

DESARROLLO DE METODOLOGÍA PARA LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE ESPECIES DE AGAVE MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* Y BASADO EN EL PROCESO DE ORGANOGÉNESIS.

Gutiérrez Aguilar P. R., Gil-Vega K.C., Simpson J.*

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato. Departamento de Ingeniería Genética, Km. 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato León, 36821 Irapuato, Guanajuato, México.

* jsimpson@ira.cinvestav.mx

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es desarrollar un protocolo eficiente de transformación genética para *Agave tequilana* y *Agave desmettiana*, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, teniendo como explantes meristemos apicales de bulbilos de las dos especies, ya que para las plantas de este género el estudio de genes de interés se encuentra limitado, por lo que la manipulación genética constituye un valioso apoyo para numerosas investigaciones y aplicaciones de interés tanto científico como industrial. El vector utilizado contiene los genes reporteros GUS y GFP. Las cepas de *Agrobacterium* utilizadas fueron LBA4404 y GV2260, la transformación se realizó por co-cultivo con la bacteria, como agente de selección se utilizó fosfotricina (PPT) incluido en medio de multiplicación para agaves. Al momento y de manera preliminar, se han observado mejores resultados a los reportados previamente en *Agave salmiana* en este estudio de transformación genética que se reporta por organogénesis en *Agave tequilana* y *Agave desmettiana*.

ABSTRACT

The objective of this work is to develop an efficient protocol of genetic transformation in *Agave tequilana* and *Agave desmettiana* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, using apical meristems of bulbils as explants for both species, since genetic analysis in this genus is currently limited, genetic manipulation constitutes a valuable tool for numerous lines of research and applications of scientific and industrial interest. The vector used contains the reporter genes GUS and GFP. The strains of *Agrobacterium* used were LBA4404 and GV2260, and transformation was carried out by co-culture with the bacterium, the selective agent was phosphinothricin (PPT), included in the multiplication medium. Currently better results (preliminary) have been observed than previously reported in *Agave salmiana* in this study of genetic transformation via organogenesis in *Agave tequilana* and *Agave desmettiana*.

Palabras clave: Agave, transformación, *Agrobacterium tumefaciens*.

Área: Microbiología y Biotecnología.

INTRODUCCIÓN

La familia Agavaceae es característica de los paisajes áridos y semiáridos, (García-Mendoza, 2007), son plantas muy bien adaptadas a condiciones de aridez, con

raíces someras y ramificadas, cutícula gruesa, succulencia, estomas hundidos, metabolismo fotosintético y metabolismo ácido de crasuláceas (CAM) (Granados, 1993).

Los agaves han tenido gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas desde la época prehispánica. Los usos de mayor relevancia socioeconómica y agroecológica del Agave son: la elaboración de tequila, mezcal, conservación de suelos, como forraje y la producción de insectos comestibles para la industria gastronómica (García-Herrera *et al.*, 2010). Actualmente se ha despertado mucho interés de aprovechar especies de agave para la producción de biocombustibles tanto en México como en el extranjero (Simpson *et al.*, 2011).

A pesar de la importancia económica de las especies de agave, la investigación a nivel de genética y biología molecular y en términos biotecnológicos no ha sido desarrollada fuertemente. En general las especies de agave tienen un largo ciclo de vida, un genoma grande, son monocárpicas y en la mayoría de los casos son semi-domesticadas o silvestres. Estas características han dificultado su incorporación como modelo de estudio. Sin embargo la implementación de metodologías de secuenciación masiva a relativamente bajo costo ha permitido llevar a cabo análisis transcriptómicos en agave, abriendo el camino para el análisis a nivel molecular de la floración, desarrollo de bulbilos y el metabolismo de carbohidratos con fines de entender estos procesos particulares en agave y aprovechar este conocimiento para un aprovechamiento óptimo de las especies de agave para diferentes fines (Abraham *et al.*, 2010, Simpson *et al.*, 2011).

Aunque se han implementado varias herramientas útiles para estudiar plantas de agave como: a. análisis de expresión *in silico*, por hibridación *in situ* y con RT-PCR, b. análisis funcional de enzimas involucradas en la síntesis de oligofructanos, c. Inmunolocalización con anticuerpos y d. distintos métodos histológicos, actualmente, dada la carencia de un método eficiente para la transformación genética de especies de agave, los análisis funcionales de genes de interés se han llevado a cabo en el sistema heteróloga de *A. thaliana*. Sin embargo aunque útil, este sistema no siempre es el más adecuado (Abraham *et al.*, 2010).

Un único reporte anterior (Flores *et al.*, 2007) ha descrito la transformación de una especie del género, *Agave salmiana*, donde probaron el co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens* y el bombardeo de partículas, utilizando como gen reportero el uidA (β -glucuronidasa) para ambos métodos y como marcadores de selección usaron los genes nptII y bar para la transformación con *A. tumefaciens* y con biobalística respectivamente. La transformación de embriones somáticos derivados de callos formados en explantes de hoja vía co-cultivo con *A. tumefaciens* fue el método más eficiente, produciendo 32 plantas positivas para GUS, teniendo una eficiencia de transformación de 2.7%. Aunque exitoso el método descrito para

A. salmiana es laborioso y largo y por consecuencia no óptimo para llevar a cabo un gran número de análisis genéticos.

El desarrollo de un método sencillo y eficiente para la transformación de especies de agave abrirán las posibilidades no solo para el análisis funcional de genes sino también de mejorar molecular o tradicionalmente las especies cultivadas para incrementar o facilitar la producción y aprovechar nuevas áreas de explotación como la producción de biocombustibles.

Con este fin estamos desarrollando la metodología para la transformación de agave utilizando muestras de bulbilos obtenidos de *A. tequilana* y *A. desmettiana* basado en cocultivo de explantes meristemáticos con *A. tumefaciens*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas Bacterianas y plásmido

Se utilizaron las cepas GV2260 y LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, se transformaron con el vector pSR387 (Alatorre-Cobos *et al.*, 2012) mediante electroporación, así como la cepa GV2260 transformada con el plásmido pB7WG2D (Abraham-Juárez *et al.*, 2010), el cual contiene los genes *AtqKNOX1* y *AtqKNOX2*. El vector pSR387 contiene los genes reporteros GUS, el gen para la proteína verde fluorescente (GFP) y el gen Bar de resistencia a fosfotricina (PPT).

Obtención de explantes y desinfección: Como explantes se utilizaron bulbilos de *Agave tequilana* y *A. desmettiana*. La obtención de y desinfección de explantes (cortes de meristemas apicales de 2mm.), se realizaron en base al protocolo establecido por Nava-Cedillo (1988).

Transformación: Se crecieron las cepas de *A. tumefaciens* portadores de los genes reporteros y los controles en medio selectivo sólido, a 28°C durante 48 horas, se seleccionaron colonias independiente de *A. tumefaciens*, y se sembraron en medio selectivo líquido, se incubaron en un agitador a 28°C y 200 rpm. Se cultivaron hasta obtener una densidad óptica (OD) de 0.5. Se concentraron las células por centrifugación y se resuspendieron en medio líquido para su posterior co-cultivo. Los explantes se pusieron en contacto con la suspensión bacteriana durante unos minutos, luego se transfirieron a medio selectivo adicionado con hormonas BAP (9 mg/ml), IBA (0.6 mg/ml) y acetosiringona (Flores *et al.*, 2007). Se realizaron lavados posteriores con agua destilada y antibióticos para eliminar la bacteria, además de que se monitorearon de manera constante para minimizar contaminaciones y se realizaron cambios de explantes a medio nuevo cuando fue necesario.

RESULTADOS

Los explantes meristemáticos de bulbilos fueron adecuados para la regeneración *in vitro* de plántulas de agave según el esquema en la Figura 1.

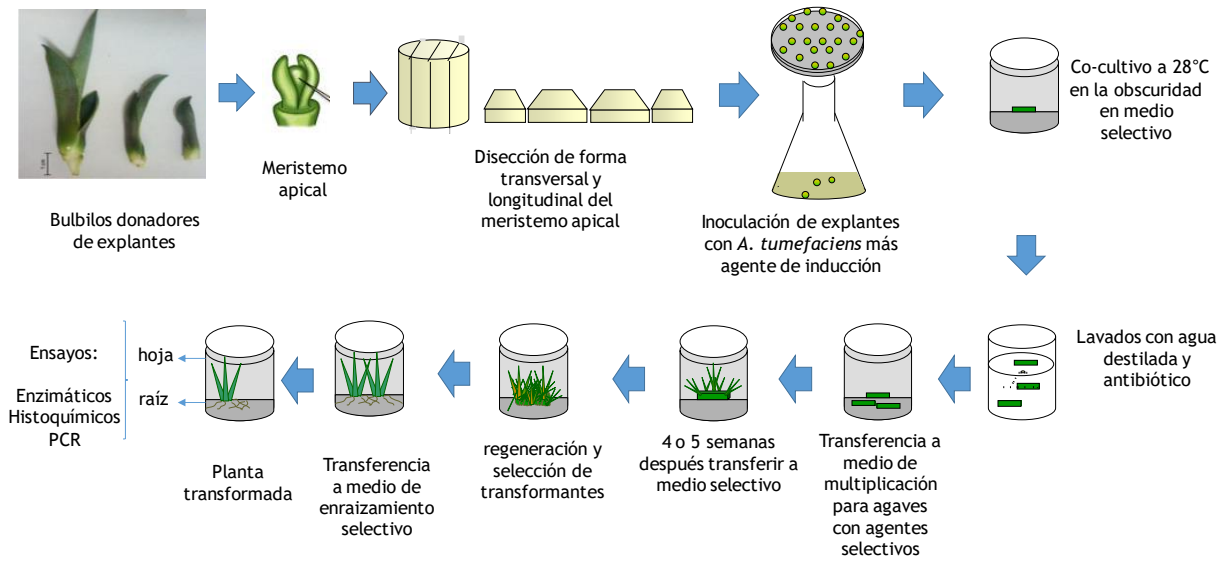


Figura 1. Diagrama de las etapas de cultivo *in vitro* y cocultivo de *Agave* con *A.tumefaciens*.

Desarrollo de brotes:

Las distintas combinaciones de cepas de *A. tumefaciens* transformadas con el plásmido pSR387 o el plásmido pB7WG2D han permitido la formación de brotes en los distintos explantes aunque se observa inhibición del desarrollo en un porcentaje de los explantes debido a la necrosis causada por la presencia de *A. tumefaciens* la cual se ha observado es mayor en explantes de *A. tequilana* que en explantes de *A. desmettiana*. Dado que iniciamos con material no-aséptico la eliminación de microorganismos es un factor importante y la contaminación ocasionada por hongos y bacterias genera pérdidas de explantes y brotes en hasta 10% de los casos.

Agave desmettiana en comparación con *A. tequilana* ha producido un mayor número de brotes por explante, con 2 a 20 brotes mientras que *A. tequilana* solo presenta de 1 a 2 brotes por explante. La rapidez en el desarrollo de los brotes también es superior en *A. desmettiana* ya que después de dos semanas de co-cultivo ya presentan los primeros brotes, mientras que en *A. tequilana* ha sido hasta la tercer semana que se observaron los primeros signos de los brotes. Otra respuesta significativa es el aumento de mayor tamaño en *A. desmettiana* después de la cuarta semana de co-cultivo, llegando a medir entre 1.5 a 2 cm. En contraste en *A. tequilana*, cuando se presenta un solo brote por explante, su aumento de tamaño es similar al de *A. desmettiana*, mientras que en los explantes donde se desarrollan 2 brotes su aumento en el tamaño es menor a las cuatro semanas llegando a tener 1.2 cm. en promedio.

Las plantas control de ambas especies de agave crecen de manera más lenta bajo selección en PPT y muestran morfología de estrés como necrosis y coloración morada, en la Figura 2 se muestra un ejemplo de ello.

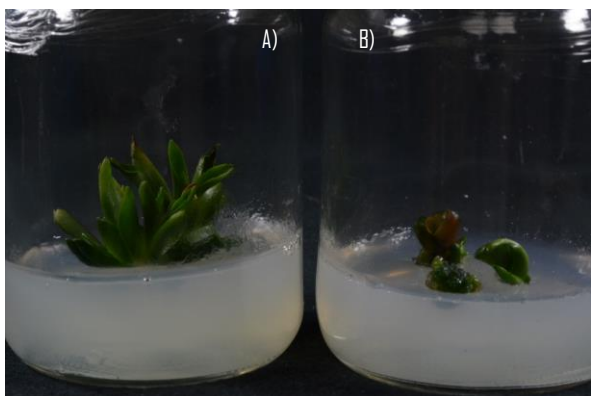


Figura 2. Regeneración de brotes (A) Brotes en medio selectivo después de cuatro meses del co-cultivo con la cepa LBA440A y el plásmido pSR387, (B) Brotes de planta control en medio selectivo.

DISCUSIÓN

No se había reportado de manera formal el uso de bulbilos como fuente de explantes para regenerar plantas vía organogénesis, los cuales representan una buena fuente de material para llevar a cabo trabajos de transformación en comparación a los hijuelos de rizoma que son pocos, la desventaja podría ser que esta fuente se tiene solo durante un período del año, pero una vez establecido el protocolo *in vitro*, es posible aprovechar estas mismas plantas como explantes. Es muy interesante la diferencia en la capacidad de regeneración que presentan las dos especies estudiadas, aunque también *A. desmettiana* tiene la facilidad de manera natural de reproducirse por bulbilos, esta puede ser la razón de que de manera intrínseca le es más fácil la reproducción asexual comparando con *A. tequilana*. También se observaron diferencias interesantes en las dos cepas utilizadas de *A. tumefaciens* LBA4404 y pSR387 que presentan mayores síntomas de estrés, con respecto a la GV2260 que contienen el mismo plásmido y la misma GV2260 con el plásmido pB7WG2D.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham JMJ, Martínez HA, Leyva GMA, Herrera EL, Simpson J. 2010. Class I KNOX genes are associated with organogenesis during bulbil formation in *Agave tequilana*. *Journal of Experimental Botany* 14:4055-4067.

Alatorre CF, Cruz RA, Hayden AC, Pérez TCA, Chauvin AL, Ibarra LE, Alva CE, Jorgensen RA, Herrera EL. 2012. Translational regulation of *Arabidopsis XIPTL1* is modulated by phosphocholine levels via the phylogenetically conserved upstream open reading frame 30. *Journal of Experimental Botany* 13:5203–5221.

Flores BBS, Jiménez BJF, Rosales MS, Argüello AGR, Castillo CR, Alpuche SAG. 2007. Genetic transformation of *Agave salmiana* by *Agrobacterium*

tumefaciens and particle bombardment. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 91:215–224.

García-Herrera EJ, Mendez GSJ, Talavera MD. 2010. El género *Agave* spp. en México: Principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 109. ISSN 1870-0160.

García-Mendoza AJ. 2007. Los agaves de México. *CIENCIAS*. 86,87:14-23.

Granados SD. 1993. Los Agaves en México. Universidad Autónoma Chapingo: México. pp. 31-35.

Nava CA. 1988. *Agave tequilana* Weber “azul” *in vitro*: un modelo para estudios en morfogénesis. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 233pp.

Simpson WJ., Martínez HA., Abraham JMJ., Delgado SSC., Sánchez V, Cortes RC. 2011. Genomic Resources and Transcriptome Mining in *Agave tequilana*. *Global Change Biology Bioenergy* 125:25-36.