

Implementación de un sistema de biobalística para la transformación genética de plantas en la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC)

Gabriel R. Vellicce*, Aldo S. Noguera**, M. Paula Filippone* y Atilio P. Castagnaro***

Introducción

Desde el inicio de la agricultura, el hombre ha manipulado genéticamente las plantas cultivadas por medio del mejoramiento clásico, en el cual las características fenotípicas de interés, determinadas por genes, son transferidas a la progenie a través de cruzamiento sexual. Sin embargo, estos métodos convencionales son lentos y presentan una serie de dificultades, como por ejemplo, la ligación de caracteres de interés con otros indeseables, la inexistencia del carácter deseado en el germoplasma relacionado y la incompatibilidad sexual, entre otros.

Actualmente, el mejoramiento puede recurrir a la ingeniería genética mediante una combinación de técnicas de biología molecular, técnicas de cultivo de tejidos y de transgénesis o transformación genética, por medio de las cuales se puede mejorar o introducir nuevas características a los cultivos de una forma más rápida y precisa. Mediante la transgénesis se puede superar la barrera del cruzamiento sexual, lo que abre el espectro de genes candidatos a ser transferidos: es posible aislar genes de cualquier origen (especies vegetales emparentadas o no, animales o microorganismos) y transferirlos al cultivo a mejorar.

Existen distintos métodos para transferir genes, entre los cuales los más comúnmente utilizados son la biobalística o “bombardeo de microproyectiles”. A este fin, también se utilizan organismos biológicos como virus o bacterias, por ejemplo *Agrobacterium tumefaciens*.

El sistema de transformación genética por biobalística, utiliza microproyectiles acelerados a alta velocidad para introducir ácidos nucleicos y otras moléculas en células y tejidos *in vivo*. Este sistema fue propuesto inicialmente por Sanford *et al.* (1987), con el objetivo de introducir material genético en el genoma nuclear de plantas superiores, y constituye un proceso simple y efectivo para la introducción y

expresión de genes en bacterias, protozoos, hongos, algas, insectos, plantas y tejidos animales (Rech *et al.*, 1996).

En el sistema de biobalística se utiliza un acelerador de partículas comúnmente conocido como pistola de genes o “gene gun”. Las secuencias de ácidos nucleicos a transferir (transgén), son transportadas por micropartículas (de 0,2 a 4 μm de diámetro), las que se aceleran a velocidades superiores a 1500 km/h y se proyectan sobre el material a transformar.

La alta velocidad a la que las partículas son impulsadas se consigue por explosión de pólvora seca o liberación de gas comprimido a alta presión (aire, helio, CO_2 o N_2).

Se demostró que las partículas de oro o tungsteno penetran la pared y la membrana celular de un modo no letal, alojándose al azar en las organelas celulares. Una vez dentro de la célula, el ADN se disocia de la micropartícula por la acción del líquido celular y se integra en el genoma nuclear del organismo receptor.

El sistema basado en gas helio con alta presión posee un amplio espectro de utilización y fue el más eficiente para la obtención de altas frecuencias de transformación en diferentes especies vegetales. Este sistema se utilizó en casi la totalidad de las plantas transgénicas obtenidas mediante el sistema de biobalística (Rech y Aragao, 1998).

En la Sección Biotecnología de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), se instaló un equipo acelerador de micropartículas basado en gas helio y se realizaron ensayos de expresión transitoria con genes marcadores, con el objetivo de optimizar los parámetros involucrados en el proceso de transformación genética de cultivos de interés regional, tales como soja y caña de azúcar.

* Dr. Cs. Biológicas; ** Ing. Agr.; ***Dr. Ing. Agr., Sección Biotecnología, EEAOC.

Metodología

El equipo de biobalística instalado en el Laboratorio de la Sección Biotecnología funciona con gas helio a alta presión (Figura 1). Posee una cámara donde se presuriza el gas hasta el nivel deseado utilizando un regulador de presión. Para liberar la onda de choque, se activa una válvula solenoide eléctrica que hace bajar una aguja, la cual perfora unas membranas denominadas membranas de ruptura. El gas liberado impulsa la membrana portadora de las micropartículas recubiertas con el ADN, las cuales impactan en el tejido vegetal a transformar o explanto. La cámara donde se aloja el material vegetal se encuentra en condiciones de vacío parcial para reducir la fuerza de rozamiento del aire sobre las micropartículas y minimizar su desaceleración (Figura 2).

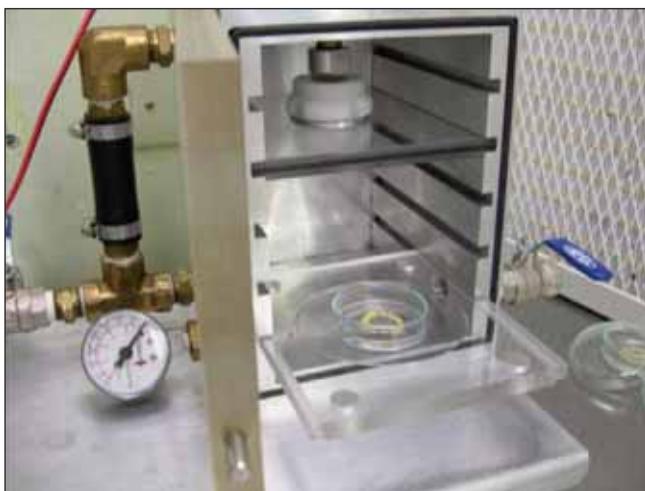


Figura 1. Equipo de biobalística o "gene gun", utilizado en la Sección Biotecnología de la EEAOC.

Las partículas van recubiertas por el ADN o gen de interés, el cual a su vez va acompañado de otras secuencias (promotor y terminador), y genes que facilitan la inserción en el genoma de la célula receptora, la selección de las células transformadas y la posterior

expresión del carácter introducido. El conjunto de los genes antes mencionados constituye lo que se denomina vector de transformación.

Para optimizar los parámetros involucrados en el bombardeo de micropartículas, se utilizó un gen marcador o reportero, el cual fue colocado en dos vectores de transformación: uno apropiado para dicotiledóneas (pGV) y el otro apropiado para monocotiledóneas (pFN1). El gen marcador es un gen cuyo producto es fácilmente detectable, y se usa para verificar la transferencia del transgén a una célula o tejido. En este trabajo, se utilizó como marcador de expresión el gen *uidA* de *Escherichia coli*, que codifica para la enzima β -glucuronidasa (Jefferson, 1987). La detección se realizó con el reactivo X-GLUC (ácido 5-bromo, 4-cloro, 3-indolil β -glucurónico), un sustrato artificial que al ser hidrolizado por la enzima libera un grupo índigo, de fuerte coloración azul, que precipita en el sitio de la reacción (GUS positivo). Luego de una incubación, se observó el material bajo lupa (40x) para contar los puntos azules, ya que cada punto indica un sitio de transformación y expresión del gen marcador.

En los ensayos de soja se utilizaron semillas maduras del cultivar Munasqa, de las que se extrajeron los ejes embrionarios y se removieron las hojas primarias a fin de exponer la región meristemática. Se utilizaron en total 72 embriones distribuidos en seis placas de bombardeo, con 12 embriones en cada una (Figura 3), y se efectuó un disparo por placa. El bombardeo se realizó con micropartículas de tungsteno recubiertas con el plásmido pGV (dicotiledóneas) y, como control, se bombardearon embriones con micropartículas sin ADN.

En el caso de caña de azúcar, el tejido o explanto utilizado en los bombardeos fueron callos (tejido indiferenciado), originados a partir de ápices caulinares a los que se les removieron las vainas remanentes, hasta obtener cilindros de 7 cm de longitud y 0,5 cm de diámetro. Se cortaron discos de 1 mm de espesor, que se cultivaron en medio de inducción de callos durante

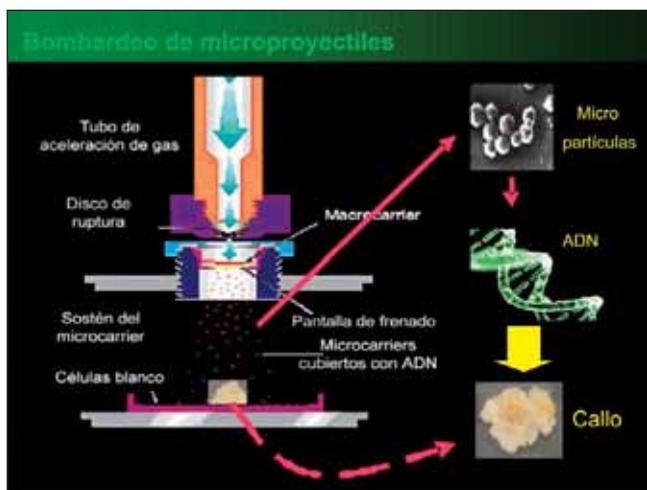


Figura 2. Detalle de componentes y funcionamiento del equipo de biobalística.

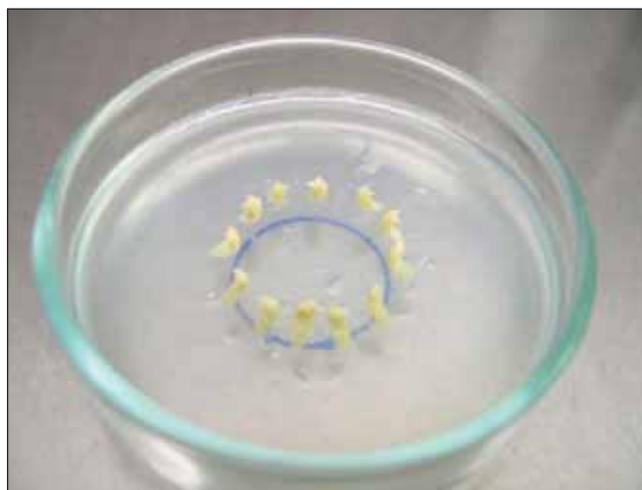


Figura 3. Embriones de soja colocados en placa de Petri, listos para ser bombardeados.

aproximadamente dos meses. Cuatro horas antes del bombardeo, se cortaron porciones de callo y se dispusieron en forma circular en placas de Petri (Figura 4) que contenían un medio osmótico para favorecer la plasmólisis celular. Se utilizaron 72 callos dispuestos en grupos de 12 por placa.

El bombardeo se realizó con micropartículas de tungsteno recubiertas con el vector pFN1 (monocotiledóneas) y, como control, se bombardearon callos con micropartículas sin ADN. A las 24 h del bombardeo, se realizó la tinción histoquímica con X-Gluc y se contaron los puntos azules indicativos de actividad GUS positiva, en los callos de caña de azúcar y en los embriones de soja.

Resultados

Podemos destacar que ambos vectores fueron efectivos para lograr la expresión del gen reportero en los materiales vegetales utilizados. Esto indica que los vectores fueron construidos correctamente y que los promotores seleccionados fueron adecuados para las especies en estudio (Figuras 5 y 6).

Cabe mencionar que en los embriones y en los callos de todas las placas bombardeadas, se observaron puntos azules correspondientes a la actividad de la enzima β -glucuronidasa, pero se encontraron diferencias respecto al número de puntos azules entre ambos

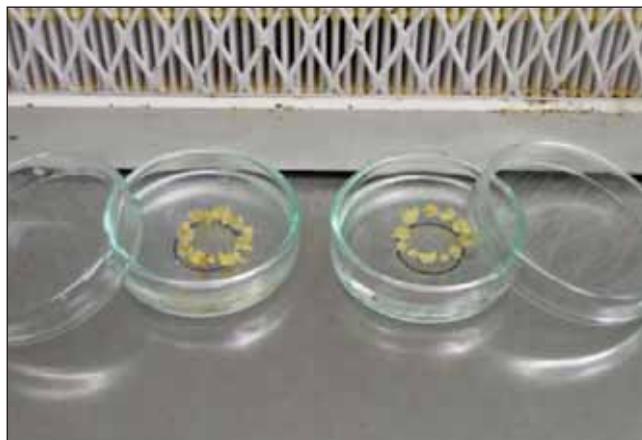


Figura 4. Callos de caña de azúcar listos para ser bombardeados.



Figura 5. Detección histoquímica de la actividad del gen reportero *uidA* en callo de caña de azúcar, con actividad GUS positiva (coloración azul).

tipos de explantos (embriones y callos), y entre los distintos disparos (Tabla 1). Considerando que la biobalística es un método físico de transformación, posiblemente esto se deba a las variaciones de posición del material vegetal en la placa, al estado de hidratación del explanto, al nivel de vacío, a la carga de partículas de ADN en las membranas portadoras, etc., parámetros todos que inciden en la penetración de las partículas en el material vegetal bombardeado y, por lo tanto, en la eficiencia de la transformación.

Consideraciones finales

Los resultados obtenidos mostraron que el bombardeo con micropartículas permitió la transformación de embriones de soja y de callos de caña de azúcar con el gen marcador *uidA*.

El sistema de biobalística utilizado en la EEAOC funcionó con éxito en la transformación genética de soja y caña de azúcar, por lo que es posible su utilización para la incorporación de genes de interés agronómico.

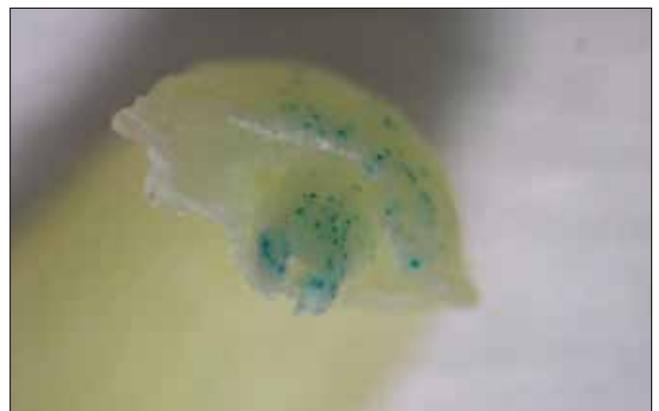


Figura 6. Detección histoquímica de la actividad del gen reportero *uidA* en embriones de soja, con actividad GUS positiva (coloración azul).

Tabla 1. Cuantificación de la actividad GUS (+) en embriones de soja y en callos embriogénicos de caña de azúcar. Los puntos azules corresponden a los sitios donde penetraron las partículas y se expresó el gen reportero.

Número de disparo	Nº total de puntos azules	
	En embriones de soja	En callos de caña de azúcar
1	115	232
2	79	130
3	82	194
4	46	230
5	193	162
6	98	152
Totales	613	1100
Promedio	8,5/ embrión	15,2/ callo
Control*	0	0

*Corresponde a explantos bombardeados con micropartículas sin ADN.

Bibliografía citada

Jefferson R. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405.

Rech, E. L. e F. J. L. Aragao. 1998. Biobalística. En: Miranda Brasileiro, A. C. e V. Tavares de Campos Carneiro (eds.), *Manual de transformação genética de plantas*. EMBRAPA, Brasília, DF, Brasil, pp. 51-63.

Rech, E. L.; R. de Bem and F. J. L. Aragao. 1996. Biolistic mediated gene expression in cattle tissues *in vivo*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29: 1265-1267.

Sanford, J. C.; T. M. Klein, E. D- Wolf and N. Allen. 1987. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. *Particle Science Technology* 5: 27-37.



COTA Ltda.
COOPERATIVA DE PRODUCTORES CITRICOLAS de TAFI VIEJO

LA CALIDAD COMO ESTILO DE VIDA

JUGO CONCENTRADO
ACEITE ESENCIAL
CASCARA DESHIDRATADA

Diagonal a Tafi Viejo Km. 6 - 4103 - Tafi Viejo - Tucumán - Argentina
Tel/Fax: (54-381) 4 61-8626 / (54-381) 4 61-8983
E-mail: cota@cotaltd.com - www.cotaltd.com



AgroLAJITAS
Siempre pensando en su campo



CASA CENTRAL: Av. Alfredo Guzmán 10 - Alderetes, Tucumán - CP 4178
Tel/Fax: 0381- 4943630/ 4940040 - E-Mail: info@agrolajitassa.com.ar
Ventas: Sergio Studdert, Cel: 3816309533 - E-mail: sergio@agrolajitassa.com.ar

JUAN B. ALBERDI (Tucumán): Luis F. Nogués 530 - Tel/Fax: 03865-471313 - CP 4158
Contacto: Martín Pfister, Cel: 3815657407 - E-mail: martin@agrolajitassa.com.ar

LAS LAJITAS (Salta): Complejo Las Lajitas - Rutas Provinciales 5 y 30, Puerta 50 - Tel/Fax 03865-471313
Contacto: Ing. Bernabé Forenza Cel: 03816309532; E-Mail: bernabe@agrolajitassa.com.ar

ROSARIO DE LA FRONTERA (Salta): Roca 33 - Tel/Fax: 03876-481933
Contacto: Guillermo Abraham, Cel: 03876-15661165 - E-mail: rosario@agrolajitassa.com.ar

METÁN (Salta): Ruta 34 km 1462 esq. Av. Libertad, San José de Metán, Salta - CP 4440 - Tel/Fax: 03876-425050
Contacto: Ing. Alejandro Brazzales, Cel: 0387154638030 - E-mail: metan@agrolajitassa.com.ar

PICHANAL (Salta): Ruta 34 km 1130 - Tel/Fax: 03788-493536
Contacto: Ing. Raúl Alfaro, Cel: 03878560285 - E-mail: raul@agrolajitassa.com.ar

QUIMILI (Sgo. del Estero): Rivadavia 555 - Tel/fax: 03843-421173
Contacto: Ing. Esteban Anadón, - Cel: 3855-192150 - E-mail: esteban@agrolajitassa.com.ar

FERNÁNDEZ (Sgo. del Estero): Ruta 34 km - Contacto: Mónica Molli, - Cel: 3855192990 - E-mail: fernandez@agrolajitassa.com.ar

CATAMARCA: Esquíú 749 - Tel/fax: 03833-431133 - Contacto: Ing. Rudelli, - Cel: 038334409635 - E-mail: catamarca@agrolajitassa.com.ar