la parte inferior derecha de cada placa petri corresponde al número de la línea.

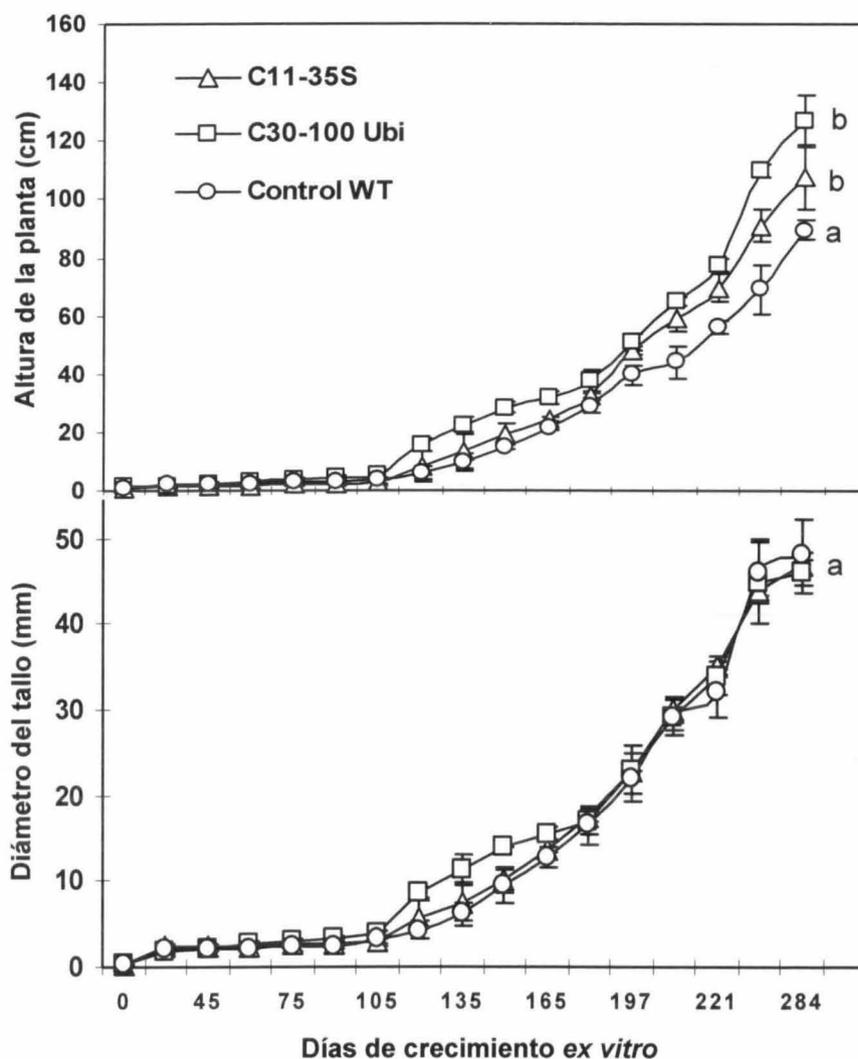


**Figura 3.3** Aspecto de las algunas líneas regeneradas a partir de callos embriogénicos aproximadamente 20 días después del inicio de la aclimatación. El número a la izquierda de cada charola indica el número de la línea. WT = Plantas control micropropagadas. S=Plantas control provenientes de semilla.

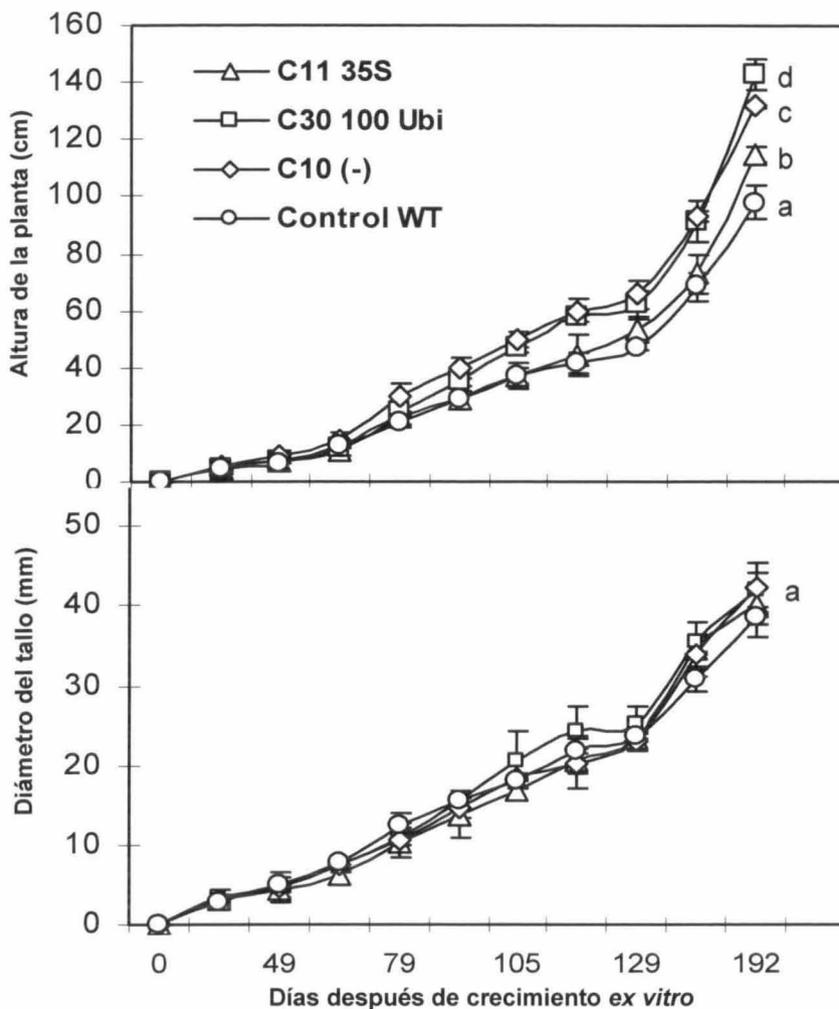
### 3.3.3 Crecimiento de las líneas establecidas *ex vitro*

El crecimiento de las líneas genéticamente modificadas establecidas *ex vitro* se evaluó durante un periodo de 284 días en el lote 1 (figura 3.4) y 192 días en el lote 2 (figura 3.5), que fueron los tiempos en que se pudieron mantener ambos lotes bajo las condiciones del invernadero. Después del trasplante a *ex vitro*, se observó un lento crecimiento tanto (fase *lag*) en plantas transformadas genéticamente como en controles negativos, en ambos lotes, sin embargo se prolongó aproximadamente 30 días más en el lote 1 en comparación con el lote 2. Durante esta fase, hubo incrementos pequeños en altura, diámetro del tallo y producción mensual de hojas (figuras 3.4 y 3.5). Posteriormente, la fase de crecimiento lento, en todas las líneas y controles de ambos lotes, la altura y diámetro del tallo se incrementaron linealmente, respecto a los días después del trasplante, durante aproximadamente 100 días. Al final de ambos periodos de evaluación, en general, las líneas genéticamente transformadas C11-35S y C30-100 Ubi tuvieron una mayor altura en comparación con los controles negativos. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente

significativas en cuanto a diámetro del tallo, número total de hojas y número de hojas producidas al mes entre las dos líneas que contenían el gen *gltA* y los controles que no lo poseían (tablas 3.2 y 3.3).



**Figura 3.4** Crecimiento *ex vitro* de las líneas genéticamente transformadas C11-35S y C30-100 Ubi, en comparación con el control WT, durante 284 días. Comportamiento de la altura y diámetro del tallo de la planta ( $\alpha = 0.05$ ; cada punto es el promedio de  $n=3 \pm SD$ ).



**Figura 3.5** Crecimiento *ex vitro* de las líneas genéticamente transformadas C11-35S y C30-100 Ubi, en comparación con el control WT, durante 192 días. Comportamiento de la altura y diámetro del tallo de la planta ( $\alpha = 0.05$ ; cada punto es el promedio de  $n=3 \pm SD$ ).

**Tabla 3.2** Parámetros de crecimiento en el lote I al final del período de evaluación (284 días de crecimiento *ex vitro*). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre medias ( $\alpha = 0.05$ ;  $n = 3$ ).

Línea	Altura planta (cm)		Diámetro del tallo (mm)		Número de hojas totales		No. hojas nuevas por mes	
Control WT (-)	89 ± 3.5	a	48 ± 4.2	a	26.5 ± 3.5	a	9 ± 0	a
C11-35S (+)	107.5 ± 10.6	b	47 ± 1.4	a	22 ± 1.4	a	11 ± 4.2	a
C30-100 Ubi (+)	127 ± 8.5	b	46 ± 1.4	a	26.5 ± 4.9	a	10 ± 1.4	a

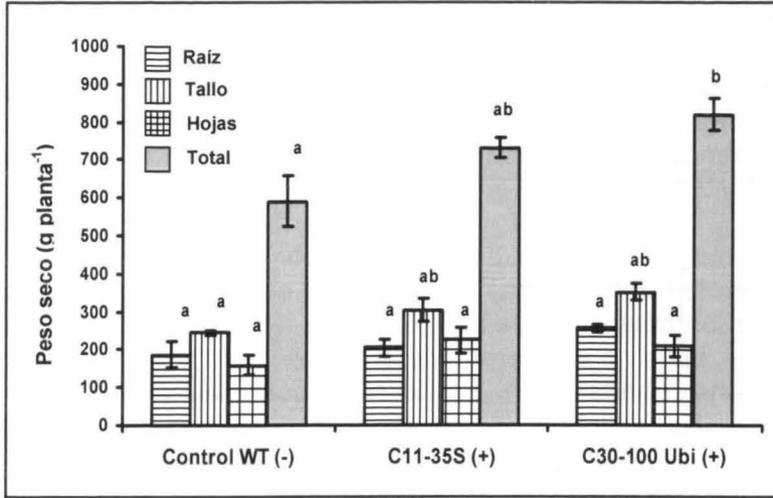
**Tabla 3.3** Parámetros de crecimiento en el lote II al final del período de evaluación (192 días de crecimiento *ex vitro*). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre medias ( $\alpha = 0.05$ ;  $n = 3$ ).

Línea	Altura planta (cm)		Diámetro del tallo (mm)		Número de hojas totales		No. hojas nuevas por mes	
Control WT (-)	98 ± 6.2	a	38.7 ± 1.2	a	26 ± 5 a	a	9.7 ± 0.6	a
C10 (-)	131.7 ± 0.6	c	42.3 ± 3	a	27.7 ± 2.1	a	9.7 ± 0.6	a
C11-35S (+)	114.7 ± 2.5	b	40.7 ± 4.7	a	21.3 ± 1.5	a	9.3 ± 0.6	a
C30-100 Ubi (+)	142.7 ± 5.5	d	42 ± 3.7	a	24 ± 7	a	10 ± 1	a

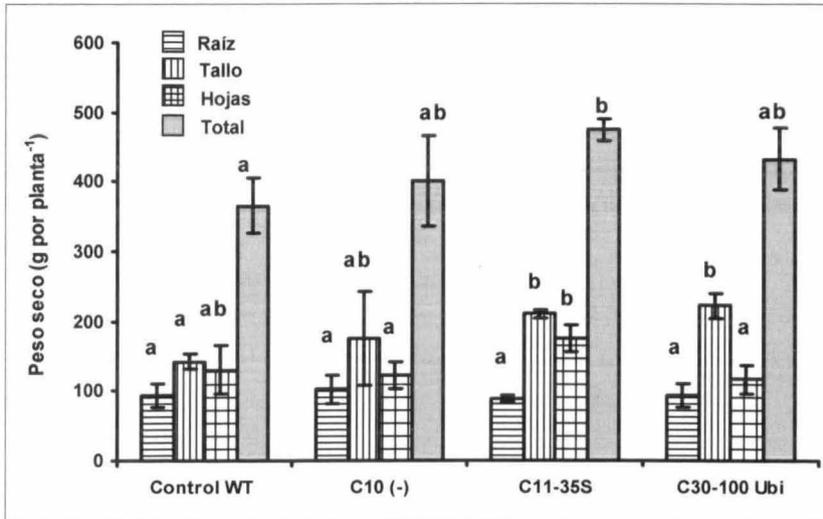
Respecto a la producción de biomasa total acumulada, en el lote I, la línea C30-100 Ubi acumuló mayor cantidad de peso seco, respecto a la línea C11-35S y el control WT. En el lote II, la línea C11-35S tuvo mayor biomasa que las líneas C10 (-) y C30-100 Ubi y el control WT, aunque en este caso, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre éstas tres últimas (figura 3.6 y 3.7).

La mayor ganancia de biomasa, por parte de alguna de las líneas genéticamente transformadas (C30-100 Ubi en el lote I, y C35-S, en el lote II), respecto a los controles, fue consecuencia de una mayor acumulación en la parte aérea, pues no existieron diferencias entre el peso seco de raíces entre plantas transformadas genéticamente y controles sin el gen *gltA* de *P. aeruginosa*. En el lote I (figura 3.6), la línea transformada C11-35S no presentó diferencias en peso seco de las raíces, tallo, hojas y total en comparación con el control WT; en contraste, si existieron diferencias entre éste y la línea C30-100 ubi, donde el peso seco total ( $819 \pm 42$  g por planta) fue 1.4 veces mayor respecto al peso seco total del control WT ( $590 \pm 67$  g por planta). Estadísticamente, el peso seco total de la línea 30 fue igual al de la línea 11.

El análisis de composición de los pesos secos totales, señala que la diferencia entre el peso seco de la línea C30-100 Ubi y el peso seco de la línea C11-35S y control WT es consecuencia de una mayor acumulación de biomasa en los tallos de la primera línea. En el lote II (figura 3.7), la línea C11-35S no solo tuvo la mayor altura (tabla 3.3), sino también acumuló la mayor cantidad de biomasa total, en comparación con la línea C30-100 Ubi y los dos controles negativos evaluados. Esta mayor ganancia de peso seco fue consecuencia de una mayor acumulación de biomasa en tallo y hojas.

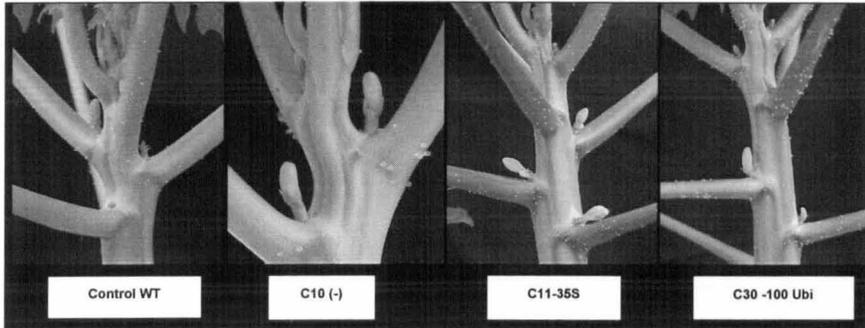


**Figura 3.6** Producción de biomasa en líneas genéticamente transformadas C11-35S y C30-100 Ubi y control WT después de 284 días de crecimiento *ex vitro* (lote I). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre medias ( $\alpha = 0.05$ ;  $n = 3$ )



**Figura 3.7** Producción de biomasa en líneas genéticamente transformadas C11-35S y C30-100 Ubi y controles C10 (-) y WT después del 222 días de crecimiento *ex vitro* (lote II). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre medias ( $\alpha = 0.05$ ;  $n = 3$ )

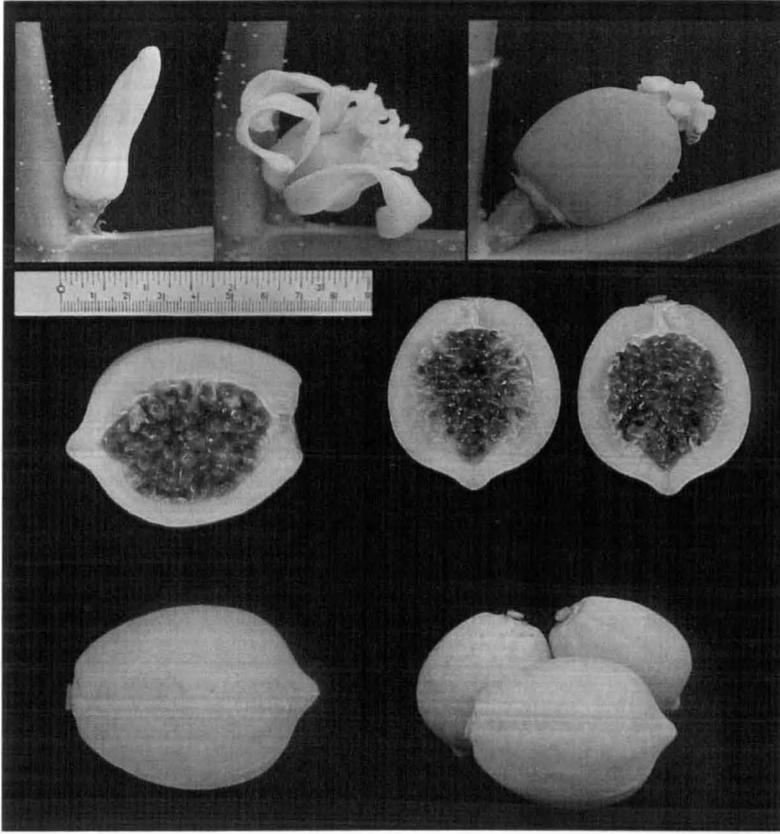
No hubo diferencias en cuanto a la forma de las hojas entre líneas genéticamente transformadas y controles negativos, aunque si respecto al color de los pecíolos, donde las primeras presentaron hojas con pecíolos ligeramente morados y los segundos pecíolos blancos (figura 3.8).



**Figura 3.8** Diferencias en el color de pecíolos de hojas de líneas genéticamente modificadas (C11-35S y C30 Ubi) y plantas control (C10 (-) y Control WT).

La floración inició en todas las líneas y controles a los 120 días después del establecimiento. En las líneas genéticamente transformadas, las flores fueron de color amarillo, y en los controles fueron color crema. En la línea C30-100 Ubi, y en los controles C10 (-) y WT, las flores fueron hermafroditas, sin embargo éstas tuvieron ovarios rudimentarios, por lo que funcionalmente se comportaron como flores masculinas. La línea C11-35S tuvo flores femeninas por lo que se realizaron cruza controladas, realizando polinización artificial, entre ella y el control WT.

La obtención de frutos maduros con semillas viables fue posible 5 meses después de realizarse la polinización artificial en la línea C11-35S. Se cosecharon 15 frutos, los cuales tuvieron una longitud de  $7.2 \pm 0.24$ , medida de pedúnculo al ápice del fruto, un ancho ecuatorial de  $5.8 \pm 0.25$  cm, un peso de  $119.19 \pm 13$  g por fruto, y  $356.42 \pm 70.62$  semillas por fruto (figura 3.9).



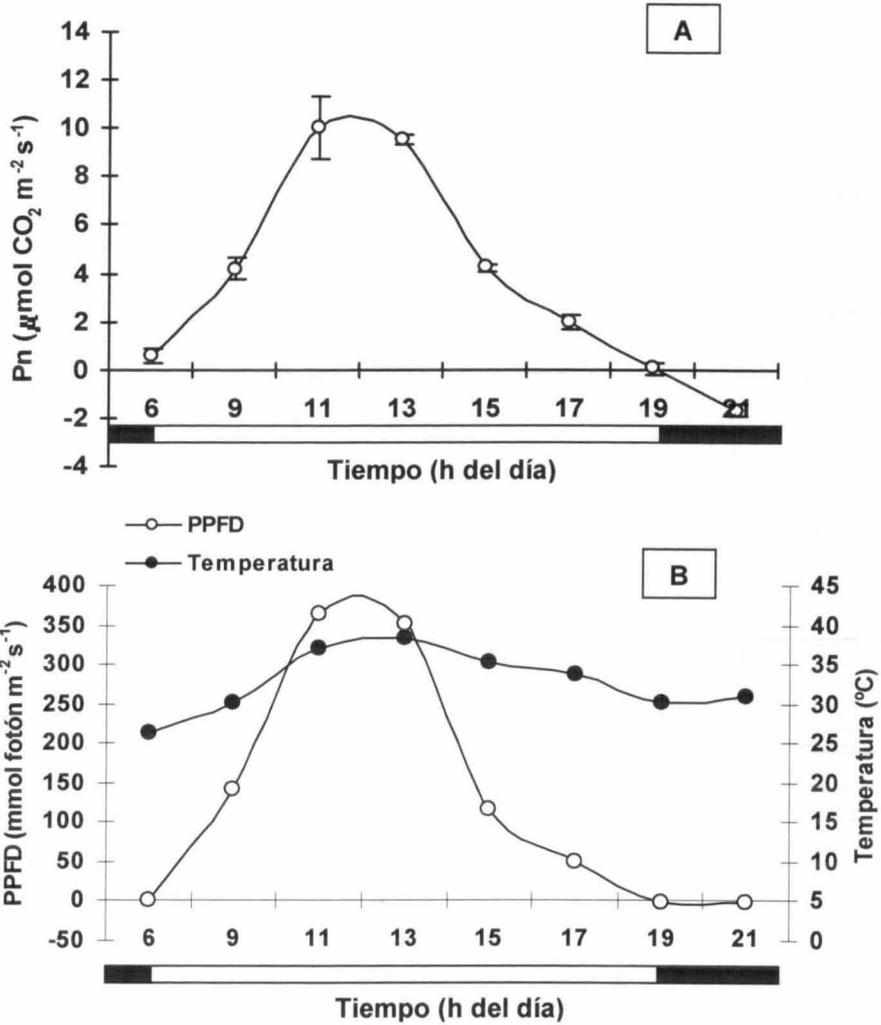
**Figura 3.9** Floración y fructificación en línea genéticamente transformada C11-35S. Los frutos se obtuvieron después de realizar polinización artificial entre la plantas de la línea transformada (♀) y el control WT (♂).

### 3.3.4 Capacidad fotosintética en líneas establecidas en invernadero

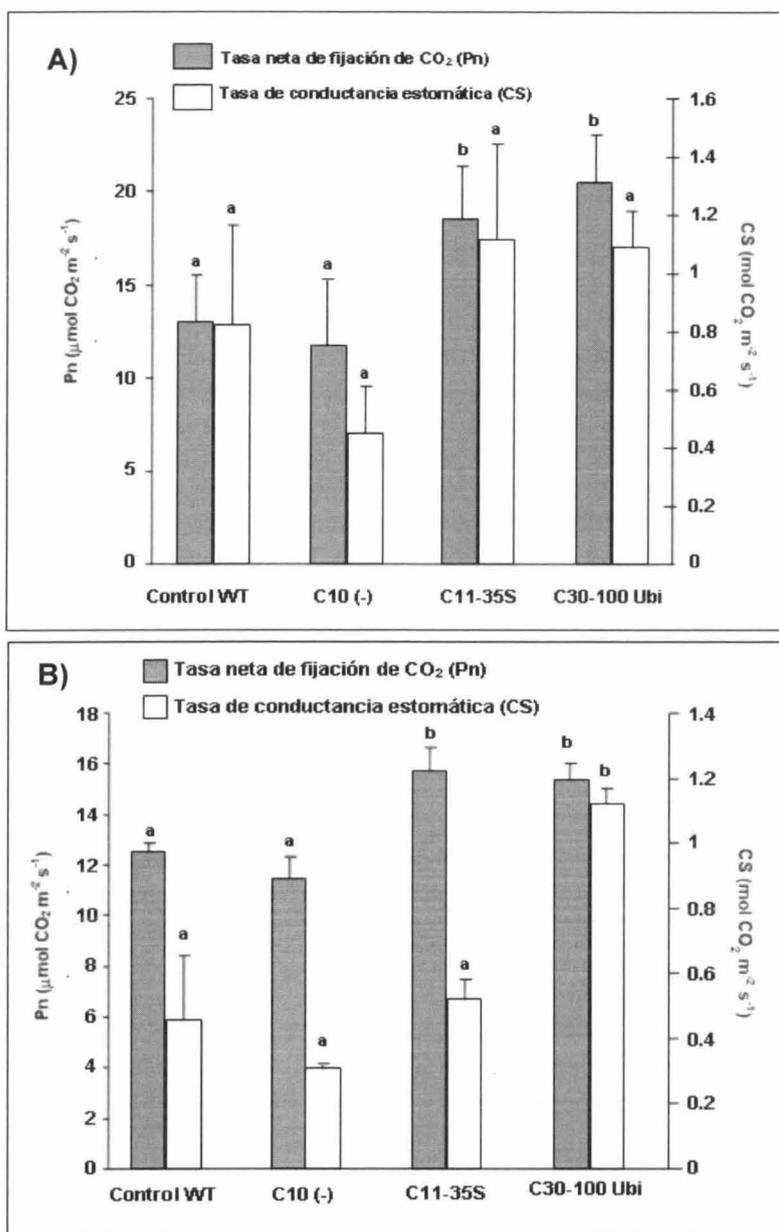
Para determinar la tasa fotosintética neta ( $P_n$ ) máxima en plantas control WT establecidas en invernadero, la  $P_n$  se midió durante el transcurso del día, cada 2 horas, durante un periodo de 15 horas. La figura 3.10 muestra que la  $P_n$  máxima se presenta entre las 11 y 13 h del día. Por tanto, las siguientes mediciones de  $P_n$  en plantas de líneas transformadas genéticamente y plantas control se realizaron durante este intervalo del día.

La capacidad fotosintética de las líneas C11-35S y C30-100 Ubi, y en los dos controles negativos (la línea C10 (-) y control WT) se determinó en plantas de 60 días y 90 días de crecimiento *ex vitro*.

La  $P_n$  fue superior, a los 60 y 90 días, en plantas transformadas en comparación con plantas 10 (-), donde no se detectó la presencia de *gltA* y *uidA*, y con el control WT. A los 60 días (figura 3.11 A) y 90 días (figura 3.11 B) de crecimiento *ex vitro* no existieron diferencias entre la  $P_n$  de las dos líneas transformadas, aunque la  $P_n$  de ambas fue superior a la  $P_n$  del control WT y la línea C10 (-). Respecto a la *cs*, a pesar de que no hubo diferencias significativas entre la conductancia estomática de plantas transformadas genéticamente y no transformadas, existió una tendencia a incrementarse en las primeras respecto a los controles negativos (figura 3.11).



**Figura 3.10** A) Patrón diario de intercambio neto de CO<sub>2</sub> en plantas de papaya (controles WT) de 20 días de edad bajo condiciones naturales de luz (PPFD) y temperatura (B). Para Pn, n = 3; cada punto es promedio de n ± SD.

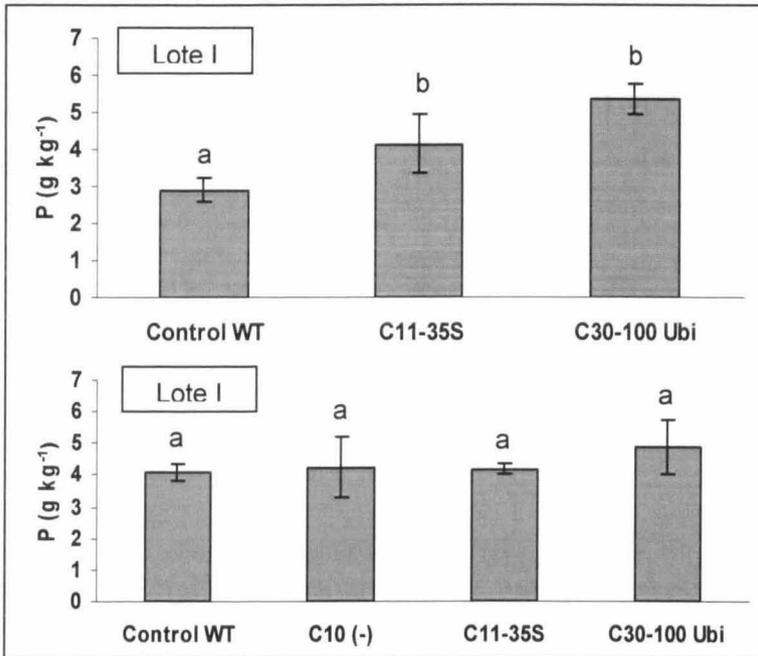


**Figura 3.11** Tasa neta de fijación de CO<sub>2</sub> (Pn) y tasa de conductancia estomática (cs) en plantas transformadas genéticamente y no transformadas con el gen *gltA* y *uidA*, evaluadas a los 60 días (A) y 90 días (B) de crecimiento en invernadero. n = 3; cada barra es promedio de n ± SD.

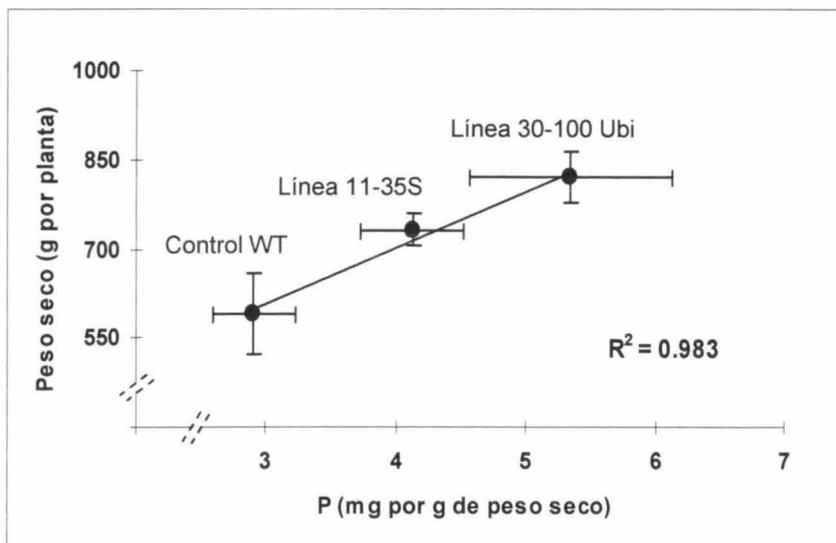
### 3.3.5 Acumulación de fósforo en líneas establecidas en invernadero

La cantidad total de P inorgánico acumulado en hojas se cuantificó al final de cada periodo de evaluación en los dos lotes de plantas establecidos en invernadero; en el lote I a los 284 días de crecimiento *ex vitro* y en lote II a los 222 días.

No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de P acumulado ( $\text{g kg}^{-1}$  de tejido foliar) en las plantas de 222 días de edad (figura 3.12, lote II). Sin embargo, en el lote I, las dos líneas genéticamente transformadas acumularon mayor cantidad de P en comparación con el control WT (figura 3.12 lote I). No hubo diferencias en este lote entre el contenido de P hallado en la línea C11-35S y la línea C30-100 Ubi, aunque ésta última acumuló significativamente más P en comparación con el control WT. Los valores para P inorgánico soluble acumulado para los tres tipos de plantas correlacionaron positivamente con los valores hallados para el peso seco total en plantas de este lote (figura 3.13).



**Figura 3.12** Acumulación de fósforo inorgánico soluble en hojas de líneas genéticamente transformadas (C11-35S y C30-100 Ubi) y controles negativos (C10 (-) y control WT).



**Figura 3.13** Relación entre las variables contenido de fósforo inorgánico soluble y peso seco total acumulado en las líneas genéticamente transformadas (C11-35S y C30-100 Ubi) y control WT.

### 3.4 DISCUSIÓN

La alta frecuencia de embriogénesis somática *in vitro* en papaya y la existencia de protocolos exitosos para lograr la regeneración de plantas enteras a partir de ella son algunas de las razones por las que se prefiere usar callos embriogénicos en los métodos de transformación genética de esta especie (Drew, 2003).

En nuestro caso, el 100 % de las líneas de papaya evaluadas fueron capaces de producir embriones somáticos secundarios, a pesar de estar varios años subcultivándose (al menos 7 años); sin embargo, solo el 65 % de las líneas produjeron embriones que lograron germinar bajo las condiciones probadas. No se estimó la correlación entre la capacidad de regenerar y la presencia de los transgenes *uidA* y *gltA*, sin embargo si se observó un mayor vigor en algunas de las líneas transformadas. En trabajos previos sobre transformación genética en papaya se ha indicado la presencia de plantas “fuera de tipo”; por ejemplo, la transformación de callos embriogénicos con *Agrobacterium tumefaciens* dio como resultado plantas con hojas cloróticas (Fitch *et al.*, 1993), u hojas no palmeadas arrosietadas cuando se transformaba con el gen de selección *nptII* y el gen reportero *uidA* (Yang *et*

al., 1996). Aunque es posible que la variación en la capacidad de regeneración y vigor de las líneas puedan estar asociados con los eventos de transformación, no debe descartarse la posibilidad de variación somaclonal ocurrida durante el cultivo *in vitro*. Respecto a cambios fenotípicos correlacionados con la transformación genética con el gen *gltA* existen algunos reportes previos a este trabajo. Delhaize y colaboradores (2001) señalan que la sobreexpresión del gen *gltA* de *Pseudomonas aeruginosa*, que codifica para citrato sintasa, en plantas de tabaco produjo fenotipos distintos en algunas de las líneas transformadas en comparación con plantas sin el transgen, lo cual lo atribuyeron a la expresión ectópica del gen de CS. Ellos reportan la presencia consistente de márgenes y parches necróticos en hojas. En nuestro caso, no se observaron cambios fenotípicos asociados a la presencia del gen CS en plantas de papaya, durante el cultivo *in vitro*, aunque sí cambios en el tamaño de hojas y color de peciolos de las líneas transformadas establecidas en invernadero. El tiempo para llegar a floración fue el mismo entre plantas modificadas genéticamente y plantas control, aunque no el color de las flores. Esto difiere parcialmente de lo observado por Tesfaye *et al.* (2001), quienes obtuvieron plantas de alfalfa transformadas genéticamente con malato deshidrogenasa, donde la morfología de las hojas y los patrones de floración se mantuvieron estables; y de lo hallado por Anoop *et al.* (2003) en canola, en la que plantas que sobreexpresaban la enzima citrato sintasa no presentaron diferencias morfológicas en comparación con los controles negativos.

Las diferencias en crecimiento entre las líneas genéticamente modificadas y las plantas control establecidas en invernadero se reflejaron también en la acumulación de biomasa total, donde en los dos lotes evaluados al menos una de las dos líneas genéticamente transformadas resultó ser significativamente superior en comparación con los controles negativos. Si efectivamente existiera una correlación positiva entre la mayor actividad de la enzima citrato sintasa (figura 2.7) y un incremento en la acumulación y exudación de citrato, como se ha demostrado en otros casos (De la Fuente *et al.*, 1997; Koyama *et al.*, 2000; López-Bucio *et al.*, 2000), la pérdida de compuestos carbonados hacia la rizósfera en papaya no representa un problema en términos de costos energéticos, como se ha predicho para cultivos agrícolas con tasas de crecimiento elevadas (Taylor 1991; Koyama *et al.*, 2000), sino al contrario, podría conllevar beneficios al incrementar la acumulación de fósforo, como se observó en este trabajo en el lote I de plantas analizadas.

A pesar de que no se cuantificó la exudación de citrato en las dos líneas genéticamente modificadas establecidas en invernadero, los datos de fijación de CO<sub>2</sub> parecen sugerir que la posible pérdida de carbono en forma

de exudados estaría siendo compensada al incrementarse la tasa neta fotosintética (Pn). Una mayor conductancia estomática no explica el incremento en Pn pues no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre la conductancia de plantas con mayor Pn y plantas con menor Pn. Dado que los factores ambientales de luz, temperatura, humedad y CO<sub>2</sub> fueron relativamente homogéneos, otros factores internos, no evaluados en este experimento, como velocidad en la regeneración de RuBP, contenido y actividad de rubisco, que también afectan la maquinaria fotosintética (Swada *et al.*, 1992), pudieran ser responsables de la mayor Pn hallada en las líneas genéticamente transformadas.

Respecto a la mayor actividad de la enzima citrato sintasa, ésta estuvo asociada positivamente con un incremento en el contenido de fósforo y mayor acumulación de biomasa, siendo estas asociaciones consistentes con las halladas en otras especies como tabaco y arábido transformados genéticamente con genes involucrados en la síntesis de ácidos orgánicos (Koyama *et al.*, 2000; López-Bucio *et al.*, 2000).

El menor contenido de P inorgánico soluble en la línea genéticamente modificada C11-35S respecto a la línea C30-100 Ubi, en el lote I (figura 3.12), puede ser resultado del estado de fructificación en que se hallaban las plantas de dicha línea. Se sabe que el fósforo es un elemento muy móvil dentro de la planta y que es indispensable durante la reproducción vegetal (Marschner, 1995). Las diferencias estadísticas nulas encontradas en el lote II pudieran ser un efecto principalmente de la mayor disponibilidad de fósforo en el suelo; en este lote, las plantas crecieron en una mezcla con menor contenido de suelo calcáreo, por lo que se tuvo que incrementar el número de fertilizaciones realizadas durante el periodo de evaluación.

### 3.5 CONCLUSIONES

- ❖ Es posible obtener embriones somáticos secundarios en callos embriogénicos co-bombardeados con los genes *uidA* y *gltA* en papaya, después de varios años de subcultivos, aunque se disminuye la capacidad de germinación de dichos embriones.
- ❖ La presencia del gen *gltA* en papaya está asociado con incrementos en la actividad de la enzima citrato sintasa, contenido de fósforo inorgánico soluble y mayor acumulación de biomasa.
- ❖ Un incremento en la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> pudiera estar compensado una posible pérdida de carbono por exudación de ácidos orgánicos, en las líneas genéticamente modificadas. Esta compensación para carbono y el incremento en la acumulación de P, explicarían la mayor acumulación de biomasa de dichas líneas.

### 3.6 LITERATURA CITADA

- Anoop VM, Basu U, McCammon MT, McAlister-Henn L and Taylor GJ (2003) Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol* 132: 2205–2217.
- Cabrera-Ponce JL, Sánchez-García G, Téllez-Rodríguez P, Pons-Corona M, Herrera-Estrella L (2000) Embriogénesis somática en la papaya (*Carica papaya* L.): un método para la micropropagación y transformación genética. *Hort Mex* 8 (2): 164-174.
- Carmak I (2002) Plant nutrition research: priorities to meet human needs for food in sustainable ways. *Plan Soil* 247: 3-24
- Delhaize E, Hebb DM, Ryan PR (2001) Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol* 125: 2059-2067.
- De la Fuente JM, Ramírez-Rodríguez V, Cabrera-Ponce JL and Herrera-Estrella L (1997) Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthase. *Science* 276 (6): 1566-1568.
- Drew R (2003) Micropropagation of *Carica papaya* and related especies. In: Micropropagation of woody trees and fruits. Jain SM and Ishii K (eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Bélgica 212-222.
- Fitch MMM, Manshardt RM, Gonsalves D, Slightom JL (1993) Transgenic papaya plants from Agrobacterium-mediated transformation of somatic embryos. *Plant Cell Rep* 12: 245- 249.
- Fujita K, Okada M, Lei K, Ito J, Ocurra K, Adu-Gyamfi JJ, Mohapatra PK (2003) Effect of P-deficiency on photoassimilation partitioning and rhythmic changes in fruit and stem diameter of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during fruit growth. *J Exp Bot* 54: 2519-2528.
- IBPGRI (1988) Descriptors for papaya. IPGRI. Roma, Italia. 34 p.
- INEGI (1988) Mapa de suelos dominantes de México. Escala 1: 1 000 000. Clasificación FAO-UNESCO-ISRIC. SEMARNAP-Colegio de Postgraduados-INEGI (Eds.). México, D. F.

- Jacob J, Lawlor DW (1992) Dependence of photosynthesis of sunflower and maize leaves on phosphate supply, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity, and ribulose-1,5-bisphosphate pool size. *Plant Physiol* 98:801-807.
- Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant Soil* 205: 25-44.
- Koyama H, Kawamura A, Kihara T, Hara T, Takita E, Shibata D (2000) Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. *Plant Cell Physiol* 41(9):1030-1037.
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. Londres, Inglaterra. 345 p.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for a rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for determination of phosphates in natural waters. *Anal Chim Acta* 27: 31-36
- López-Bucio J, Martínez de la Vega O, Guevara-García A and Herrera-Estrella L (2000) Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nat Biotechnol* 18 (4):450-453
- Lynch JP, Ho MD (2005) Rhizoeconomics: carbon costs of phosphorus acquisition. *Plant and Soil* 269 (1-2): 45-56
- Ryan PR, Delhaize E, Jones DL (2001) Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52:527-560.
- Swada S, Usuda H, Tsukui T (1992) Participation of inorganic orthophosphate in regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity in response to changes in the photosynthetic source-sink balance. *Plant Cell Physiol* 33 (7): 943-949.
- Takita E, Koyama H, Hara T (1999) Organic acid metabolism in aluminum-phosphate utilizing cells of carrots (*Daucus carota* L.) *Plant Cell Physiol* 40: 489-495.

- Taylor GJ (1991) Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of the tolerance. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*. 6: 57-93.
- Teixeira-Gomes FG, Duarte-Pereira G, Chaer-Borges A, Mosquim PR (2003) Fotossíntese em alfalfa (*Medicago sativa* L.) sob supressão e ressuprimento de fósforo. *Ciencia Rural* 33 (5): 821-828.
- Tesfaye M, Temple SJ, Allan DL, Vance CP, Samac DA (2001) Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant Physiol* 127:1836-1844.
- Watanabe FS and Olsen SR (1965) Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO<sub>3</sub> extracts from soil. *Soil Sci Soc Am Proc* 29: 677-678.
- Yang JS, Yu TA, Cheng YH, Yeh SD (1996) Transgenic papaya plants from *Agrobacterium* mediated transformation of petioles of *in vitro* propagated multishoots. *Plant Cell Rep* 15: 459-464.
- Zhang FS, Ma J, Cao YP (1997) Phosphorus deficiency enhances root exudation of low-molecular weight organic acids and utilization of sparingly soluble inorganic phosphates by radish (*Rhaphanus sativus* L.) and rape (*Brassica napus* L.). *Plant Soil* 196: 261-264.



## Capítulo IV. Conclusiones generales

- ❖ En todas las líneas de papaya fue posible obtener embriones somáticos secundarios, aunque no fue posible lograr la germinación en todas las 20 líneas.
- ❖ Los análisis de la expresión del gen reportero GUS indican que éste mantiene su expresión estable en los transformantes primarios después de mantenerse éstos por más de siete años en cultivo *in vitro*.

La actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, codificada por el gen GUS, se detectó en el 20 % de las líneas evaluadas: en las líneas 11, 14, 17 y 30.

- ❖ Las proporciones fenotípicas para la expresión de este transgen en la generación T1 sugieren que puede heredarse como carácter mendeliano simple.

La proporción fenotípica de la actividad de enzima  $\beta$ -glucuronidasa fue 1:1 en la generación T1 (cruza línea 11 x control WT).

- ❖ La integración del gen *gltA* fue estable en algunas de las líneas evaluadas y estuvo asociada con incrementos en la actividad de la enzima citrato sintasa (CS).

El gen *gltA* se detectó en el 35 % de las líneas. La actividad de CS es 3.3 veces superior en dos de las líneas que poseían el transgen (línea 11 y 30) en comparación con el control negativo (línea 8) bombardeado solo con las partículas durante el proceso de transformación.

- ❖ La presencia del transgen *gltA* en líneas establecidas en invernadero (línea 11 y 30) estuvo relacionada positivamente con incrementos en la acumulación de biomasa y contenido de fósforo inorgánico soluble.

El peso seco total en la línea 11 fue 1.2 superior respecto al del control WT; en la línea 30, el peso seco total fue 1.4 mayor en comparación con el mismo control.

El contenido de fósforo inorgánico soluble fue 1.4 y 1.8 veces mayor en la línea 11 y 30, respectivamente, en comparación con el hallado en el control WT.

- ❖ Incrementos en la tasa neta de fijación de CO<sub>2</sub> hallados en ambas líneas genéticamente modificadas, línea 11 y 30, pudieran estar compensando la posible pérdida de carbono por exudación de citrato en las plantas transformadas, lo cual junto con incrementos en la toma de P, explicarían la mayor acumulación de biomasa en ellas.

## Capítulo V. Discusión general

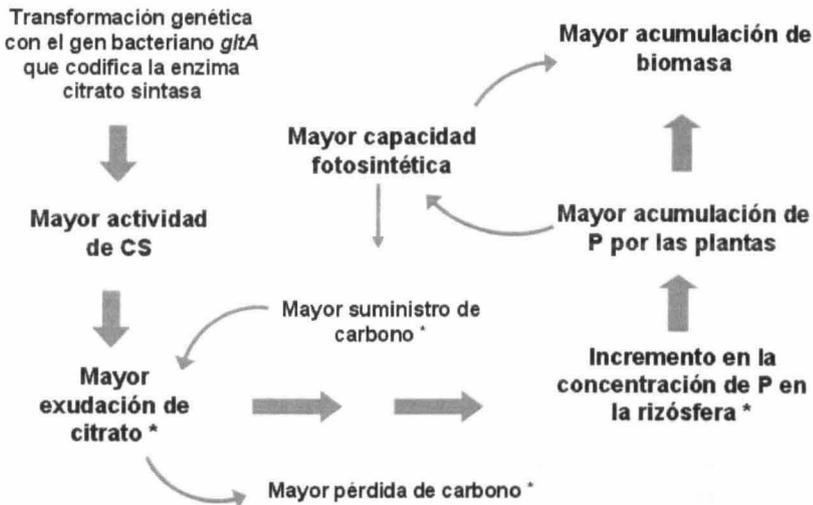
El fósforo constituye un elemento vital para las plantas, sin embargo su poca disponibilidad en los suelos del mundo entero constituye uno de los principales estreses ambientales a los que se enfrentan las plantas, y de los factores más importantes que limitan la producción agrícola.

Las respuestas de las plantas a la deficiencia de fósforo son muy amplias e incluyen cambios morfológicos en sus sistemas radicales, asociaciones con otros microorganismos de la biota edáfica, modificaciones de la rizósfera y hasta cambios bioquímicos dentro de la planta que le permiten enfrentar y sobrevivir al estrés por deficiencia de fósforo. (Abel *et al.*, 2002; Plaxton, 2004). Una de estas estrategias es la exudación de ácidos orgánicos, los cuales son compuestos carbonados de bajo peso molecular, eficientes para desplazar al fósforo de compuestos insolubles e incrementar la concentración y disponibilidad de dicho elemento en la rizósfera para las plantas (Jones, 1998; Ryan *et al.*, 2001). Este modelo para enfrentar con éxito al estrés por deficiencia de fósforo se ha aplicado dentro de la ingeniería genética para conferir la misma capacidad a plantas que generalmente carecen de ella. (Takita *et al.*, 1999; Koyama *et al.*, 2000; López Bucio *et al.*, 2000).

La pérdida de carbono por exudación de ácidos orgánicos tiene un costo energético alto como se ha comprobado en muchas especies donde se induce la liberación de dichos compuestos (Lynch y Ho, 2005). Respecto a esto, algunos autores (Taylor, 1991; Rengel, 2002; Lynch y Ho, 2005) han sugerido posibles efectos negativos sobre el crecimiento en plantas genéticamente transformadas para exudar de manera constitutiva ácidos orgánicos. Sin embargo, hasta ahora los reportes sobre manipulación genética para sobreexpresar enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos orgánicos (De la Fuente *et al.*, 1997; Takita *et al.*, 1999; Koyama *et al.*, 2000; López-Bucio *et al.*, 2000; Delhaize *et al.*, 2001; Hoeren *et al.*, 2001; Tesfaye *et al.*, 2001; Rosellini *et al.*, 2002; Kawazu *et al.*, 2003; Anoop *et al.*, 2003) no apoyan esta hipótesis. Los resultados mostrados en este trabajo tampoco lo hacen, sino al contrario coinciden consistentemente con lo ya publicado hasta ahora. La mayor actividad de la enzima citrato sintasa en las líneas genéticamente transformadas de papaya respecto a los controles negativos, similar a lo hallado en tabaco (De la Fuente *et al.*, 1997; López-Bucio *et al.*, 2000; Hoeren *et al.*, 2001) y *arabidopsis* (Koyama *et al.*, 2000) está estrechamente relacionada con el mayor contenido de fósforo inorgánico insoluble cuantificado en las hojas y la mayor ganancia de biomasa en las plantas transformadas. Esto sugiere que un posible incremento en las

concentraciones de citrato interno, producto de la mayor actividad de CS, pudiera estar ocasionando, de hecho, un incremento en la liberación de citrato hacia la rizósfera, solubilizando el fósforo precipitado por la presencia de calcio, e incrementando los contenidos de dicho elemento en la parte aérea de la planta.

La posible mayor pérdida de carbono por la exudación de citrato en estas plantas pudiera estar siendo compensada por incrementos en la tasa neta de fijación de CO<sub>2</sub>, los cuales se hallaron en los primeros meses de crecimiento de las plantas transformadas genéticamente. Este es el primer trabajo donde se analizan los efectos de la transformación genética con genes que participan en la síntesis de ácidos orgánicos en un frutal tropical, en condiciones alcalinas, sin embargo se requiere caracterizar un mayor número de líneas transformadas para determinar detalladamente las relaciones entre la mayor toma de fósforo, y el balance de carbono dentro de la planta.



**Figura 5.1** Esquema hipotético de cambios asociados con la transformación genética de papaya con el gen *gltA* de *Pseudomonas aeruginosa*, que codifica para la enzima citrato sintasa. Se señalan (\*) los posibles eventos no evaluados en este trabajo, pero que pudieran estar ocurriendo en la planta y en el suelo.

## 5.1 LITERATURA CITADA

- Abel S, Ticconi CA, Delatorre CA (2002) Phosphate sensing in higher plants. *Physiol Plant* 115: 1-8.
- Anoop VM, Basu U, McCammon MT, McAlister-Henn L and Taylor GJ (2003) Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol* 132: 2205–2217.
- Delhaize E, Hebb DM, Ryan PR (2001) Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol* 125: 2059-2067.
- De la Fuente JM, Ramírez-Rodríguez V, Cabrera-Ponce JL and Herrera-Estrella L (1997) Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthase. *Science* 276 (6): 1566-1568.
- Hoeren FU, Richardson AE, Hocking P, Delhaize E (2001) Overexpression of an endogenous citrate synthase gene in tobacco. *In: Plant nutrition-Food security and sustainability of agro-ecosystems*. Horst WJ (Ed.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Bélgica. 201-202.
- Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant Soil* 205: 25-44.
- López-Bucio J, Martínez de la Vega O, Guevara-García A and Herrera-Estrella L (2000) Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nat Biotechnol* 18 (4):450-453
- Lynch JP, Ho MD (2005) Rhizoeconomics: carbon costs of phosphorus acquisition. *Plant Soil* 269 (1-2): 45-56
- Plaxton WC (2004) Plant response to stress: biochemical adaptations to phosphate deficiency. *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. Marcel Dekker Inc. 976-980.
- Kawazu T, Susuki Y, Wada T, Kondo K and Koyama H (2003) Overexpression of a plant mitochondrial citrate synthase in *Eucalyptus*

trees. Plant Biology 2003. Honolulu, Hawaii, USA. Nutrient Biology. Disponible en: <http://abstracts.aspb.org/pb2003/public/P39/0313.html>.

Koyama H, Kawamura A, Kihara T, Hara T, Takita E, Shibata D (2000) Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. Plant Cell Physiol 41(9):1030-1037.

Rengel Z (2002) Genetic control of root exudation. Plant Soil 245: 59-70.

Rosellini D, Barone P, Bouton J, LaFayette P, Sledge M, Veronesi F, Parrott W (2003) Aluminum tolerance in alfalfa with the citrate synthase gene. In: Abstracts for the 38<sup>th</sup> NAAIC 2002. Sacramento, CA: The North American Alfalfa Improvement Conference. California, EUA.

Ryan PR, Delhaize E, Jones DL (2001) Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 52: 527-560.

Takita E, Koyama H, Hara T (1999) Organic acid metabolism in aluminum-phosphate utilizing cells of carrots (*Daucus carota* L.) Plant Cell Physiol 40: 489-495.

Taylor GJ (1991) Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of the tolerance. Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology. 6: 57-93.

Tesfaye M, Temple SJ, Allan DL, Vance CP, Samac DA (2001) Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminium. Plant Physiol. 127:1836-1844.

## Capítulo VI. Perspectivas

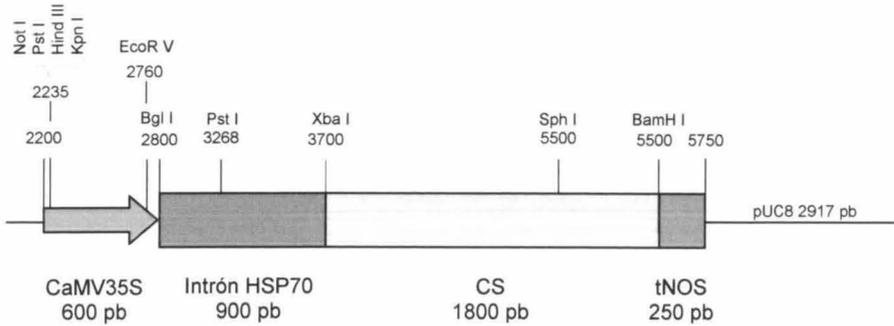
- ❖ Determinar el patrón de integración del transgen *gltA* en las dos líneas genéticamente modificadas evaluadas en este trabajo (C11-35S y C30-100 Ubi).
- ❖ Analizar los niveles de expresión del gen *gltA* en las líneas genéticamente transformadas bajo condiciones de suelo alcalino, y determinar su relación con la cantidad y actividad de la enzima citrato sintasa, cantidad y exudación de citrato.
- ❖ Comparar la acumulación de biomasa en plantas que sobreexpresan la enzima citrato sintasa respecto a plantas sin transformar, bajo niveles sub-óptimos y óptimos de fósforo, y la capacidad de toma de fósforo en ambos tipos de plantas.
- ❖ Determinar la capacidad fotosintética de plantas transformadas con el gen *gltA* bajo niveles sub-óptimos y óptimos de fósforo, cuantificando la cantidad y actividad de la enzima carboxilante rubisco.
- ❖ Determinar el efecto de los transgenes en la calidad del fruto y el rendimiento.



## Capítulo VII. Anexos

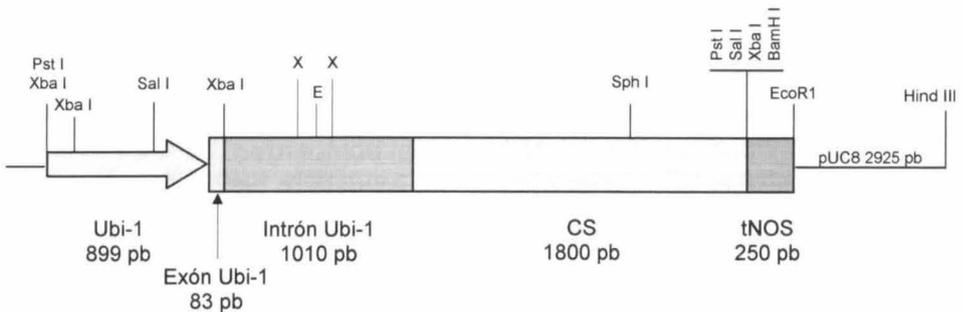
### 7.1 ANEXO I. ESQUEMA DE LOS PLÁSMIDOS UTILIZADOS

#### p35CITS (6467 pb)



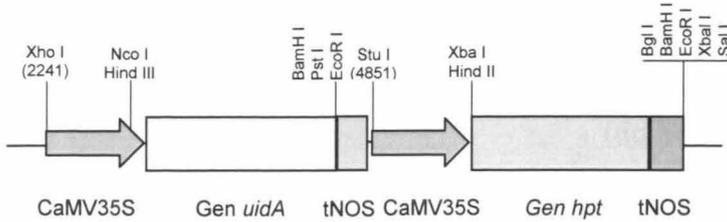
**Figura 7.1** Esquema de la construcción del vector p35CITS, conteniendo la secuencia del gen *gltA* de *Pseudomonas aeruginosa* que codifica para citrato sintasa (CS). CaMV35S = Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. tNos = Terminador del gen de nopalina sintasa.

#### pUBICITS (6967 pb)



**Figura 7.2** Esquema de la construcción del vector pUBICITS, conteniendo la secuencia del gen *gltA* de *Pseudomonas aeruginosa* que codifica para citrato sintasa (CS). Ubi-1 = Promotor Ubi-1 de la ubiquitina1 de trigo. tNos = Terminador del gen de nopalina sintasa. X = Xba I. E = EcoR I.

## pWRG 1515 (7665)



**Figura 7.3** Esquema de la construcción del vector pWRG 1515, conteniendo al gen reportero GUS (*uidA*) y el gen para resistencia a higromicina (*hpt*). CaMV35S = Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. tNos = Terminador del gen de nopalina sintasa.

## 7.2 ANEXO II. MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA POR BIOBALÍSTICA EMPLEADO EN LA GENERACIÓN DE LAS LÍNEAS TRANSFORMADAS DE PAPAYA

El protocolo de transformación genética mediante biobalística que se describe a continuación fue proporcionado gentilmente por el Dr. José Luis Cabrera, del Centro de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato.

Las etapas para la obtención de las líneas de papaya genéticamente modificadas mediante biobalística fueron:

- Preparación del material biológico.
- Preparación de los microproyectiles.
- Aislamiento y purificación del ADN para el bombardeo.
- Recubrimiento de las micropartículas de tungsteno con el ADN.
- Bombardeo del material biológico
- Ensayos para detectar la expresión transitoria del gen (s) reportero (s).

### a) Preparación del material biológico para la transformación genética

- 1.- Se tomó como pauta para la formación de callos organogénicos-embriogénicos la proliferación de estructuras organogénicas típicas en forma múltiple (más de 20 estructuras meristemáticas por callo y de 5 a 10 embriones somáticos).
- 2.- Los callos se subdividieron (se disectaron en segmentos de 3 mm sin usar bisturí, simplemente la separación con las pinzas de disección para evitar el

mínimo daño mecánico) y se subcultivaron al medio de inducción (MPC) para su propagación.

3.- Una vez inducidos, los callos se propagaron en condiciones de oscuridad a 27°C cada 10-14 días.

4.- Para cada experimento se prepararon 25 placas con callos organogénicos-embriogénicos, con 50 mg de peso fresco por placa. Los callos se colocaron en el centro de la caja de petri en un área de 4 cm<sup>2</sup>.

## **b) Preparación de los microproyectiles de tungsteno**

La técnica de preparación de los microproyectiles que se describe a continuación, es de acuerdo a Tomes et al. (1995), modificado por Cabrera et al. (1997) (CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato).

1.- Pesar 60 mg de partículas de tungsteno.

2.- Resuspender en 2 ml de HNO<sub>3</sub> 0.1N y sonicar por 20 minutos.

3.- Centrifugar a 10 000 rpm por 2 minutos.

4.- Eliminar el sobrenadante y aplicar 2 ml de etanol concentrado, sonicar brevemente.

5.- Centrifugar a 10 000 rpm por 2 minutos.

6.- Eliminar el sobrenadante, resuspender en 1 ml de agua desionizada estéril.

7.- Tomar 4 alícuotas de tungsteno de 250 µl, resuspender en 750 µl con agua desionizada estéril en cada uno de los tubos.

8.- La concentración final de tungsteno en cada uno de los tubos es de 15 µg µl<sup>-1</sup>.

9.- Almacenar a -20°C.

## **c) Aislamiento y purificación del ADN para el bombardeo**

El método de extracción alcalina y purificación del ADN para el bombardeo que se describe a continuación, es de acuerdo a Birnboim et al. 1979. Soluciones empleadas para este método son:

Solución I

Glucosa 50 mM

Tris-HCl pH 8.0 25 mM

EDTA pH 8.0 10 mM

Solución II

NaOH 0.2 N

SDS 1%

Solución III

Acetato de Potasio 3 M

Ácido acético glacial 11.5% 5 M

- 1.- Se inoculan 5 ml de la cepa de *Escherichia coli* de la cual se desee extraer el plásmido, en 500 ml de medio de cultivo LB con los correspondientes antibióticos selectivos.
- 2.- Se incuba a 37 °C por 12 horas.
- 3.- Las células de *E. coli* se centrifugan y se recupera la pastilla.
- 4.- Se resuspende en 10 ml de la solución I, se agregan 400 µg de lizosima (de una solución de 100 mg ml<sup>-1</sup> y se incuba por al menos 5 minutos a temperatura ambiental.
- 5.- Se agregan 20 ml de la solución II y se mezcla invirtiendo la botella hasta que se obtenga una solución viscosa. Se incuba a temperatura ambiental por 2 a 3 minutos.
- 6.- Se agregan 15 ml de la solución III, tan rápido como sea posible y se mezcla por inversión de la botella. En este punto se forma un precipitado blanco de proteínas-SDS. Se incuba en hielo por 30 minutos.
- 7.- Se centrifuga a 4000 rpm por 15 minutos. Repetir el proceso.
- 8.- Se transfiere el sobrenadante y se precipita el DNA con 0.7 vol de isopropanol. Se incuba a -20°C por al menos 1 hora.
- 9.- El ADN precipitado se centrifuga a 4000 rpm por 5 minutos y se obtiene una pastilla blanca de ADN.
- 10.- El ADN se lava con etanol al 70% y se centrifuga.
- 11.- Se elimina el sobrenadante y se deja secar la pastilla.
- 12.- Se resuspende la pastilla en 1 ml de buffer TE.
- 13.- Se agrega una solución de LiCl 2 M y se incuba en hielo por 30 minutos. El LiCl precipita RNA de alto peso molecular.
- 14.- Se centrifuga por 15 minutos y se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo.
- 15.- Se adicionan 10 ml de fenol-cloroformo/SEVAG2X.
- 16.- El ADN se precipita con 2 volúmenes de etanol, se centrifuga y se obtiene una pastilla seca.
- 17.- El ADN se resuspende en 300 µl de buffer TE.
- 18.- Se agregan 30 µl de RNAasa y se incuba a 37 °C por 1 hora.
- 19.- Agregar Fenol/SEVAG.
- 20.- Se adicionan 10 ml de fenol-cloroformo/SEVAG2X.
- 21.- El ADN se precipita con 2 volúmenes de etanol y 1 volumen de Acetato de Amonio 3M, se incuba a -20°C por 20 minutos, se centrifuga y se deja la pastilla hasta secarse.
- 22.- El ADN se lava con etanol al 70%, se centrifuga y se deja la pastilla hasta secarse.
- 23.- El plásmido purificado se resuspende en 100 µl de buffer TE.
- 24.- El ADN se cuantifica por el método fluorométrico y se ajusta a una concentración de 1 µg µl<sup>-1</sup>.

#### **d) Recubrimiento de los microproyectiles de tungsteno con el ADN**

El protocolo de preparación del DNA y el tungsteno se describe a continuación, de acuerdo a Tomes *et al.* (1995), modificado por Cabrera *et al.* (1997) (CINVESTAV IPN, UNIDAD IRAPUATO).

- 1.- Mezclar: 50  $\mu$ l de tungsteno (750  $\mu$ g).  
5  $\mu$ g de ADN.  
50  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  2.5 M.  
20  $\mu$ l de espermidina base libre 0.1 M.

Nota: Esta preparación sirve para 6 disparos.

- 2.- Mezclar y sonicar hasta observar homogéneo el tungsteno.
- 3.- Centrifugar por 10 segundos a 10 000 rpm.
- 4.- Lavar con 400  $\mu$ l de etanol concentrado.
- 5.- Centrifugar por 10 segundos a 10 000 rpm.
- 6.- Eliminar el sobrenadante.
- 7.- Resuspender en 60  $\mu$ l de etanol concentrado.
- 8.- Sonicar brevemente.
- 9.- Aplicar 10  $\mu$ l de la mezcla en las membranas de kapton (macroacarreadores).
- 10.- Por cada disparo hay 125  $\mu$ g de tungsteno con 1.6  $\mu$ g de DNA.
- 11.- Este protocolo se lleva a cabo minutos antes de empezar el bombardeo, no se recomienda dejarlo por menos de 1 hora, debido a la posibilidad de que se hidrate la muestra y no pueda ser proyectado el tungsteno-DNA (partículas en polvo) al momento del impulso con helio.

#### **e) Bombardeo de micropartículas recubiertas con el ADN**

El sistema de bombardeo de micropartículas que se utilizó en este trabajo es el sistema de helio de alta presión PDS 1000-He, diseñado por Sanford *et al.* (1991). Los detalles técnicos del funcionamiento del sistema de bombardeo con helio PDS 1000-He están descritos por el fabricante BioRad (1991). Los parámetros usados en la generación de las líneas de papaya fueron los siguientes:

- Presión de bombardeo: 800 psi.
- Número de disparos por placa: 1.
- Tamaño de partículas: m10 (0.73  $\mu$ m).
- Concentración de partículas: 125  $\mu$ g por disparo.
- Concentración de ADN: 1.66  $\mu$ g por disparo.
- Evacuación: 0.07 atmósferas.
- Distancia recorrida por el ADN/tungsteno: 7.0 cm.

## **f) Ensayos para detectar la expresión transitoria del gen (s) reportero (s)**

1.- El análisis de la expresión transitoria de la  $\beta$ -glucuronidasa, utilizada como gen reportero se llevó a cabo mediante el ensayo histológico de acuerdo a Jefferson *et al.* (1987), modificado por (McCabe *et al.* 1988).

2.- Los explantes bombardeados se incuban en una solución de tinción, la cual consiste en un reactivo (X-Gluc) que al ser hidrolizado por la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, precipita un color azul índigo, detectable en los sitios de expresión.

Preparación del reactivo para el ensayo (para 100 ml):

Disolver 50 mg de X-Gluc en 1 ml de dimetilformamida ó DMSO.

Preparar el siguiente buffer:

Fosfato de sodio pH 7.0 100 Mm: Tomar 10 ml de una solución 1M

EDTA 10 mM pH 8.0: Tomar 20 ml de una solución 0.5M

$K_4Fe(CN) 6 \cdot 3H_2O$  0.5 mM : Agregar 0.021 g

Tritón X100 al 0.1% : Agregar 0.1 ml

Agitar bien, aforar a 100 ml y agregar el X-Gluc disuelto.

Esterilizar por ultrafiltración y guardar en el refrigerador.

### 7.3 LITERATURA CITADA

- Biorad (1991) Instruction Manual for Biolistic PDS-1000/He microprojectile delivery system. Biorad, Richmond, CA.
- Birnboim HC y Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1516
- Cabrera-Ponce, JL, López L, Assad-Garcia N, Medina-Arévalo C, Bailey-Moreno AM, Herrera-Estrella L (1997) An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) *Plant Cell Rep* 16 : 255-260.
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molec Biol Rep* 5: 387-405.
- McCabe DE, Swain WF, Martinell BJ, Christou P (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/technology* 11: 596-598.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: laboratory manual*. 2a. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. Nueva York, EUA. 840 p.
- Sanford JC, DeVit MJ, Russell JA, Smith FD, Harpending PR, Roy MK, Johnston SA (1991) An improved helium-driven biolistic device. *Technique*. 3: 3-16.
- Tomes DT, Ross MC, Songstad DD (1995) Direct DNA transfer into intact plant via microprojectile bombardment. *In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods, Springer Lab Manual*. Gamburg OL, Phillips GC (Eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania. 197-213.