

Generación de plantas transgénicas de TOMATE DE CASCARA (*Physalis ixocarpa*) que expresan el Gen de la proteína de la cápside del Virus del Mosaico del Tabaco (VMT)

M.C. Eugenio Pérez Molphe Balch
M.C. Rafael Gutiérrez Campos
IBQ Hugo Elizalde Viramontes

INTRODUCCION

Las enfermedades virales en plantas constituyen actualmente una de las principales causas de pérdidas en la agricultura (hasta un 46% en promedio de la producción anual), sólo superadas en este aspecto por la sequía. La gran magnitud que alcanzan dichas pérdidas se debe en gran medida a la carencia de métodos eficaces para el control de los virus fitopatógenos, utilizándose solamente medidas indirectas de tipo preventivo. Estos métodos no siempre dan buenos resultados y siempre resultan caros, poco prácticos o nocivos para el ambiente. La mejor forma de evitar las enfermedades virales es sin duda el uso de variedades resistentes, sin embargo, la generación de las mismas no es siempre posible, y cuando lo es, consume mucho tiempo y recursos. Afortunadamente, el gran desarrollo que ha tenido recientemente la llamada "Tecnología del ADN Recombinante", ha abierto varias opciones novedosas para el control de virus fitopatógenos y generación de plantas resistentes a los mismos. Una de estas opciones es la llamada "Protección cruzada por Ingeniería Genética" (Ver: Protección Cruzada por Ingeniería Genética: una nueva alternativa para el control de virus fitopatógenos. Investigación y Ciencia, No. 04) Esta metodología consiste básicamente en introducir al genoma de la planta el gen que codifica para la proteína de la cápside o cubierta del virus contra el que se desea proteger, de manera que la planta misma sintetice esta proteína y de tal modo adquiera resistencia ante el ataque de dicho virus. Este es un proceso complicado que requiere de varias etapas (Fig. 1). Utilizando esta metodología se han generado ya algunas variedades resistentes a virus en los E.U.A. y Europa.

En el presente proyecto de investigación, se obtuvieron plantas transgénicas de tomate de cáscara (*P. ixocarpa*) que expresan el gen de la proteína de la cápside del VMT, lo cual constituye el paso más importante para la generación de una variedad resistente a dicho virus, el cual es una importante causa de pérdidas en el cultivo del tomate de cáscara. La realización de este proyecto fue posible gracias a la colaboración del Depto. de Ingeniería Genética del CINVESTAV-IPN y al apoyo económico de la DGICSA-SEP.

METODOLOGIA Y RESULTADOS

a) Regeneración *In vitro* de *P. ixocarpa*

Un paso previo e indispensable para la transformación genética de plantas, es el desarrollo de un

sistema eficiente para la regeneración *in vitro* a través del sistema de inducción, elongación y enraizamiento de brotes adventicios. Este método consiste a grandes rasgos de la generación de plantas completas a partir de una sola célula vegetal. De esta manera si se modifica genéticamente esta célula inicial, toda la planta originada a partir de ella tendrá dicha modificación. El sistema desarrollado consiste en la generación de brotes adventicios a partir de cotiledones e hipocotilos, en un medio de cultivo de Murashige y Skoog, enriquecido con la solución de vitaminas del medio B₅ y con 2.8 mg/l de benciladenina y 0.2 mg/l de ac. naftalenacético. Los brotes así obtenidos se elongaron y enraizaron en medio enriquecido con 0.1 mg/l de ac. indolacético.

b) Desarrollo del sistema de transformación genética mediante el cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens* que contiene las construcciones químicas pB₁ 120 VMT-CP y pMON 858 VMT-CP

Existen diferentes sistemas para la introducción de genes foráneos en plantas, pero el más utilizado es el cocultivo con la bacteria fitopatógena *A. tumefaciens*, la cual tiene la capacidad natural de introducir segmentos de ADN propios al genoma vegetal. Esta bacteria puede manipularse genéticamente de tal manera que introduzca a la planta genes de interés, tales como aquellos que confieren resistencia al ataque de virus. Para este fin fueron construidos dos vectores de transformación (plásmidos) que contienen el gen de la proteína de la cápside del VMT, así como genes de resistencia a antibióticos que permiten seleccionar a las plantas transformadas (Fig. 2). Estos vectores fueron introducidos a la bacteria, y esta fue cultivada junto con los cotiledones e hipocotilos para que se diera la transferencia de material genético al genoma de las células vegetales. Para lograr esto hubo de adecuarse las condiciones de cocultivo de los segmentos de planta con la bacteria, como lo son: concentración bacteriana, edad del cotiledón e hipocotilo, medio de cocultivo y tiempo del mismo. De esta manera, se determinó que las condiciones adecuadas fueron una concentración de 1×10^8 bacterias/ml, diluidas en medio de Murashige y Skoog líquido en cocultivo con cotiledones e hipocotilos de 12 días de edad por un período de 48 horas.

c) Selección de brotes transformados.

Un paso crítico en el desarrollo de métodos de transformación genética, es la selección de aquellos brotes que estén transformados y la eliminación de aquellos que no lo están. Para esto se utilizan los genes de resistencia a

antibióticos, transferidos al genoma de la planta junto con el gen viral.

Una vez concluido el cocultivo, los segmentos de tejido vegetal se transfirieron a un medio de selección, en el cual sólo sobreviven y producen brotes aquellas células que hayan adquirido la información genética introducida. Este medio se basó en el desarrollado para la generación de brotes adventicios, adicionado con los antibióticos de selección (Gentamicina en el caso del vector pMON 858 VMT-CP, y Kanamicina en el vector pB₁ 120 VMT-CP), y de los antibióticos carbenicilina y claforán para eliminar a la bacteria remanente. Mediante este proceso fue posible obtener una cierta proporción de brotes resistentes a los antibióticos de selección, siendo notoria la diferencia entre éstos y aquellos que no presentaron resistencia. Esto constituye la primera evidencia de transformación genética en los brotes generados (Fig. 3). Los brotes así obtenidos se elongaron y enraizaron, siempre en presencia del agente selectivo, hasta obtener plantas adultas y adaptadas a las condiciones de invernadero.

d) Análisis de la expresión del gen viral en las plantas transformadas.

Las plantas obtenidas mediante el proceso mencionado, se sometieron al análisis llamado "Western blot" (Sambrook y col., 1990), cuya finalidad es verificar la presencia de la proteína de la cápside del VMT, como consecuencia de la inclusión estable y expresión del gen viral introducido al genoma de la planta. Con este estudio se confirmó de manera definitiva la transformación genética de varias de las plantas analizadas, con lo que se tiene la seguridad de contar con líneas de plantas transgénicas de tomate de cáscara que expresan eficientemente la proteína de la cápside del VMT (Figs. 4 y 5).

De esta forma, sólo resta por determinar la correcta heredabilidad del gen introducido, mediante un análisis de la proge de las plantas transgénicas y probar la resistencia de éstas ante la infección por el VMT, para dar por concluido de manera completa el presente trabajo.

PERSPECTIVAS

Ya que, ha sido confirmado, en todos los casos reportados que la expresión de la proteína de la cápside viral en plantas transgénicas les confiere resistencia a la infección producida por el virus de donde se tomó el gen (Arce-Johnson y col. 1991), es creíble que las plantas generadas en nuestro laboratorio, exhiben también dicha propiedad. Es importante considerar que estas líneas transgénicas pueden ser patentadas como una nueva variedad de tomate de cáscara de alta producción y resistentes al virus del mosaico del tabaco, desde luego, después de pasar por las normas establecidas por la recientemente creada Comisión Nacional de Bioseguridad, y que consisten en realizar en áreas controladas las pruebas de campo para dichas variedades. En la actualidad se encuentra en trámite el permiso para llevar a cabo dichas pruebas en el CINVESTAV-IPN. U. Irapuato.

Este trabajo coloca a la UAA como la primera universidad de Latinoamérica con la infraestructura necesaria para la generación de nuevas variedades de plantas con resistencia a virus, a través de ingeniería genética.

BIBLIOGRAFIA

- Gutiérrez-Campos R, 1991, Protección cruzada por Ingeniería Genética: una nueva alternativa para el control de virus fitopatógenos. *Inv. y Cien.* 04:33-34.
- Arce-Johnson, P. Ascencio-Ibáñez, J.T. y Rivera-Bustamante, R. F., 1991, Control de virus fitopatógenos: en "Introducción a la Biología Molecular e Ingeniería Genética de plantas.", SARH-CINVESTAV-INIFAP, 160-174 pp.
- Sambrook, P., Fritz, E., y Maniatis, M., 1990, *Molecular Cloning: a laboratory manual.* J. Wiley & Sons, tomo III.

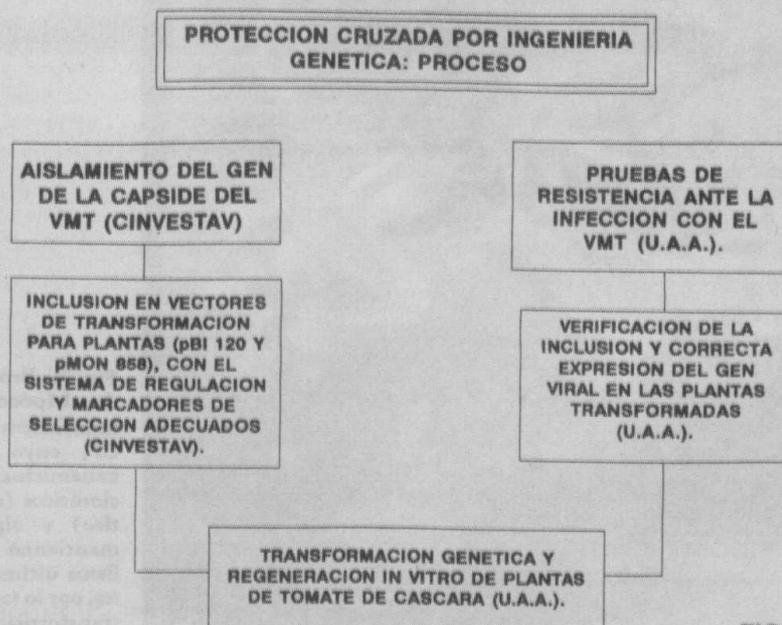


FIG. 1

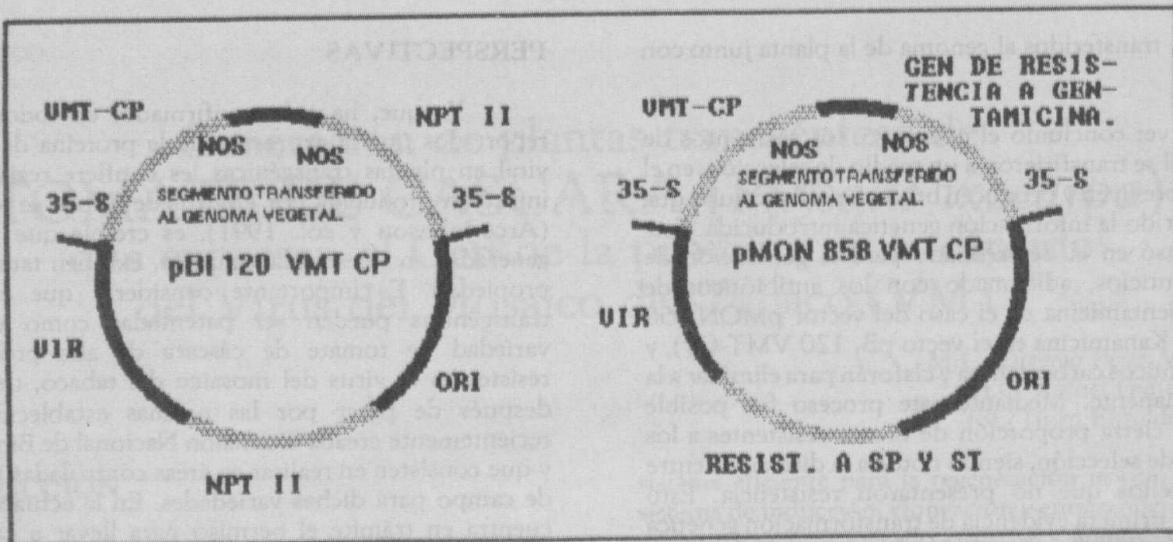


Fig. 2.- IZQUIERDA. Plásmido pBI 120 UMI CP. DERECHA. Plásmido pMON 858 UMT CP. Abreviaturas: UMT-CP: Gen de la proteína de la cápside del VMT. NPT II: Gen de la Neomicina fosfotransferasa II que confiere resistencia a Kanamicina. SPT-STR: Cartucho de resistencia a estreptomycin y espectinomycin. 35-S: Promotor 35 8 del virus del mosaico de la coliflor. NOS: Señal de terminación de la nopalino sintetasa. VIR: Región de virulencia. ORI: Origen de replicación.



Fig. 3.- Brotes de *P. ixocarpa* procedentes de hipocotilos cocultivados con *A. tumefaciens* con el vector pBI 120 VMT CP, cuyo marcador de selección es kanamicina. Nótese la presencia de brotes cloróticos (que no resistieron al antibiótico) y algunos brotes normales que mantienen su color verde (oscuros). Estos últimos son resistentes a kanamicina, por lo tanto es muy probable que estén transformados.

1 2 3 4 5

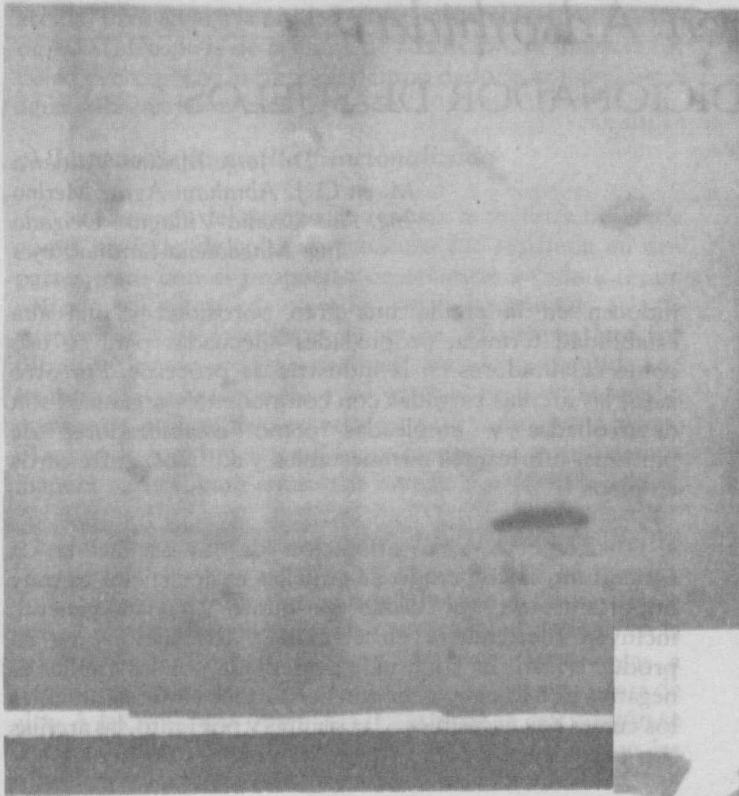
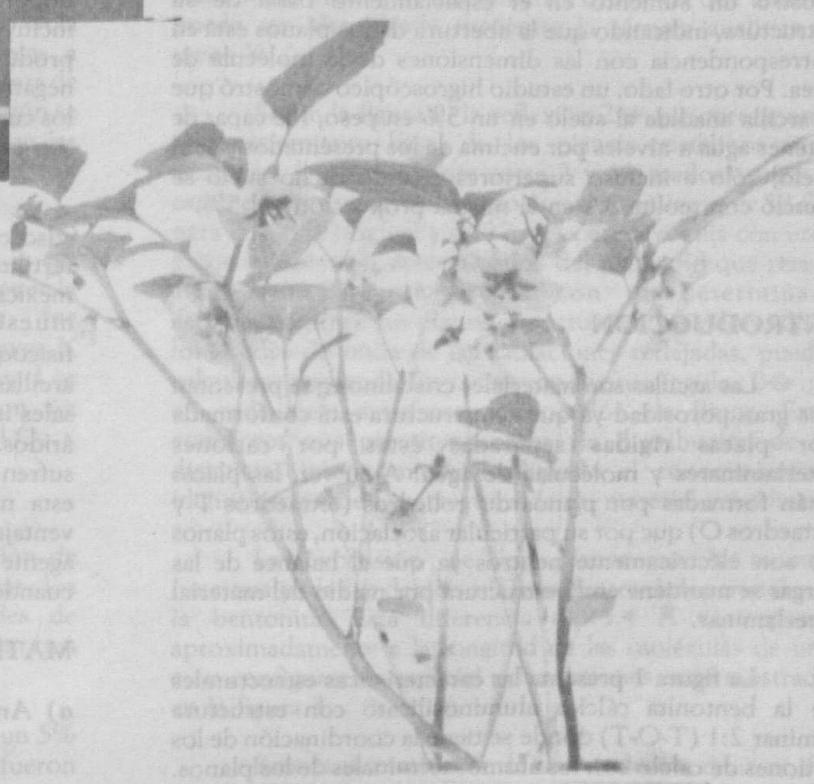


Fig. 4.- Análisis "Western blot" que demuestra la expresión de la proteína de la cápside del VMT en plantas transgénicas de *P. ixocarpa*. 1. Línea pBI 120-4 de *P. ixocarpa*. 2. Línea pBI 120-17 de *P. ixocarpa*. 3. Planta de jitomate PETO 86 pBI 120-1. 4. Control negativo (planta no transformada). 5. Control positivo (VMT puro).

El presente trabajo fue un intento de probar la posibilidad de usar como vector natural de transformación de las plantas transgénicas y en consecuencia de las plantas transgénicas. Asimismo, se propone el uso de un vector de transformación con componentes de virus como el *Tomato Yellow Mosaic Virus* (TYMV) como un vector natural de transformación de las plantas transgénicas. En este sentido, se propone el uso de un vector de transformación con componentes de virus como el *Tomato Yellow Mosaic Virus* (TYMV) como un vector natural de transformación de las plantas transgénicas. En este sentido, se propone el uso de un vector de transformación con componentes de virus como el *Tomato Yellow Mosaic Virus* (TYMV) como un vector natural de transformación de las plantas transgénicas.

MATERIALES Y MÉTODOS
 a) Aclilla usada y su producción inicial
 La aclilla de tomate que se usó en este estudio fue la que se produce en el estado de Jalisco, México. La muestra en polvo fue proporcionada por el Dr. A. C. Díaz y fue utilizada en su forma líquida por A. C. Díaz y A. C. Díaz. La aclilla de tomate que se usó en este estudio fue la que se produce en el estado de Jalisco, México. La muestra en polvo fue proporcionada por el Dr. A. C. Díaz y fue utilizada en su forma líquida por A. C. Díaz y A. C. Díaz.

Fig. 5.- Planta transgénica de *P. ixocarpa* que expresa el gen de la proteína de la cápside del VMT.



RESUMEN
 Una proteína natural fue usada como vector de transformación de las plantas transgénicas. En este sentido, se propone el uso de un vector de transformación con componentes de virus como el *Tomato Yellow Mosaic Virus* (TYMV) como un vector natural de transformación de las plantas transgénicas. En este sentido, se propone el uso de un vector de transformación con componentes de virus como el *Tomato Yellow Mosaic Virus* (TYMV) como un vector natural de transformación de las plantas transgénicas.

TRANSFORMACION GENETICA
 La transformación genética de las plantas transgénicas es un proceso que se realiza a través de un vector natural de transformación. En este sentido, se propone el uso de un vector de transformación con componentes de virus como el *Tomato Yellow Mosaic Virus* (TYMV) como un vector natural de transformación de las plantas transgénicas. En este sentido, se propone el uso de un vector de transformación con componentes de virus como el *Tomato Yellow Mosaic Virus* (TYMV) como un vector natural de transformación de las plantas transgénicas.