

## Tesis de Licenciatura

# "Ensayos preliminares para la transformación de ajo (*Allium sativum*) y obtención de construcciones genéticas para desarrollar resistencia al onion yellow dwarf virus (OYDV-G)"

Molinero, Luciana L.

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

### Cita tipo APA:

Molinero, Luciana L.. (). "Ensayos preliminares para la transformación de ajo (*Allium sativum*) y obtención de construcciones genéticas para desarrollar resistencia al onion yellow dwarf virus (OYDV-G)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000576\\_Molinero](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000576_Molinero)

### Cita tipo Chicago:

Molinero, Luciana L.. ""Ensayos preliminares para la transformación de ajo (*Allium sativum*) y obtención de construcciones genéticas para desarrollar resistencia al onion yellow dwarf virus (OYDV-G)". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. . [http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000576\\_Molinero](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000576_Molinero)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**Universidad de Buenos Aires**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Departamento de Ciencias Biológicas**

**“Ensayos preliminares para la transformación de  
ajo (*Allium sativum*) y obtención de construcciones  
genéticas para desarrollar resistencia al *onion  
yellow dwarf virus* (OYDV-G)”**

**Luciana L. Molinero**

**Director: Dr. Alejandro Mentaberry**

**Co-Director: Dr. Fernando Bravo-Almonacid**

**Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética  
y Biología Molecular  
(INGEBI-CONICET y FCEyN-UBA)**

**TESIS DE LICENCIATURA**

**Abril de 1998**

576

---

## Agradecimientos

A Alejandro Mentaberry

A Fernando Bravo-Almonacid, la persona que más contribuyó a mi formación como bióloga molecular, y de cuya humildad y sabiduría todos deberíamos aprender

A la Dra. Mirtha Flawia y al Dr. Héctor Torres

Al todo el personal del INGEBI-CONICET, los “Chagas”, los “Kinasas”, los “Ciclasas”, a la Tere, a los “Transgénicos”, A Mari y a Leonor (a Tito, que algún día me iba a enseñar a pescar tarariras...),

A Mariana Gallo, una amiga divina, a Paula y Adolfo, a Miguel,

A la gente del grupo “Papa”, Gaby (monumento a la paciencia), Ken (sabiduría oriental), Barbara (la casada), Flor R, Flor V, Silvia, Gustavo (que me dio tanto coraje en momentos en que flaqueaba), Juan Pablo, Marcos, Xime y Pablo,

A los cordobeses, gente como poca, Marcelo Helguera y Patricia Moriconi,

A mis amigas, Lore, la Chapa, Cata, Pao, Cynthia, Gise. A Hernán, que me apoya desde Inglaterra.

A mis hermanas Cecilia, Verónica y Valeria,

A Pablito, compañero carísimo en esta empresa olorosa

A todos los que estuvieron conmigo

A mi Papá y a mi Mamá, que me permitió darme cuenta de las cosas bien escritas y que siempre me brindó un apoyo incondicional y amor como hay pocos

## RESUMEN

El ajo (*Allium sativum*) es un cultivo de importancia económica creciente en la Argentina. La calidad de sus bulbos se ve afectada por la virosis crónica que sufre este cultivo, siendo el OYDV-G el virus de mayor incidencia. Debido a su condición de especie agámica, las alternativas de mejoramiento son acotadas. Una de las opciones es la transformación genética vía bombardeo con micropartículas. En el presente trabajo se analizaron parámetros fundamentales para la puesta a punto de la transformación (elección de un gen selector y de un gen reportero). Se determinó que la higromicina B es un buen agente selector para meristemas apicales (25 mg/l) pero no para callos embriogénicos derivados de raíz (hasta 200 mg/l), que la fosfotricina es un buen agente selector para callos embriogénicos (2 mg/l) y plántulas (1 mg/l), pero no para meristemas (2 mg/l). Se eligió al gen de la higromicina fosfotransferasa como gen selector y se observó que los promotores pTr 2 y p35S son capaces de dirigir la expresión génica en *A. sativum*, a través de un ensayo de expresión transitoria luego de un bombardeo con micropartículas. A su vez, se obtuvieron construcciones para ser utilizadas en la transformación y con el objeto de desarrollar protección a OYDV-G, esto último basado en el modelo de resistencia viral mediada por ARN.





3'NC	región 3' no codificante
3'nos	región 3' no codificante y de poliadenilación del gen de la síntesis de nopalinas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
3'ocs	región 3' no codificante y de poliadenilación del gen de la síntesis de octopinas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ADN	ácido desoxirribonucleico
CLV	<i>carnation latent virus</i>
CP	proteína de la cápside
CPMP	protección mediada por proteína de la cápside
DAS-ELISA	Sandwich doble de anticuerpos- <i>enzyme linked immunoassay</i>
DO	densidad óptica
GCLV	<i>garlic common latent virus</i>
<i>hptII</i>	gen de la higromicina fosfotransferasa de <i>Escherichia coli</i>
IEM-D	Inmunoelectromicroscopía con decoración
kpb	kilo pares de bases
LYSV	<i>leek yellow streak virus</i>
OYDV-G	<i>onion yellow dwarf virus</i>
p35S	promotor del transcripto 35 S del <i>cauliflower mosaic virus</i>
PDR	resistencia derivada del patógeno
pTr 1 y 2	promotores 1 y 2 de la síntesis de octopinas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
PVX	<i>potato virus X</i>
PVY	<i>potato virus Y</i>
REP	replicasa
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
TMV	<i>tobacco mosaic virus</i>
TSWV	<i>tomato spotted wilt virus</i>
<i>uid A</i>	gen de la $\beta$ -glucuronidasa de <i>Escherichia coli</i>

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Ajo: cultivo	1
1.2 Ajo: producción y económica	1
1.3 Transferencia génica en ajo	2
1.3.1 Métodos de transferencia genética: generalidades	2
1.3.2 Genes y construcciones para transformación	3
1.3.3 Bombardeo con micropartículas	5
1.3.3.1 Variables críticas	6
1.3.3.1 Parámetros físicos	6
1.3.3.2 Parámetros ambientales	6
1.3.3.3 Parámetros biológicos	7
1.3.3.4 Instrumentos	7
1.3.4 Explantos utilizados para los experimentos de transformación	8
1.3.5 Técnicas de cultivo de tejidos de ajo	8
1.4 Virosis del ajo: modelo de resistencia	9
1.4.1 Efecto de las virosis en ajo y medidas de control	9
1.4.2 Características de los virus presentes en ajo	10
1.4.3 Resistencia transgénica viral mediada por secuencias de ARN viral	11
1.4.3.1 Concepto de resistencia derivada del patógeno y protección mediada por cápside	11
1.4.3.2 Bases moleculares de la resistencia mediada por ARN	12
2. OBJETIVOS	15
3. RESULTADOS	16
3.1 Procedimientos para la identificación del gen selector	16
3.1.1 Ensayo de susceptibilidad a fosfinotricina	16
3.1.1.1 Brotes apicales	16
3.1.1.2 Callos embriogénicos derivados de meristema radicular	17
3.1.1.3 Plántulas	17
3.1.2 Ensayo de susceptibilidad a higromicina B	17
3.1.2.1 Brotes apicales	19
3.1.2.2 Callos embriogénicos derivados de meristema radicular	19
3.2 Construcción de un vector de bombardeo con un gen selector y un gen reportero	21
3.3 Expresión transitoria del gen reportero en tejidos de <i>Allium sativum</i>	21
3.3.1 Bombardeo de brotes apicales	27
3.3.2 Bombardeo de meristemas y hojas	28
3.4 Obtención de construcciones genéticas para desarrollar resistencia a OYDV-G	29
3.4.1 Identificación de l clon A44	29
3.4.1.1 Mapa de restricción de A44	30
3.4.1.2 Secuenciación del gen de la cápside del clon A44	30
3.4.2 Obtención del plásmido pZPhygCP	30
3.4.3 Obtención del plásmido pZPhygA44	30

4 MATERIALES Y MÉTODOS	37
4.1 Cultivo de tejidos de <i>Allium sativum</i>	37
4.1.1 Extracción de meristemas apicales	37
4.1.2 Medios de cultivo para ajo	37
4.1.3 Medios de selección	37
4.1.4 Callos embriogénicos derivados de meristema radicular	38
4.1.5 Plántulas	38
4.2 Tecnología del ADN recombinante	38
4.2.1 Purificación de ADN plasmídico en pequeña escala	38
4.2.1.1 Purificación común	39
4.2.1.2 Purificación con polietilenglicol	39
4.2.2 Preparación de ADN plasmídico a gran escala (maxipreparación)	39
4.2.3 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	40
4.2.4 Ligación de ADN con extremos cohesivos y romos con T4 ADN ligasa	40
4.2.5 Purificación de fragmentos de ADN por electroelución	40
4.2.6 Preparación de bacterias <i>E. coli</i> competentes	40
4.2.7 Transformación de bacterias <i>E. coli</i> competentes	41
4.2.8 Llenado de extremos 5'protruyentes con la enzima Klenow	41
4.2.9 Creación de extremos romos con la T4 DNA polimerasa	41
4.2.10 Defosforilación de los extremos 5'protruyentes y romos	41
4.2.11 Construcción de plásmidos	41
4.2.11.1 pGUShyg	41
4.2.11.2 AXE, AXN, AXC Y AHN	42
4.2.11.3 pZPhygCP	42
4.2.11.4pZPhygA44	43
4.2.12 Electroforesis en geles de agarosa nativos	43
4.2.13 Secuenciación de ADN doble cadena	43
4.2.13.1 Secuenciación automática	43
4.3 Técnicas de bombardeo	44
4.3.1 Preparación de los explantos de ajo para el bombardeo	44
4.3.1.1 Brotes apicales	44
4.3.1.2 Meristemas	44
4.3.2 Preparación de micropartículas	44
4.3.2.1 Preparación de la suspensión de micropartículas	44
4.3.2.2 Recubrimiento de las micropartículas con ADN	44
4.3.3 Cañón de micropartículas de alta presión y bombardeo de los explantos	44
4.3.4 Análisis histoquímico de actividad $\beta$ -glucuronidasa	45
4.3.5 Software utilizado para el análisis de secuencias	45
5 DISCUSIÓN	46
5.1 Elección de un gen selector	46
5.2 Construcción del plásmido pGUShyg	47
5.3 Expresión transitoria en tejidos de <i>Allium sativum</i>	47
5.4 Obtención de construcciones para desarrollar resistencia a OYDV-G	48
6 CONCLUSIONES	49



---

7 BIBLIOGRAFÍA

50



## **INTRODUCCIÓN**

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Ajo: cultivo**

El ajo (*Allium sativum*) es una monocotiledónea herbácea que pertenece a la familia de las Liliaceas. Su cultivo se encuentra muy extendido por todo el mundo, siendo su centro de origen más probable el Asia Central. Sus propiedades como planta medicinal son apreciadas desde la Antigüedad. Contiene aceites volátiles, tales como allicina y otros compuestos azufrados relacionados, y alcoholes vegetales como geraniol y citral. La allicina es el compuesto principal que da el olor y el gusto característicos del ajo, generado por la enzima allinasa al actuar sobre la aliina (compuesto no volátil). La enzima y el sustrato se sintetizan en distintas zonas del bulbo y al dañarse los tejidos se produce la reacción.

El ajo es también una fuente de selenio importante y tiene actividad antioxidante. Entre sus múltiples propiedades medicinales, se encuentran los efectos estimulantes, diafotéricos, expectorante, antiséptico, antibiótico, antiespasmódico y vermífugo. Asimismo, previene el envenenamiento por ingesta de metales pesados, dado que sus compuestos azufrados ayudan a la eliminación de los mismos. Tiene un efecto vasodilatador y también se usa para disminuir la concentración de colesterol, con un efecto marcado sobre la arteriosclerosis y la trombosis (The Herbalist, 1988). Últimamente, se lo ha propuesto como agente antioxidante contra el envejecimiento celular (Svendsen *et al.*, 1994), como inhibidor de la proliferación celular (Lee *et al.*, 1994), y se han realizado estudios para explorar si posee actividad antitumoral (Inoue *et al.*, 1995).

### **1.2 Ajo: producción y economía**

La producción mundial del ajo, un producto de comercialización no tradicional, es de 7,6 millones de toneladas, de las cuales 80.000 son producidas en 11.000 ha en Argentina. El 70-80% de este volumen es destinado a la exportación, siendo la Argentina el tercer exportador mundial de ajo, detrás de China y España. Nuestro principal comprador es Brasil, que importa el 47% del producto para exportación, seguido por Francia, Italia y Estados Unidos. En la Argentina, el ajo se ha convertido en una de las especies hortícolas de mayor importancia por su significativa participación en el sostenimiento de varias economías regionales. Existen aproximadamente 2.000 productores involucrados en su cultivo.

Las limitaciones actuales para una mayor exportación no están dadas por la escasez de demanda, sino por los bajos niveles de calidad de los bulbos. Un 30% de estas pérdidas provienen de la mala calidad de la semilla, del mal manejo agronómico, de factores climáticos que estropean las cosechas y, principalmente, de la pobre calidad genética y sanitaria del material utilizado. Este último problema afecta particularmente el rendimiento de bulbos de calidad exportable (la cual es función del calibre de los mismos, del número de dientes y de la carencia de residuos de agroquímicos). Es usual el intercambio regional de bulbillos y, consecuentemente, una diseminación generalizada de patógenos sistémicos. Dentro de este tipo de patógenos juegan un papel preponderante los virus, cuya presencia se ve facilitada por la propagación vegetativa de este cultivo (Walkey y Antill, 1989). En este sentido, en el marco del manejo integrado de plagas y enfermedades, se ha propuesto intensificar la búsqueda de resistencia a patógenos para disminuir las penalidades en la exportación por los residuos de plaguicidas (Comisión de Protección Vegetal del II Taller sobre Producción,



Comercialización e Industrialización del Ajo. EEA La Consulta - INTA, 24-28 de Junio de 1991).

Una cuestión de gran relevancia, en lo que se refiere al mejoramiento agronómico de esta planta, es su apomixis estricta, lo que determina su propagación exclusivamente agámica e impide la utilización de los métodos de mejoramiento tradicionales por cruzamiento y selección. En la actualidad, las técnicas usadas para el mejoramiento de esta especie se basan principalmente en la introducción, evaluación y selección clonal de nuevo germoplasma. Aunque la variación somaclonal y la mutagénesis de cultivos *in vitro* pueden aplicarse como fuentes alternativas de variabilidad genética, estas técnicas sólo permiten acceder en forma aleatoria a caracteres ya presentes en un determinado cultivar, y no ofrecen la posibilidad de obtener recombinación genética con otros distintos o con otras especies del género *Allium* (Kehr y Schaeffer, 1976). La ingeniería genética permitiría incorporar una importante herramienta al mejoramiento de este cultivo al introducir caracteres deseables obtenidos o extraídos de otras especies o de otros organismos.

El ajo que se cultiva en nuestro país corresponde fundamentalmente a tres tipos: "Blanco", "Colorado" y "Rosado Paraguayo". De los tres tipos, sólo se exportan las variedades "Blanco" y "Colorado", utilizándose el "Rosado Paraguayo" casi exclusivamente para consumo interno (Conci y Nome, 1991).

### 1.3 Transferencia Génica en Ajo

#### 1.3.1 Métodos de Transferencia Genética: generalidades

Hay diversos métodos para la transferencia de genes en plantas. Los más populares son, el sistema de transferencia vía *Agrobacterium tumefaciens*, el bombardeo con micropartículas y la electroporación de tejidos o protoplastos. Existen otros métodos de transferencia utilizados (tratamiento con fusógenos, microinyección, etc.) pero, debido a su baja eficiencia de transformación, o a su complejidad son poco utilizados.

##### 1. *Agrobacterium tumefaciens*

*A. tumefaciens* es un vehículo muy efectivo para introducir genes foráneos en las especies de solanáceas, pero presenta limitaciones importantes que han impedido su amplia utilización en una gran cantidad de cultivos. El mayor obstáculo al respecto parece ser la especificidad del huésped, lo que ha dificultado su utilización en cereales y legumbres. Sin embargo, recientemente, se han logrado transformar algunas de estas especies por esta vía (Hiei *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1996; Ishida *et al.*, 1996).

##### 2. Bombardeo con micropartículas

El desarrollo de los métodos de bombardeo con micropartículas (Klein *et al.*, 1987), basados en la aceleración de partículas de metales nobles recubiertos de material genético, ha permitido la transformación de varias especies de interés comercial. Entre estas se encuentran el maíz (Walters *et al.*, 1992), el algodón (McCabe y Martinell, 1993) y el sorgo (Casas *et al.*, 1993), especies que no eran susceptibles a la transformación por otros métodos.

##### 3. Otros métodos



El desarrollo de métodos sofisticados para regenerar plantas enteras a partir de callos y, en algunos casos, de protoplastos, ha abierto el camino para implementar procedimientos alternativos que utilicen métodos de transferencia directa de ADN. Los protocolos utilizados incluyen tratamientos químicos (Saul *et al.*, 1987) y electroporación (Fromm *et al.*, 1986).

Se desarrollaron otros métodos de transformación, pero su aplicación fue limitada a unas pocas especies. Tales métodos incluyen la electroporación de tejidos parcialmente digeridos, la infiltración de ADN en semillas sometidas a vacío y el uso de agujas o fibras microscópicas para facilitar la penetración de ADN en tejidos específicos (Christou, 1996). Dos métodos adicionales de transformación, que son aplicables a especies particulares incluyen: incubación de semillas o plantas intactas de *Arabidopsis thaliana* con *Agrobacterium* (Christou, 1996); y la utilización de vectores virales para la expresión de altos niveles de proteínas en tabaco (Palmgren, 1997).

### 1.3.2 Genes y construcciones para transformación

Para transferir material genético a la planta huésped, es necesario desarrollar construcciones genéticas apropiadas que faciliten la integración y la expresión de los genes foráneos. Generalmente, es necesario incluir un gen marcador de selección o de fácil monitoreo para la identificación positiva de aquellas células que han sido transformadas. Son preferibles los marcadores de selección porque permiten, en situaciones ideales, el establecimiento y proliferación sólo de las células transformadas. Estas células pueden regenerar en plantas transgénicas luego de la transferencia a un medio de inducción conteniendo las fitohormonas apropiadas.

Una construcción genética típica incluye un promotor, una secuencia codificante (transgén) y una secuencia terminadora. Los promotores usados comúnmente para la transformación vegetal incluyen el promotor del transcripto de 35S del *cauliflower mosaic virus* (p35S; Benfey y Chua, 1990), que actúa como un promotor constitutivo para expresión en dicotiledóneas y también en algunas monocotiledóneas. Otro candidato es la secuencia promotora dual Tr de la biosíntesis de octopinas del plásmido pTiAch5 de *A. tumefaciens* (pTr1 y 2; Velten y Schell, 1985), que contiene dos promotores adyacentes y en sentido opuesto. Esto último es una ventaja sobre otros sistemas de expresión porque la transcripción en sentidos divergentes permite una mejor expresión génica.

Los genes selectores más comúnmente utilizados para monocotiledóneas (Wilmink y Dons, 1993) son aquellos que codifican proteínas que detoxifican inhibidores metabólicos, tales como antibióticos y herbicidas. Los antibióticos de la familia de los aminoglucósidos inhiben la síntesis de proteínas en los procariontes. Los ribosomas de las mitocondrias y cloroplastos de plantas están evolutivamente relacionados a los ribosomas bacterianos, por lo que también son susceptibles. El efecto visible más notorio sobre las plantas es la clorosis y la blancura de las hojas, causadas por la falta de síntesis de clorofila. Los aminoglucósidos más utilizados para la selección de plantas son:

La **kanamicina B**, y su derivado **G418 (gentamicina)**, son antibióticos de la familia de los aminoglucósidos, que se unen a la subunidad ribosomal 30S, inhibiendo la traducción. La resistencia a estos agentes se obtiene por la acción del gen de la neomicina fosfotransferasa, *npt II*, que fosforila un grupo hidroxilo específico de estos antibióticos. Este gen se aisló del transposón Tn5 de *E. coli*. Las monocotiledóneas son generalmente insensibles a niveles



relativamente altos de kanamicina, lo que permite el crecimiento de células vegetales no transformadas en un medio que contenga este antibiótico. Es por ello que su utilización en este grupo de plantas se ve restringido.

La **higromicina B**, otro aminoglucósido, ocupa el sitio de unión al ribosoma del factor EF-2, inhibiendo la elongación de la cadena peptídica. Este antibiótico es inactivado por la fosforilación de un grupo hidroxilo, transferido por la enzima higromicina fosfotransferasa, codificada por el gen *hpt II* de *E. coli*.

Los herbicidas están siendo utilizados muy frecuentemente como agentes selectores para experimentos de transformación. Los genes de resistencia a los mismos se obtienen a partir de varios organismos, incluyendo bacterias y plantas. Entre los herbicidas más utilizados se encuentran:

La **L-fosfinotricina (PPT)**, también conocida como **glufosinato** y **Basta**, es un análogo del glutamato y actúa como un inhibidor competitivo de la enzima glutamina sintetasa (GS). Esta enzima es crucial para la asimilación de amonio y la regulación del metabolismo del nitrógeno. La inhibición de la enzima provoca la acumulación de  $\text{NH}_4^+$  en la célula, lo que provoca su muerte. La fosfinotricina es un herbicida metabolizable, menos dañino al medio ambiente que otros herbicidas. Este compuesto es neutralizado por la enzima fosfinotricina N-acetil transferasa, codificada por los genes *bar* y *pat*, provenientes de *Streptomyces hygroscopicus*.

El **glifosato** (comercialmente conocido como Roundup™), inhibe la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en plantas, al inhibir a la enzima 5-enoilpiruvil shikimato 3-fosfato sintetasa (EPSPS). La inhibición de esta enzima conduce a la acumulación de shikimato, lo que inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos y metabolitos secundarios. La resistencia al glifosato no está basada en la inactivación del compuesto, sino en la introducción de un gen de *epsps* modificado que codifica para una enzima con afinidad reducida al glifosato. Los genes de las enzimas utilizadas para generar resistencia fueron aislados de *Salmonella typhimurium* y de *Petunia*.

La detoxificación del agente selectivo por la expresión de una enzima modificadora en células transformadas, puede permitir que escapen del proceso de selección células adyacentes a la transformada, que no poseen el transgén. Esto no sucede cuando la resistencia está basada en la producción de una enzima blanco modificada. Para poder discernir una célula transformada de un entorno no transformado, se utilizan genes que den una apariencia diferente a la célula transformada, los genes reporteros. Para ello se han utilizado varios genes que en ciertas condiciones producen compuestos cromogénicos, fluorescentes, o bien luminiscentes.

El gen de la  **$\beta$ -glucuronidasa (*uid A*)** de *E. coli* (Gallagher, 1992) codifica una enzima que da coloración azul frente a un sustrato cromogénico (el X-glucurónido), utilizado en ensayos histoquímicos; o bien, induce la aparición de fluorescencia en presencia de metilumberilglucurónido, lo que se implementa en ensayos de actividad enzimática. Una desventaja de este sistema es que las células mueren durante el proceso de coloración.

El gen de la **luciferasa (*luc*)** de luciérnaga codifica una enzima que al reaccionar con su sustrato, la luciferina, emite luz amarillo-verdosa, con un pico a la longitud de onda 560 nm. La ventaja de este sistema, que no es un sistema destructivo, es que permite hacer



seguimientos de linaje de las células transformadas. Sin embargo, una gran desventaja de este sistema es el alto costo de los equipos para detectar y amplificar la señal de luminiscencia (Kost *et al.*, 1995).

En la regulación de la biosíntesis de antocianinas en maíz, los factores de transcripción **Lc** (o **C1**) y **R-nj** (o **R**) cumplen un papel fundamental (Ludwig *et al.*, 1990; Gallagher, 1992). A partir de los respectivos genes se diseñaron genes reporteros, utilizando tejidos no pigmentados, para constatar el desarrollo de color. La ventaja de este método es que evita la destrucción del tejido para determinar la actividad del transgén. El sistema de regulación de genes **Lc** y **R-nj** requiere una expresión de genes coordinada y una vacuola intacta.

Otro gen reportero interesante es *gfp*, que permite efectuar estudios en organismos vivos por el seguimiento de la proteína de fluorescencia verde (GFP), proveniente de la medusa *Aequora victoria* (Chalfie *et al.*, 1994). Esta es un monómero, que emite luz verde al ser excitada con luz azul. Una gran ventaja de este sistema es que no necesita la adición de ningún compuesto para su activación y, fundamentalmente, que es un sistema de monitoreo no destructivo.

### 1.3.3 Bombardeo con Micropartículas

A fines de los ochenta, Klein y colaboradores describieron un procedimiento basado en la utilización de microproyectiles de alta velocidad para introducir ácidos nucleicos en células vivas, demostrando la expresión transitoria de ARN o ADN exógeno en células de la epidermis de *Allium cepa* (Klein *et al.*, 1987). La técnica de bombardeo con micropartículas (también conocida como biobalística, bombardeo de microproyectiles, etc.) demostró ser la vía más versátil y efectiva para la transformación de un gran número de organismos, incluyendo bacterias y hongos, células de mamíferos y de muchas especies vegetales. Las ventajas que hacen a la biobalística un método muy efectivo para transformar las plantas son las siguientes:

1. *Transformación de tejido organizado*: la capacidad de transformar tejido organizado, y potencialmente regenerable, permite la introducción de genes foráneos en germoplasma de élite.
2. *Sistema de transformación universal*: se ha desarrollado la expresión génica transitoria en diversos tejidos de muchas especies. El inconveniente más grande de este método para la obtención de una planta transgénica es la regeneración de los tejidos bombardeados, no el sistema de introducción de ADN a la célula.
3. *Transformación independiente del cultivar*: La transformación de cultivos agrónomicamente importantes como la soja, el algodón, el maíz, el arroz y otros se vio restringida durante mucho tiempo a variedades no comerciales cuando se utilizaron métodos convencionales (*Agrobacterium*, electroporación, tratamiento con fusógenos, etc.). La tecnología del bombardeo de micropartículas permitió la recuperación de plantas transgénicas para muchos cultivares comerciales.

#### 1.3.3.1 Variables Críticas

Las condiciones del explanto y del bombardeo en sí demostraron ser cruciales para optimizar la eficiencia de la transferencia de genes. Se identificaron varios parámetros que



necesitan ser considerados en experimentos que involucren la transferencia génica por bombardeo de micropartículas. Estos son:

#### 1.3.3.1.1 Parámetros físicos

Los parámetros físicos más estudiados son:

- las propiedades físicas y químicas de las micropartículas de metal utilizadas para transportar el ADN foráneo.
- la naturaleza, preparación y unión del ADN a las partículas.
- tejido blanco.

Las partículas deberían poseer una masa suficientemente grande como para desarrollar un momento de fuerza adecuado para penetrar el tejido blanco. Los metales que se utilizan son: oro, tungsteno, paladio, rodio, platino, iridio y otros metales de transición. Los metales implementados deben ser químicamente inertes para evitar reacciones adversas con el ADN o los componentes de la célula. Otras propiedades adicionales del metal incluyen el tamaño y la forma de las micropartículas, así como la aglomeración y las propiedades de dispersión de las mismas.

Deben considerarse también la naturaleza, forma y concentración del ADN. En el proceso de recubrimiento de las partículas de metal con ADN son útiles ciertos aditivos, como la espermidina y el cloruro de calcio.

Es muy importante utilizar como blanco aquellas células que sean competentes, tanto para la transformación como para la regeneración. Es necesario un análisis histológico del tejido de modo de asegurar cuáles son las capas celulares que puedan regenerar al organismo. De allí la importancia de lograr una adecuada profundidad de la penetración de las partículas, lo que puede determinar el éxito o el fracaso en la recuperación de plantas transgénicas a partir de un tejido determinado.

En los dispositivos en que las micropartículas son impulsadas directamente por gas, generalmente mueren aquellas células del tejido que reciben el impacto directo del chorro de gas. En las primeras versiones del dispositivo Biolistic®, las células cercanas al centro del disparo eran dañadas y no podían proliferar. Esta herida fue atribuida al trauma físico producido por el chorro de gas generado por el sistema.

#### 1.3.3.1.2 Parámetros ambientales

Estas variables incluyen la temperatura, el fotoperíodo y la humedad de las plantas dadoras, explantos, y tejidos bombardeados. Estos factores afectan la fisiología de los tejidos, y por lo tanto deben ser considerados como variables importantes. Ellos influyen en la receptividad del tejido blanco a la transferencia de ADN y también afectan la susceptibilidad del tejido al daño producido por el bombardeo, afectando la probabilidad de éxito del proceso de transformación. Algunos explantos requieren un período de “curación” luego del bombardeo, bajo condiciones especiales de luz, temperatura y humedad. Los explantos derivados de plantas sometidas a estrés proveen generalmente un material de calidad inferior para los experimentos de bombardeo.

#### 1.3.3.1.3 Parámetros biológicos



La elección y naturaleza de los explantos y las condiciones de cultivo pre- y pos- bombardeo son factores críticos que pueden determinar el éxito de un ensayo de bombardeo con micropartículas. Existe una evidencia considerable indicando que, para obtener altas frecuencias de transformación, las micropartículas de metal deben alojarse en el núcleo (Yamashita *et al.*, 1991). Es por ello que un pretratamiento osmótico de los tejidos ha demostrado ser de gran importancia (Hunold *et al.*, 1994), ya que al extraer agua de la célula, concentrada en la vacuola (la organela más grande de la célula), se reduce el volumen de la misma. De este modo, aumenta la probabilidad de que las micropartículas se alojen en el núcleo, y por lo tanto de que el ADN foráneo se integre al genoma. La expresión génica puede ser de carácter estable o transitorio, según ocurra o no la inserción del ADN foráneo en el genoma vegetal.

Los estudios de expresión transitoria pueden ser tomados como una guía para desarrollar sistemas de expresión estable para una especie determinada. Se han reportado trabajos que muestran que la optimización de la expresión transitoria está correlacionada con una mayor expresión estable (Casas *et al.*, 1993; Hunold *et al.*, 1994).

#### 1.3.3.1.4 Instrumentos

Actualmente hay en uso varios mecanismos de aceleración de micropartículas. El original consistía en un equipo de pólvora (Sanford *et al.*, 1987). Las versiones más avanzadas, comprenden:

1. Versión mejorada del equipo de pólvora, que utiliza helio comprimido (Sanford *et al.*, 1991). El diseño se comercializa bajo el nombre de Biolistic®, de la empresa Bio-Rad.
2. Instrumento basado en el flujo de helio (Takeuchi *et al.*, 1992): acelera directamente las partículas en un flujo de helio de baja presión. En este sistema no hay una membrana macrocargadora que lleve las partículas y, por lo tanto, se ve reducida la fuerza necesaria para acelerar las mismas.
3. Aparato de descarga eléctrica (Christou *et al.*, 1990): se produce un arco voltaico que actúa sobre una lámina de un metal conductor que contiene las micropartículas recubiertas de ADN suspendidas en agua. Esta fuerza eléctrica es la que las impulsa hacia el material blanco. Este es el principio del sistema comercial Accell®.
4. Aparato de mira microscópica (Sautter *et al.*, 1991): permite un bombardeo preciso sobre un área del tamaño de los meristemas. Este sistema es teóricamente capaz de dirigir el disparo hacia las capas de células competentes para la transformación estable de la línea germinal.

El instrumento más utilizado es el modelo Biolistic®. La metodología basada en el equipo Accell® también ha sido muy utilizada para desarrollar sistemas de transferencia de genes en legumbres y cereales recalcitrantes a otros métodos. Los sistemas que utilizan gas helio a alta presión, y aquellos basados en la descarga eléctrica, demostraron poseer un amplio espectro de utilización, y fueron más eficientes para la obtención de altas frecuencias de transformación en diferentes especies vegetales.



### 1.3.4 Explantos utilizados para los experimentos de transformación

Actualmente, se acepta que los explantos más apropiados para la transformación son aquellos que requieren la menor cantidad de tiempo de cultivo de tejidos antes y después de la transferencia de ADN. Esto es debido a que muchos estudios han demostrado que períodos muy extensos de cultivo de tejidos resultan, generalmente, en mutaciones genéticas (variación somaclonal) que pueden impactar negativamente en las plantas regeneradas (Phillips *et al.*, 1994).

Los explantos preferidos para la transformación son:

- embriones inmaduros y callos derivados de semillas
- cultivos de tallos proliferativos
- ejes embrionarios derivados de semillas maduras e inmaduras
- callos embriogénicos
- meristemas

### 1.3.5 Técnicas de cultivo de tejido de ajo

En la mayoría de los casos, las plantas infectadas por virus se ven liberadas de los mismos cuando pasan a la generación siguiente a través del estadio de semilla. Por su condición de especie agámica, esto no ocurre en el ajo. Como se describirá más adelante, esto llevó a utilizar el cultivo de meristemas y callos como sistema para obtener plantas libres de virus.

En las últimas dos décadas se han desarrollado diversos métodos de cultivo de tejidos del ajo (Kehr y Schaeffer, 1976). El cultivo de callos a partir de meristemas, se desarrolló en base al medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con auxinas y constituyentes orgánicos. Estos tejidos luego se recuperaron a plántulas, en un medio conteniendo auxinas y citoquininas.

En 1989, Moriconi *et al.* emprendieron un estudio con el fin de establecer cultivos de callos a partir de meristemas apicales, para luego regenerar plántulas y utilizarlas para obtener variabilidad genética por el sistema de variación somaclonal, producida normalmente en el cultivo de tejidos. Asimismo, se desarrolló un sistema para la multiplicación rápida del ajo a partir de tallos adventicios, (Moriconi *et al.*, 1990), en el cual se tomaron meristemas de ajo de las variedades “Blanco” y “Colorado”, y se los cultivó en un medio apropiado para el desarrollo de yemas axilares. Al cabo de dos meses, se subcultivaron en un medio de multiplicación, lo que permitió obtener un gran número de plántulas a partir del desarrollo de yemas adventicias.

El cultivo de callos se utiliza ampliamente como un sistema rápido y controlado de seleccionar material vegetal con tolerancia o resistencia a varios tipos de estrés ambiental. Los estudios de variabilidad cariológica de cultivos de callos de ajo, realizados por Novák y Dolezel (1982), mostraban que cultivos prolongados en medios con ácido 2,4-diclorofenoxiacético, eran afectados por una poliploidización intensiva. También se han desarrollado diversos sistemas de organogénesis y embriogénesis a partir del cultivo de callos (Abo El-Nil, 1977). Estos últimos eran generados a partir de meristemas apicales. Esta fue la primera vez que se observó la formación de embriones en ajo.



En 1988, Nagasawa y Finer optimizaron un sistema de cultivo de células en suspensión de crecimiento rápido, y posterior formación de microcallos. Estos, en el medio apropiado, desarrollaban meristemas apicales que regeneraban plantas enteras, todo esto sin pasar por el estadio de embrioide. Recientemente, se ha logrado obtener un sistema de producción de protoplastos regenerables a plantas (Ayabe *et al.*, 1995). Moriconi *et al.* (trabajo en preparación), han desarrollado un sistema de callos embriogénicos a partir del meristema radicular. Debido a que el presente trabajo se desarrolló inicialmente en colaboración con este laboratorio de la Universidad Nacional de Córdoba, se decidió utilizar como material de partida meristemas apicales y callos embriogénicos provenientes de raíz para la transformación del ajo.

## **1.4 Virosis del ajo: modelo de resistencia**

### 1.4.1 Efecto de las virosis en ajo y medidas de control

Las infecciones con virus de ajo son universales, y se desconocen hasta el presente cultivos naturalmente sanos (Walkey y Antill, 1989). Estos virus, no sólo son propagados por sus vectores naturales (en general áfidos y ácaros), sino que fundamentalmente lo hacen a través de la multiplicación vegetativa usando los bulbillos como vehículo. El conjunto de virus forma un complejo, y es causal de una sintomatología particular llamada “mosaico del ajo”, evidenciada en las hojas como estrías amarillentas. Los síntomas son menos notables en plantas jóvenes y se intensifican durante su madurez. También se ha reportado enrollamiento de hojas, amarillamiento y achaparramiento de la planta afectada. Algunos virus integrantes de este complejo son considerados latentes al no causar síntomas en ajo (Walkey, 1990). Existe poca información respecto al efecto de la infección viral en la producción del cultivo. Algunos trabajos mostraron que afecta el rendimiento con pérdidas de hasta un 88%, variando según los cultivares (Walkey y Antill, 1989).

En general, los virus vegetales no son transmitidos por semilla y, por lo tanto, aquellos cultivos obtenidos por esta vía están inicialmente libres de virus. La infección viral se produce como resultado de la transmisión desde una fuente externa mediada por vectores naturales como áfidos, “trips”, ácaros y nematodos. El ajo es de propagación agámica, por lo que no existe una forma natural de liberación de patógenos sistémicos. El procedimiento empleado para su eliminación es el cultivo de tejido *in vitro* y la termoterapia, siendo éstas las únicas fuentes de producción de plantas saneadas (Peña-Iglesias y Ayuso, 1982; Walkey *et al.*, 1987). El tejido con el que se obtiene un mayor porcentaje de plantas sanas con características geno y fenotípicas intactas es el meristemático. El desarrollo del cultivo de meristemas (Conci, *et al.*, 1986; Conci y Nome, 1991) se inicia con la extracción del mismo en condiciones asépticas y su implante en un medio de cultivo que favorezca su desarrollo. Posteriormente, se entra en la fase de multiplicación que consiste en el desarrollo de brotes axilares y permite aumentar considerablemente el número de individuos en poco tiempo. La etapa siguiente consiste en una modificación del medio de cultivo que favorezca el desarrollo de raíces, estomas, la producción de clorofila, componentes que pueden estar alterados durante la etapa de multiplicación a fin de que la planta pueda tolerar el paso siguiente que es el trasplante a tierra. La deshidratación es el mayor problema en esta etapa. Una forma de superar ese inconveniente, es lograr que las plantas entren a esta etapa como microbulbillos, que es un órgano de resistencia natural del ajo. La evaluación sanitaria de estas plantas se hace mediante pruebas serológicas por técnicas de DAS-ELISA, IEM-D, etc. Una vez eliminadas aquellas plantas que aun contengan virus, se mantiene el resto en zonas libres de



áfidos, principales vectores naturales de los virus de ajo. Los exámenes sanitarios deben repetirse durante el ciclo de cultivo, ya que debido a las bajas concentraciones virales, algunas plantas infectadas pueden escapar del sistema de detección.

En general, los cultivares que han sido “saneados” mediante esta tecnología, han respondido con aumentos de rendimiento variables entre un 4 y 88% de acuerdo con el cultivar (Quiot *et al.*, 1972; Marrou *et al.*, 1974; Havranek, 1974; Walkey y Antill, 1989). En la Argentina se obtuvieron plantas de ajo tipo Rosado Paraguayo mediante cultivo de meristema (Nome *et al.*, 1981). Este material se sometió a un programa de selección clonal (Moriconi *et al.*, 1984) y se obtuvo como resultado un notable incremento de la producción por lo que fue adoptado por productores de la región de Jesús María (Córdoba). Esto llevó a un aumento sostenido en la zona sembrada hasta 1990, año en que los rendimientos comenzaron nuevamente a decaer debido fundamentalmente a reinfecciones virales y a la carencia de semilla básica para reposición (Italia, 1995). En otros ensayos comparativos realizados en el país, se determinó un aumento del 44% en el peso del bulbo de ajos sanos tipo Blanco, y del 43 % en el caso de ajos sanos tipo Rosado Paraguayo, en relación a plantas crónicamente enfermas (Conci *et al.*, 1995).

#### 1.4.2 Características de los virus presentes en ajo

En estudios sobre plantas de ajo realizados en el año 1977 se observaron inclusiones citoplasmáticas típicas de poty y carlavirus (Nome, no publicado). Nome *et al.* (1981), en un trabajo sobre producción de plantas libres de virus, mencionan que el 100% de los ajos en Argentina se encuentran infectados por poty y carlavirus. Conci y Nome (1988) detectaron serológicamente la presencia del potyvirus OYDV. En trabajos posteriores del mismo grupo (Conci, *et al.*, 1992b), se determinó la frecuencia de este potyvirus en las principales regiones ajeras de Argentina, observando que el 92 % de las plantas analizadas dieron resultado positivo por DAS-ELISA. Igualmente, se detectaron partículas fuertemente decoradas con antisuero anti-LYSV en los principales cultivares del país, así como partículas virales muy relacionadas serológicamente al CLV (Conci *et al.*, 1992a). Un estudio de distribución de frecuencias entre las principales regiones ajeras de la Argentina, mostró que el 29% de las plantas analizadas presentan reacción positiva por DAS-ELISA. En trabajos posteriores realizados en Argentina ha sido posible detectar partículas virales relacionadas serológicamente al GCLV.

Muñoz *et al.*, (1990) detectaron inclusiones citoplasmáticas típicas de potyvirus en plantas de ajo y propusieron como método de diagnóstico, el ELISA indirecto para la detección de potyvirus. Kobayashi *et al.* (1996), obtuvieron una biblioteca genómica del complejo viral presente en ajo en Argentina, de la cual aislaron y caracterizaron el gen de la cápside del OYDV-G presente en ajo. En 1993, Sumi *et al.*, describieron un nuevo grupo compuesto por cuatro virus que afectaban a los cultivos de ajo de Japón, en base a la distribución genómica y a la homología de secuencia. Los denominaron GarV-A, GarV-B, GarV-C y GarV-D, y son transmitidos por ácaros. En 1997, Helguera *et al.* detectaron, a partir de la biblioteca de cDNA descrita por Kobayashi *et al.* (1996), un virus con una alta homología de secuencia a GarV-A. En estudios preliminares, se observó que este virus puede estar afectando en gran medida a los cultivos de ajo locales. Este nuevo virus parece ser el que desarrollaba cuerpos de inclusión tipo carlavirus, descritos por Nome *et al.* (1981), un grupo viral que aún no ha sido realmente descrita en ajo.



### 1.4.3 Resistencia transgénica viral mediada por secuencias de ARN viral

#### 1.4.3.1 Concepto de resistencia derivada de patógeno y protección mediada por cápside

El concepto de *resistencia derivada de patógeno* (PDR) fue propuesto en 1985 por Sanford y Johnston, que proponían una aplicación amplia de los genes derivados del patógeno para generar una resistencia específica en el huésped. Para ello se basaron en estudios de expresión de genes del fago Q $\beta$  en su huésped.

Este concepto fue pronto instrumentado para obtener resistencia a virus en plantas. En 1986 Powell *et al.* describieron el primer caso de una resistencia mediada por una cápside de partícula viral en tabaco. Estas plantas transgénicas expresaban la proteína de la cápside del *tobacco mosaic virus* TMV y evidenciaron ser resistentes a TMV. Se observó que, al emplear partículas virales, la resistencia era función inversa del inóculo. Si en lugar de infectar a la planta con viriones se le inoculaba ARN viral, tanto las plantas que expresaban la cápside como las controles desarrollaban síntomas de infección. Para explicar este tipo de resistencia se argumentó que la presencia de cápside viral en el citoplasma interfería con el proceso de desensamblado del virus, evitando así su ingreso al ciclo replicativo. A esta resistencia se la denominó *protección mediada por cápside viral* (CPMP) y ha sido implementada con éxito en varios sistemas planta-virus (Powell *et al.*, 1986; Powell *et al.*, 1990).

A medida que la CPMP era más utilizada en la práctica, comenzaron a detectarse desviaciones del concepto original. En una serie de casos se hizo evidente que existía una falta de correlación entre los niveles de expresión de la proteína transgénica y los niveles de resistencia (Golemboski *et al.*, 1990). Esto sugería que la proteína no era esencial para la resistencia viral. Casi simultáneamente se publicaron tres trabajos de resistencia transgénica utilizando secuencias no traducibles, por lo que se demostraba que existía otro sistema de protección distinto al de CPMP. (De Haan *et al.*, 1992; Lindbo *et al.*, 1992; van der Vlugt *et al.*, 1992). El fenotipo de la resistencia en todos estos casos era independiente de la dosis de inóculo empleado, y por lo tanto parecía inmunidad, mientras que los niveles típicos de resistencia mediados por cápside viral disminuían a títulos virales crecientes. Otra diferencia consistía en el espectro de la protección: la resistencia mediada por ARN era específica para el virus del cual se derivaba el transgén, mientras que la resistencia mediada por proteína comprendía también a virus relacionados a aquel utilizado como fuente para obtener el transgén. No sólo no se pudo encontrar una correlación directa entre los niveles de expresión de ARN del transgén y los niveles de resistencia contra la infección viral, sino que tampoco se encontró una correlación negativa en el caso de TSWV (Pang *et al.*, 1993).

#### 1.4.3.2 Bases moleculares de la resistencia mediada por ARN

La primer clave para comenzar a entender estos resultados provino de la observación del fenómeno de *recuperación* en plantas transgénicas que expresaban secuencias de la cápside viral de TEV (Lindbo *et al.*, 1993). Algunas plantas enfermas desarrollaban hojas nuevas que permanecían libres de virus y eran resistentes a inoculaciones virales subsiguientes. La aparición del fenómeno de *recuperación* coincidía con una caída sustancial en los niveles de ARN transgénico citoplasmáticos en los tejidos recuperados con respecto al tejido no inoculado. Sin embargo, al comparar los niveles de transcripción nuclear entre estos tejidos, no se encontraron diferencias. Esto sugería que la disminución de ARN transgénico, entre un tejido recuperado y uno que no había sido inoculado, podía deberse a una actividad



postranscripcional, de origen citoplasmático, que era inducida por la presencia del virus. Al activar este mecanismo, la planta se tornaría resistente a la acción del mismo. Plantas transgénicas que expresaban ARNs no traducibles de la cápside de PVY mostraron una correlación inversa entre los niveles de ARN citoplasmáticos y la resistencia observada (Smith *et al.*, 1994). Se encontró una correlación clara entre la metilación del ADN transgénico, los niveles de expresión nuclear de las secuencias transgénicas, los niveles de ARN citoplasmáticos y la resistencia. Las plantas resistentes poseían niveles de ARN citoplasmáticos muy bajos, un nivel de transcripción nuclear muy alto y las secuencias del ADN transgénico ampliamente metiladas. Esto sugería que la metilación en las secuencias del ADN transgénico podía ser la responsable de la inducción de la degradación específica del ARN citoplasmático.

En otro trabajo, en que se expresó en plantas la replicasa del virus PVX, se observó que aquellas plantas que poseían los mayores niveles de resistencia eran las que detentaban los menores niveles de acumulación de proteína viral (Mueller *et al.*, 1995). Cuando se las comparaba con plantas susceptibles, se observó que estas plantas no solo producían cantidades menores de proteína, sino que también mostraban menores niveles de expresión de ARN. Se realizó un cruzamiento entre los fenotipos observados, y la progenie resultó poseer un fenotipo resistente, con un nivel de expresión de ARN bajo, mostrando que el *locus* transgénico que confería la resistencia era capaz de *trans*-silenciar a su homólogo. En cambio, los niveles de transcripción nuclear eran altos, confirmando la idea que la disminución del ARN transgénico ocurría a nivel postranscripcional. Este mecanismo podía ser responsable de la degradación del ARN viral en el citoplasma, resultando así un fenotipo resistente.

Se observó también una relación entre el número de transgenes y la resistencia (Smith *et al.*, 1995). Plantas que poseían uno o dos transgenes generalmente mostraban un fenotipo de recuperación, mientras que aquellas que poseían tres o más inserciones resultaban ser plantas altamente resistentes. En estas últimas se observó que la resistencia coincidía con un mecanismo de degradación postranscripcional de ARN de secuencia específica. Un dato interesante, compartido por Sijen y colaboradores (1996), era que aquellas plantas poseedoras de un alto número de inserciones tenían una alta metilación en los transgenes y los niveles de transcripción de los mismos eran indetectables.

En 1995, Swaney *et al.* sugirieron que, en principio, todas las secuencias virales eran capaces de inducir resistencia, pero que el tamaño de la secuencia expresada podía ser importante para disparar el silenciamiento. Además, las secuencias nucleotídicas y/o las estructuras secundarias podían tener un rol importante. En un trabajo reciente de Pang y colaboradores (1997) se demostró que la longitud del transgén era un elemento importante para disparar la respuesta.

El fenómeno de resistencia mediada por ARN comparte aspectos similares con la cosupresión, siendo esta última descrita por primera vez en *Petunia* (Napoli *et al.*, 1990). Estas características eran: altos niveles de transcripción, bajos niveles de ARN transgénico citoplasmáticos y metilación del ADN transgénico. En ambos casos, existían mecanismos de degradación del ARN a nivel postranscripcional. Se sugirió un modelo general, en el cual altos niveles de ARN podían ser la señal para la metilación de los transgenes correspondientes (Wassenegger *et al.*, 1994). Se observó que las plantas con un número muy alto de copias del transgén también se silenciaban, pero a nivel transcripcional. Una característica interesante, es que estas plantas poseían las secuencias metiladas a nivel de promotor del transgén, mientras



que aquellas que presentaban silenciamiento a nivel postranscripcional poseían metilaciones en las secuencias codificantes (Sijen *et al.*, 1996).

Uno de los modelos propuestos para explicar la cosupresión consistía en un *switch* bioquímico que implicaba la detección de un umbral de los niveles de expresión de ARN, pasado el cual se inducía el silenciamiento (Fig 1) (Meins *et al.*, 1995). Este modelo se basaba en un mecanismo hipotético que pudiera ser inducido por una alta expresión de transgenes para originar la degradación de secuencias específicas de ARN. Tanto para la resistencia viral mediada por ARN como para la cosupresión, pasado dicho umbral de expresión transgénica nuclear se inducía el mecanismo de silenciamiento.

Sin embargo, reportes posteriores presentaron una fuerte evidencia contra esta hipótesis (Van Blokland *et al.*, 1994). Así, se postuló que la expresión cuantitativa de un transgén podía no ser el único requerimiento para el silenciamiento, sino que también incidía la calidad del transcripto. Las metilaciones extensivas del transgén podrían causar aberraciones en el ARN transcripto, lo que a su vez dispararía el mecanismo presente en el citoplasma (Fig. 1). En éste, una ARN polimerasa ARN dependiente sería capaz de sintetizar pequeñas moléculas de ARN *antisentido*, las que podrían aparearse a moléculas de ARN de origen celular o viral y contribuir a la formación de un complejo de degradación altamente específico. Esto explicaría la versatilidad que posee el mecanismo al utilizar blancos diferentes, ya que opera de forma secuencia específica.

La resistencia viral mediada por ARN presenta una serie de ventajas respecto de la CPMP “tradicional”:

1. El fenotipo de resistencia observado se asemeja al de inmunidad, debido a que la resistencia se mantiene a dosis crecientes de inóculo viral.
2. Aunque esta resistencia sólo se presenta cuando los niveles de homología de secuencias entre el virus y la copia expresada por la planta son altos (y por lo tanto podría ser sobrepasada por virus menos relacionados), esto puede ser superado mediante la expresión simultánea de múltiples secuencias de ARN viral.
3. La expresión de una secuencia viral no traducible, que induce su propia degradación, resulta en niveles indetectablemente bajos de ARN citoplasmático. Ello otorga mayores márgenes de bioseguridad y, por lo tanto, contribuye a una mejor aceptación pública de los cultivos genéticamente modificados.

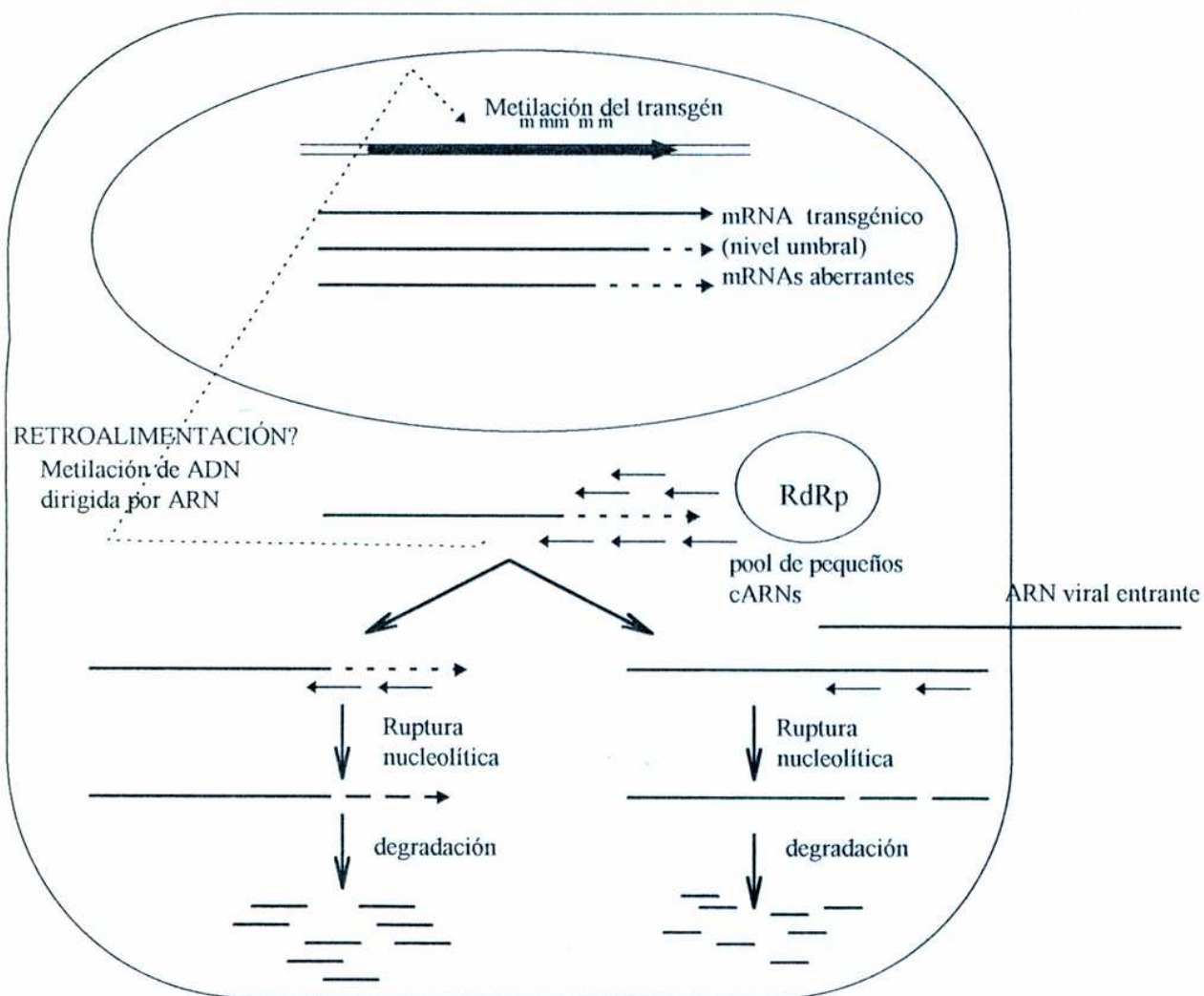


Fig 1. Modelo de resistencia viral mediada por ARN, adaptado de Sijen *et al.*, 1996. RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN; cARNs: ARNs copias; m: sitios de ADN metilados

## **OBJETIVOS**



## **2. OBJETIVOS**

El presente trabajo de Tesis de Licenciatura tiene los siguientes:

### **Objetivos Generales**

1. La identificación de un gen selector y de un gen reportero, que son requisitos previos al diseño de un sistema de selección de explantos transformados de *Allium sativum*.
2. La construcción de un vector para ser utilizado en la transformación de ajo, que confiera de resistencia al *onion yellow dwarf virus* (OYDV-G)

### **Objetivos Parciales**

1. Determinación de un gen selector mediante el análisis de susceptibilidad de diversos explantos de *Allium sativum* variedad "Colorado" a agentes selectores de material vegetal
2. Determinación de un gen reportero mediante el análisis de expresión transitoria del mismo en distintos tejidos de *Allium sativum*.
3. Construcción de vectores para desarrollar resistencia a OYDV-G .

## **RESULTADOS**



### **3. RESULTADOS**

Habitualmente, se utilizan dos métodos para la identificación de plantas transformadas dentro de una población que contiene, además, plantas no transformadas. Estos métodos son:

1. La selección de la planta transgénica por la acción de un agente selector que inhiba el crecimiento de las no transformadas sin afectar a las transformadas.
2. La visualización de los tejidos transformados por la expresión de un gen reportero.

Para elegir un agente selector y un gen reportero adecuados se siguieron los siguientes procedimientos:

- a. Se determinó la susceptibilidad de diversos explantos a la acción de distintos agentes selectores, para establecer la concentración apropiada a la cual efectuar una selección positiva de los explantos transformados.
- b. La determinación de la capacidad de los promotores para dirigir al gen reportero en los tejidos utilizados, al analizar la expresión transitoria, mediante el análisis histoquímico de los tejidos posterior a un bombardeo con micropartículas recubiertas con el material genético.

Para visualizar la expresión del gen reportero en las plantas transformadas, se realizó la construcción de un vector de bombardeo que contuviese el gen selector elegido en el punto a y un gen reportero .

#### **3.1 Procedimientos para la identificación del gen selector**

##### Curvas de susceptibilidad de diferentes explantos de *Allium sativum* a distintos agentes de selección

El objetivo de estos ensayos consistió en determinar la susceptibilidad de diversos explantos de *Allium sativum* a los agentes selectores fosfinotricina (Basta, un herbicida) e higromicina B (antibiótico). Para ello se procuró determinar la concentración mínima a la cual los distintos explantos eran susceptibles a estos agentes selectores. De esta manera se podría elegir una dupla de agente selector/gen de resistencia al mismo, que sirviese como mecanismo de selección de plantas transformadas. Los explantos competentes a ser transformados eran meristemas apicales y callos embriogénicos derivados de raíz. Estos explantos fueron sometidos a un ensayo de susceptibilidad a los agentes de selección antes citados. En el caso específico de las plántulas, este tipo de ensayo permitiría seleccionar, en el futuro, los individuos transgénicos luego de un experimento de transformación.

##### 3.1.1 Ensayo de susceptibilidad a fosfinotricina

###### 3.1.1.1 Brotes apicales

Se tomaron brotes apicales de los dientes de bulbo de ajo "Colorado". Se sometieron a diferentes concentraciones del agente selector en el medio de crecimiento de meristemas (medio D1), y a los 12 días se evaluó la condición de los tejidos. El criterio de susceptibilidad fue el marchitamiento de los tejidos, con síntomas de clorosis e inhibición de la formación de hojas. En una curva de 0 a 2 mg/l, no se observó susceptibilidad. Se concluyó que



fosfinotricina no actúa como agente selector del tejido meristemático en concentraciones de hasta 2 mg/l.

### 3.1.1.2 Callos embriogénicos derivados de meristema radicular

Se tomaron callos de tamaño pequeño y se los sometió a un tratamiento con diferentes concentraciones de fosfinotricina. Para evaluar el efecto del herbicida sobre los callos, se observó el crecimiento de los mismos en un medio de inducción de crecimiento (medio R) conteniendo distintas dosis del agente selector. La evaluación se hizo al cabo de 60 días. El criterio de susceptibilidad era la disminución del crecimiento de los callos y la necrosis de los mismos. Se observó una merma en el crecimiento de los tejidos, pero en ningún caso se llegó a ver necrosis total del material. La curva de selección mostró que el tejido era sensible a concentraciones de 2 mg/l. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y en la Fig 2. Debido a la escasez de material, y a problemas de contaminación por hongos endofíticos, no se pudo proseguir con el ensayo de susceptibilidad.

Tabla 1. Curva de resistencia de callos embriogénicos de ajo "Colorado" a fosfinotricina.<sup>a</sup>

Concentración de fosfinotricina	0 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	2 mg/l
Crecimiento de los callos	crece	crece	crecimiento lento	crecimiento muy lento

<sup>a</sup> Se utilizaron de 7 a 10 explantos para cada punto de la curva.

### 3.1.1.3 Plántulas

Se tomaron plántulas crecidas *in vitro* en medio de multiplicación de plántulas (medio D5) y se las sometió a diferentes concentraciones del agente de selección durante 60 días. El criterio para determinar la susceptibilidad del tejido era la necrosis observada. Se sometió a las plántulas a concentraciones de fosfinotricina de 0 a 2 mg/l. La necrosis era evidente a partir de 1 mg/l. Los resultados se observan en la Tabla 2 y en la Fig 3. Se demuestra que fosfinotricina sería un buen agente de selección de plántulas transformadas, a partir de una concentración de 1 mg/l.

Tabla 2. Resistencia de plántulas de ajo "Colorado" a fosfinotricina.

Concentración de fosfinotricina	0 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	2 mg/l
Plántulas	crecimiento normal	hojas parcialmente cloróticas	necrosis	necrosis

Se utilizaron de 5 plántulas para cada punto de la curva.

### 3.1.2 Ensayo de susceptibilidad a higromicina B

El objetivo de este experimento fue determinar la acción antibiótica de la higromicina B en brotes apicales y en callos embriogénicos de *Allium sativum*. A diferencia del ensayo



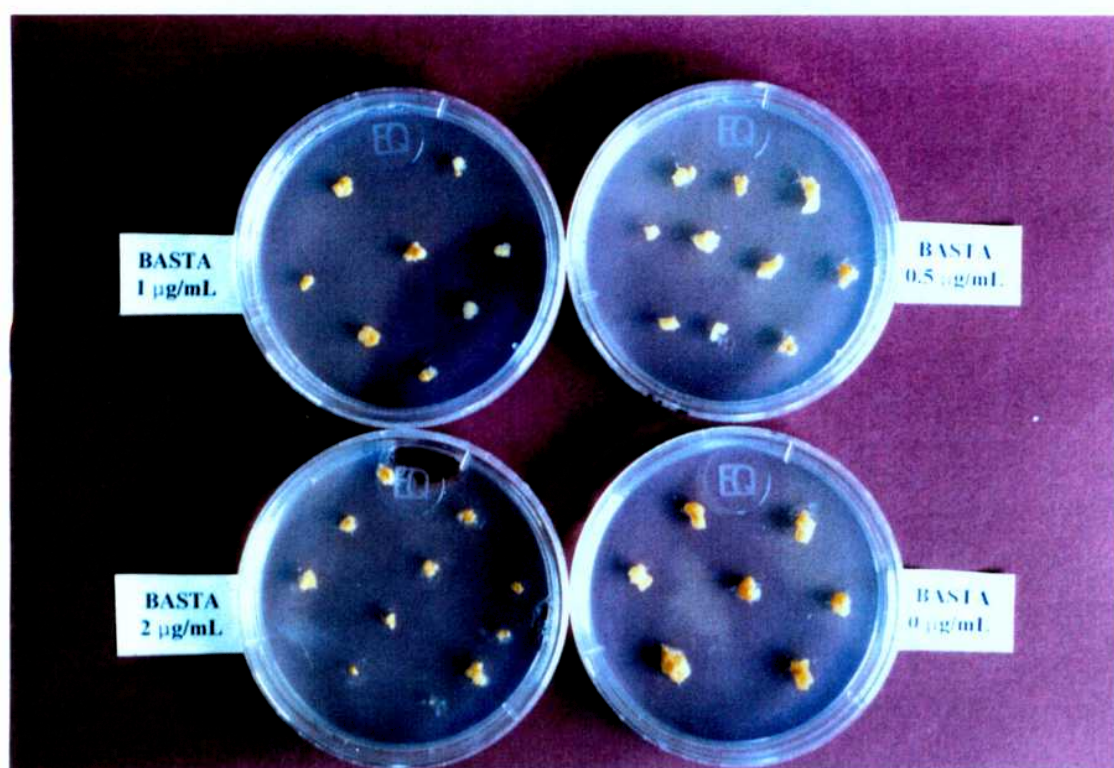


Fig. 2 Curva de susceptibilidad de callos fosfinotricina (Basta) en medio R.



Fig. 3 Curva de susceptibilidad de plántulas a fosfinotricina (Basta) en medio D5.

con fosfotricina, no se realizó el ensayo sobre plántulas debido a que anteriormente se había determinado la susceptibilidad de las mismas al antibiótico (Moriconi, comunicación personal).

### 3.1.2.1 Brotes apicales

Se repitieron los mismos procedimientos y criterios de susceptibilidad utilizados en el experimento con fosfotricina y descrito en el apartado 3.1.1.1. Los explantos fueron sometidos a concentraciones de higromicina B de 0 a 200 mg/l. Como puede observarse en la Tabla 3 y en la Fig 4, el crecimiento de los tejidos se inhibe a partir de una concentración de 25 mg/l. Esto indica que, a diferencia de los resultados obtenidos en el ensayo con fosfotricina, higromicina B sería un antibiótico útil para seleccionar los meristemas transformados con una construcción adecuada.

Tabla 3: Curva de resistencia de brotes apicales de ajo "Colorado" a higromicina B.<sup>a</sup>

<i>Concentración de higromicina</i>	<i>0 mg/l</i>	<i>25 mg/l</i>	<i>50 mg/l</i>	<i>75 mg/l</i>	<i>100 mg/l</i>	<i>200 mg/l</i>
Crecimiento	sí	no	no	no	no	no

<sup>a</sup> Se utilizaron 10 explantos por punto

### 3.1.2.2 Callos embriogénicos derivados de meristema radicular

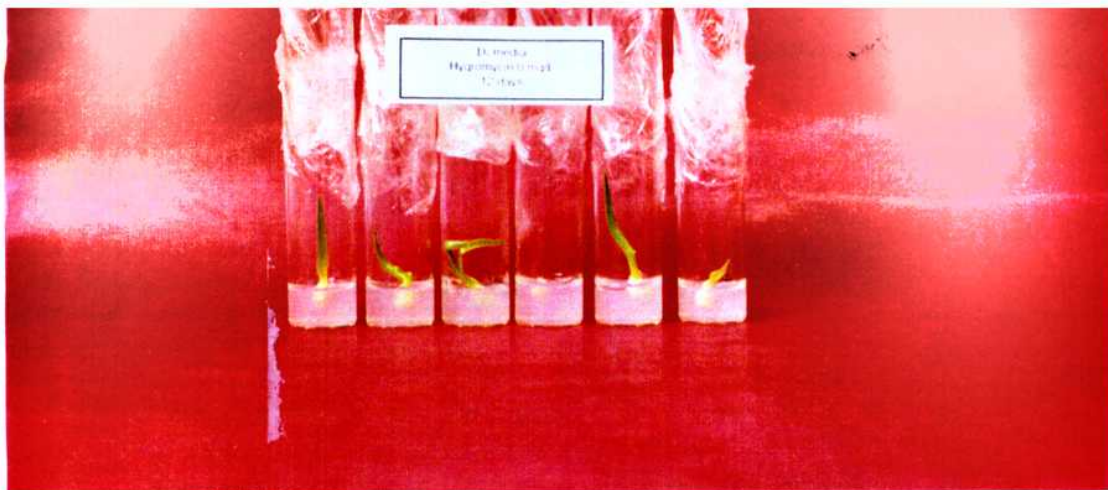
Se tomaron raíces de plántulas de ajo "Colorado" y se las colocó en un medio de inducción de callos (medio R) con diferentes concentraciones del agente selector durante 60 días. Se tomó como parámetro de susceptibilidad la no formación de callos a partir del ápice radicular y la necrotización del tejido. Se hizo una curva entre 0 y 200 mg/l de higromicina B, de 5 explantos por punto. No se comprobaron diferencias entre el control (0 mg/l) y las diferentes concentraciones a las que fue sometida el tejido. Hasta la concentración de 200 mg/l, los tejidos no mostraron susceptibilidad. Se concluyó que higromicina B no actúa como agente selector eficaz de los callos embriogénicos en concentraciones inferiores a 200 mg/l.

### Análisis de las curvas de susceptibilidad y el cultivo de tejidos

Del análisis de las curvas de susceptibilidad se extrajeron las siguientes observaciones: a) en el caso de la fosfotricina, se comprobó que es un agente efectivo para la selección de plántulas a concentraciones mayores que 1 mg/l, parcialmente efectivo para callos embriogénicos (se observa una merma del crecimiento a partir de 2 mg/l) e ineficaz para los brotes apicales en concentraciones de hasta 2 mg/l; b) en el caso de higromicina B, se observó que es altamente efectiva para seleccionar brotes apicales (a partir de 25 mg/l), pero que resultó ineficaz como agente selector utilizando callos embriogénicos (en concentraciones hasta 200 mg/l).

Debido a las dificultades encontradas al trabajar con callos (crecimiento lento, alta contaminación endofítica, riesgo de variación somaclonal en tiempos prolongados) se decidió continuar los trabajos utilizando meristemas apicales. Los mismos presentaban una





4 a



4 b

Fig 4. Curva de susceptibilidad de brotes apicales de ajo a higromicina B. a. Explantos en medio D1 con higromicina B 0 mg/l. b. Explantos en medio D1 con higromicina B 25 mg/l.

serie de ventajas (crecimiento rápido, fácil extracción) que los hacen atractivos como fuente de explantos para encarar la transformación.

La decisión de proseguir los ensayos con meristemas -y con los brotes apicales que los contienen- condujo a elegir a la higromicina B como agente selector, dados los resultados obtenidos en las curvas de susceptibilidad. La elección de higromicina B se apoyó también en la susceptibilidad encontrada en plántulas, en ensayos realizados por el Ing. Agr. D. Moriconi. Por estas razones, se decidió utilizar al gen de resistencia a higromicina, *hpt II*, como gen marcador de selección para la construcción del vector de bombardeo.

### 3.2 Construcción de un vector de bombardeo con un gen selector y un gen reportero

El objetivo perseguido en este punto fue la construcción de un vector de bombardeo que incluyera al gen de resistencia a higromicina B, y un gen reportero, ambos dirigidos por promotores de expresión vegetal. Las secuencias utilizadas fueron, respectivamente, la del gen de la higromicina fosfotransferasa de *E. coli* (*hpt II*), y la del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa de *E. coli* (*uid A*); los promotores elegidos para dirigir a ambos genes eran Tr 1 y 2 (promotores de la síntesis de octopinas de *Agrobacterium tumefaciens*). El vector diseñado se denominó pGUShyg, y para la construcción del mismo se partió de tres construcciones previas, pGEMGUS, pGSC1703A y pBS8.

Se diseñó una estrategia de subclonado triple (Fig 5). A partir de pGEMGUS se obtuvo la secuencia del gen *uid A* y la secuencia terminadora del gen de la nopalina sintetasa (3'nos) -secuencia terminadora de la transcripción y poliadenilación para vegetales-. A partir de pGSC1703A se obtuvieron los promotores Tr 1 y 2, la secuencia del gen *hpt II* y el 3'ocs (otra secuencia terminadora). pBS8 -una construcción realizada en base al vector comercial pBluescriptSK+- poseía un inserto de 1.200 pb (cápside de PVY) en el sitio de corte para la enzima *Eco* RI. Este vector poseía un origen de replicación bacteriano de alto número de copias, mucho más potente que el de pGSC1703A. Esta característica permitió obtener un mayor rendimiento en las preparaciones de ADN plasmídico a gran escala.

Se digirió pGEMGUS con las enzimas *Eco* RI y *Bam* HI y se purificó el fragmento de 2,16 kpb. pBS8 se digirió con las enzimas *Eco* RI y *Xba* I y se purificó el fragmento de 2,95 kpb. pGSC1703A fue digerido con *Bam* HI y *Xba* I y se purificó el fragmento de 2,2 kpb. Se ligaron los fragmentos y se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se purificó ADN plasmídico de un clon de bacterias recombinantes y se lo sometió a dos dobles digestiones, como se muestra en la Fig 6.

### 3.3 Expresión transitoria del gen reportero en tejidos de *Allium sativum*

Se realizaron estudios de expresión transitoria de pGUShyg y pGEMGUS en explantos de ajo "Colorado", con el doble propósito de: a) evaluar la capacidad de estos explantos de expresar genes foráneos, y b) examinar la eficiencia de los promotores p35S y pTr 2 en estos explantos. Estos promotores dirigen la expresión del gen reportero *uid A* en los vectores pGEMGUS y pGUShyg, respectivamente. Se ensayaron ambas construcciones



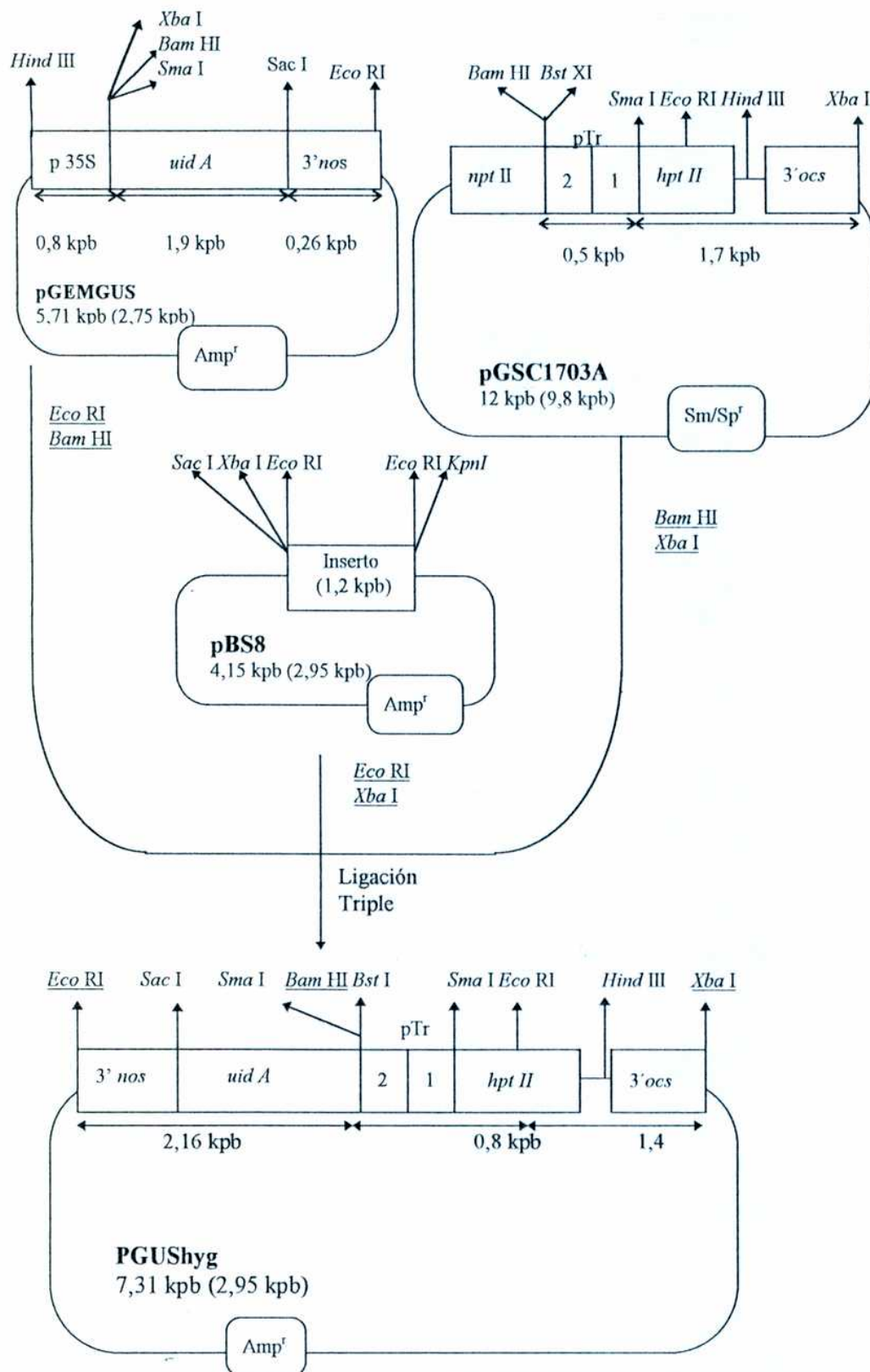


Fig 5: Diseño empleado para la construcción del vector de bombardeo **pGUSHyg**. *p35S*: promotor del transcripto de 35S del CaMV. *uidA*: gen de la  $\beta$ -glucuronidasa. *3'nos*: región 3' del gen de la nopalina sintetasa. *hptII*: gen de la higromicina fosfotransferasa. *3'ocs*: región 3' del gen de la octopina sintetasa. pTr 1 y 2: promotores Tr de los genes de la síntesis de octopina. *Amp<sup>r</sup>*: gen de resistencia a ampicilina (promotor bacteriano). *Sm/Sp<sup>r</sup>*: gen de resistencia a estreptomicina/espectinomicina (promotor bacteriano). Los números entre paréntesis indican el tamaño correspondiente a los respectivos vectores.

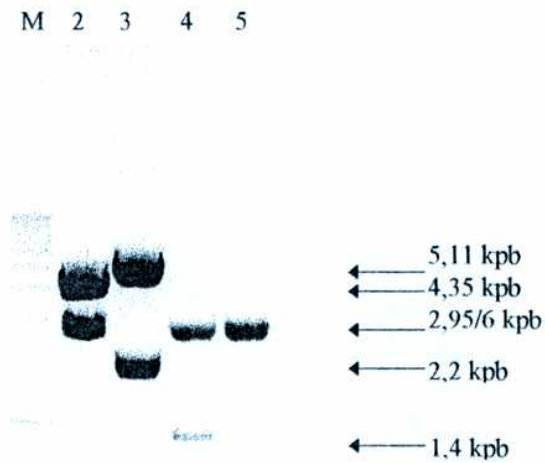
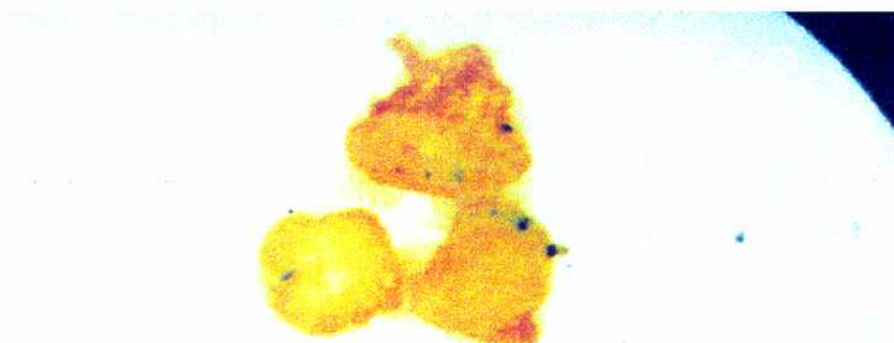


Fig 6: Se realizó la minipreparación de ADN plasmídico de la colonia recombinante transformada con la construcción pGUSHyg se la sometió a digestiones con distintas enzimas de restricción. Los productos de la reacción fueron separados en un gel de agarosa 1%. M: marcador de peso molecular (1 kb ladder); 2: clon digerido con *Eco* RI; 3: clon digerido con *Xba* I y *Bam* HI; 4: clon digerido con *Eco* RI y *Xba* I; 5: pBluescript digerido con *Eco* RI.





7.a.



7.b.



7.c.

Fig 7. Brotes apicales de ajo bombardeados con microproyectiles. a. Brotes apicales bombardeados con la construcción pGEMGUS. b. Brotes apicales bombardeados con pGUShyg. c. Detalle de brote apical bombardeado con pGUShyg







9.a.



9.b.

Fig 9. Hojas de ajo bombardeadas con microproyectiles. a. Hoja bombardeada con la construcción pGUShyg (abajo y con el plásmido control (arriba). b. Detalle de hoja bombardeada con pGUS hyg

en brotes apicales, y sólo pGUShyg en los meristemas apicales y hojas de ajo. Se realizó el ensayo en estas últimas con el objeto de poder evaluar, en el futuro, la expresión estable del gen *uid A* en hojas de plantas regeneradas a partir de meristemas transformados con esta construcción.

Se utilizó para estos ensayos un cañón de helio comprimido de alta potencia. Este último es un instrumento fabricado en EMBRAPA-CENARGEN de eficacia similar al acelerador de micropartículas PDS-1000 comercializado por Bio-Rad.

### 3.3.1 Bombardeo de brotes apicales

Se tomaron brotes apicales de ajo “Colorado”, se los sometió a un tratamiento osmótico de 4 h y luego se los bombardeó con microproyectiles de tungsteno recubiertos de ADN. Se utilizó al pGEMGUS y al pGUShyg como vectores de bombardeo para chequear la actividad del gen reportero *uid A*. El vector A44 (que no posee gen reportero) fue utilizado como control negativo. La expresión transitoria del gen *uid A* fue evaluada a las 24 h del bombardeo, contabilizando puntos azules como eventos de transferencia genética.

En un estudio preliminar, se observó que brotes apicales no bombardeados daban una falsa señal positiva cuando eran sometidos a estrés osmótico (medio D1 con sacarosa 12%, y agarosa 1%), pero no cuando se lo sometía a un tratamiento común (medio D1 con sacarosa 3% y agarosa 0,65%). Debido a la abundante documentación (Hunold *et al.*, 1994; Casas *et al.*, 1993; McCabe y Martinell, 1993; Iglesias *et al.*, 1993) que muestra una mejor eficiencia de transformación en aquellos explantos sometidos al tratamiento de *shock* osmótico, se decidió utilizar la primera opción. En este caso, el *buffer* GUS normal fue reemplazado por el *buffer* GUS/metanol 20% para eliminar la señal endógena. Los resultados demuestran que ambas construcciones pueden expresarse en brotes apicales, dando cuenta de la eficacia de los promotores pTr 2 y p35S a ser expresados en *A. sativum* (Tabla 4 y Fig 7).

Tabla 4: Bombardeo de brotes apicales de ajo “Colorado” con diversos vectores de expresión.

Construcción genética	Promedio de puntos azules por brote apical <sup>a</sup>	Promedio de puntos azules por brote apical por construcción
A44 (control negativo):Disparo1	0	0
Disparo 2	0	
pGUShyg:Disparo1	1,25	
Disparo2	6	3,89
pGEMGUS:Disparo1	4	
Disparo 2	0,6	2,3

<sup>a</sup>Se utilizaron 5 brotes apicales por disparo.

Es evidente que la cantidad de explantos con la que se trabajó no fue suficiente, razón por la cual estos datos deben tomarse como un marcador de tendencias antes que como datos



cuantitativos. Esto puede explicar la diferencia de expresión entre los disparos correspondientes a una misma construcción. No se observó la aparición de puntos azules en el control negativo.

### 3.3.2 Bombardeo de meristemas y hojas

Se realizó un ensayo para observar la capacidad de expresión transitoria en meristemas recién extraídos y en hojas de ajo “Colorado”, utilizando el mismo procedimiento que en el punto anterior, pero con pGUShyg y A44 como construcciones de bombardeo. El día previo a la sesión de bombardeo se extrajeron meristemas de ajo y se los mantuvo en medio D1 normal (3% sacarosa, 0,65% agar). Cinco horas antes del bombardeo, se los trasvasó a medio D1 osmótico, (12% sacarosa, 1% agar). En ese momento se tomaron hojas de plántulas, y se las sometió al mismo tratamiento osmótico. Se evaluó en ambos explantos la expresión transitoria 24 h postbombardeo mediante un ensayo histoquímico de GUS. Se contabilizaron los puntos azules por meristema, pero en las hojas sólo se determinó la presencia o no de los mismos. El control negativo consistió en el bombardeo de los explantos con A44. Los resultados se muestran en la Tabla 5 y en las Fig 8 y 9, donde se puede observar la expresión del gen reportero en el tejido meristemático.

La distribución de micropartículas en los meristemas no fue homogénea. Lo mismo se observó en las hojas tratadas, verificándose sólo en muy pocas la presencia de puntos azules. Por esta razón, se obvió la contabilización de los puntos azules para este último caso.

Tabla 5. Bombardeo de meristemas recién extraídos y de hojas de ajo “Colorado”.

<i>Plásmido</i>	<i>Meristemas <sup>a</sup></i>	<i>hojas <sup>b</sup></i>
A44 (control negativo)	0	no
pGUShyg	6,875	sí

<sup>a</sup> promedio de puntos azules por meristema. Se utilizaron 20 ejes meristemáticos para el disparo con A44 y 40 para el disparo con pGUShyg.

<sup>b</sup> presencia de puntos azules. Se tomaron hojas de los brotes de ajo y se cubrió la placa de Petri con las mismas.

### 3.4 Obtención de construcciones genéticas para desarrollar resistencia a OYDV-G

Teniendo en cuenta que la resistencia mediada por ARN ha resultado especialmente eficaz en el caso de los potyvirus (Lindbo *et al.*, 1993; Swaney *et al.*, 1995; Prins y Golbach, 1996), se decidió desarrollar una estrategia de este tipo para introducir protección a OYDV-G. Como se ha mencionado, este tipo de resistencia es independiente de la presencia de la proteína codificada por el transgén. Por lo tanto, la expresión de transcritos de ARN no codificantes puede ser utilizada satisfactoriamente para desarrollar esta estrategia. Como punto de partida para las construcciones a realizar se eligió el clon A44 (Fig. 10), obtenido de una biblioteca de cDNA construida por Kobayashi *et al.* (1996), el que presuntamente contenía 3 kpb de la región 3' del genoma de OYDV-G. Para constatar esto, se realizó un análisis parcial de la secuencia de este clon, lo cual permitió confirmar la presencia de secuencias ya identificadas para este virus. Con el objeto de explorar el posible efecto de la longitud de las secuencias expresadas sobre el desarrollo de la resistencia, se decidió encarar la obtención de dos construcciones distintas. Una de ellas (denominada pZPhygCP) comprendía la secuencia del gen de la CP y la región 3'NC del genoma viral; la segunda (denominada pZPhygA44) incluía la región 3' del gen de la replicasa viral, el gen de la proteína de cápside y la región 3'NC del genoma. Ambas construcciones se introdujeron en el vector binario para *A. tumefaciens*, pZP200hyg. Por ser éste un vector de alto número de copias, resulta igualmente apropiado para la producción a escala de ADN (lo cual es requerido para la técnica de bombardeo) y para la transformación mediada por agrobacterias (la que también se está tratando de implementar en el laboratorio para transformar el ajo).

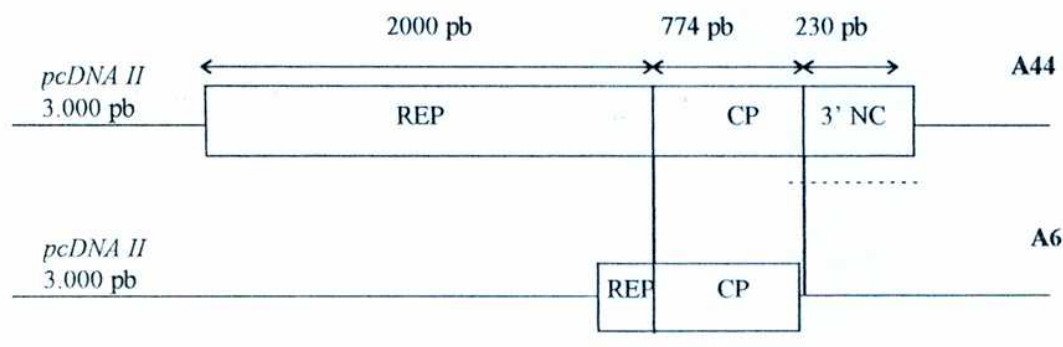


Fig 10: Representación esquemática de las ubicaciones del clon A6 con respecto al clon A44. REP: gen de la replicasa, CP: gen de la cápside, 3'NC: región 3' no codificante. Las líneas punteadas indican las regiones que habían sido previamente secuenciadas por Kobayashi *et al.* (1996).

#### 3.4.1 Identificación del clon A44

Para constatar que el clon A44 contenía parte del genoma de OYDV-G se realizó la secuenciación del gen de la CP. Dado que se sabían los tamaños correspondientes al gen de la CP en el clon A6 (774 pb) y al 3'NC de A44 (230 pb), se procedió a buscar el inicio del gen de la CP a 1 kpb del extremo 3' del inserto del clon A44. Con el fin de diseñar la estrategia de secuenciación, se confeccionó un mapa de restricción de este clon.



#### 3.4.1.1 Mapa de restricción de A44

Para la elaboración de este mapa se ensayaron varias enzimas. Los resultados de las digestiones se observan en la Fig. 11. A partir de los datos obtenidos se diseñó una estrategia de subclonado para la secuenciación del gen de la cápside del clon A44.

#### 3.4.1.2 Secuenciación del gen de la cápside del clon A44

Para determinar la secuencia del gen de la cápside del clon A44 se decidió utilizar el sitio de corte de *Eco* RV, ubicado a 1 kpb del extremo 3' del inserto. En la Fig. 12 se describen las construcciones realizadas y la estrategia de secuenciación. El secuenciamiento de las construcciones AXE, AHN, AXC y AXN permitió obtener la secuencia completa del gen de la cápside contenida en el clon A44.

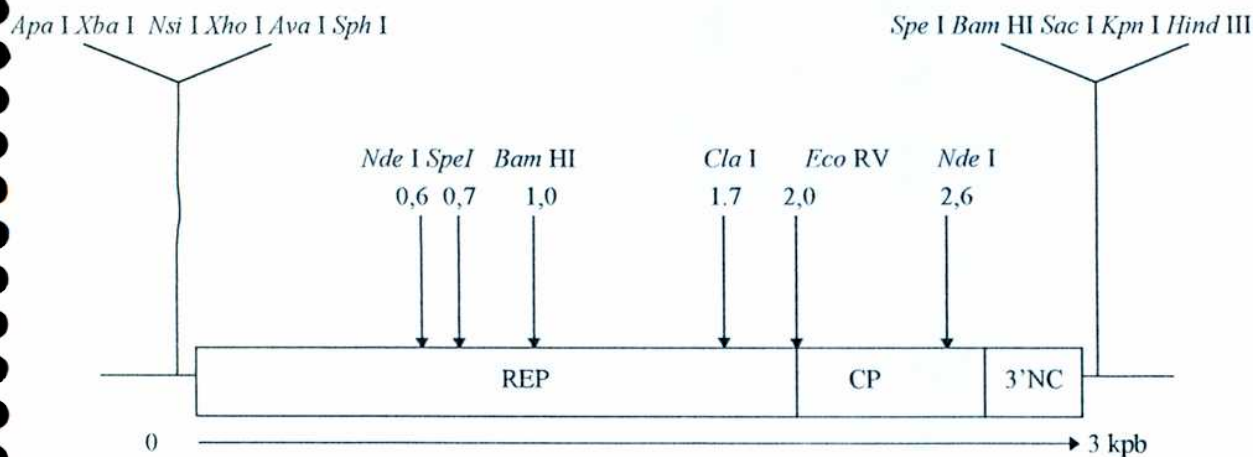
La comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de la cápside codificadas en los clones A6 y A44 (Fig. 13), permitió confirmar que este último contenía parte del genoma de OYDV-G.

#### 3.4.2 Obtención del plásmido pZPhygCP

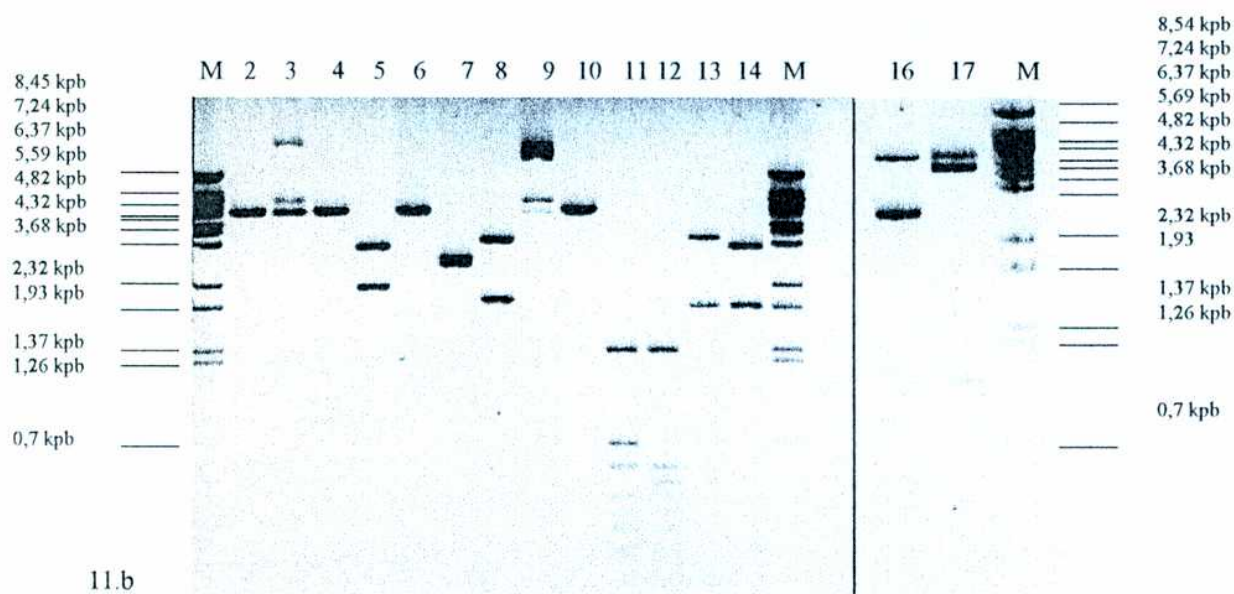
El desarrollo de la construcción pZPhygCP comprendió dos etapas. En la primera de ellas, la secuencia que comprende el gen de la CP y la región 3'NC se subclonó bajo la dirección del promotor p35S. Como se muestra en la Fig 14 (paso 1), ello se realizó reemplazando el gen *uid A* por la secuencia proveniente del plásmido AXE en el vector pGEMGUS. Esta construcción intermedia se denominó p35SCP. En la segunda etapa, el cassette de expresión de p35SCP se introdujo en el vector binario pZP200hyg (paso 2, Fig 14), lo que dio origen al plásmido pZPhygCP. Debido a que en el último subclonado el cassette p35SCP podía insertarse en cualquiera de las dos direcciones posibles, se realizó un análisis con la enzima *Sac* I para determinar la orientación correcta (Fig 15.a).

#### 3.4.3 Obtención del plásmido pZPhygA44

Para el desarrollo de esta construcción se decidió utilizar todo el inserto de ADNc contenido en el clon A44. Como en el caso anterior, la construcción comprendió también dos etapas. En la primera, la secuencia del clon A44 se colocó bajo la dirección del promotor p35S. Para ello se sustituyó el gen *uid A* en el vector pGEMGUS por la secuencia correspondiente a OYDV-G (paso 1, Fig 16). Esta construcción intermedia se denominó p35SA44. En la segunda etapa, el cassette de expresión de p35SA44 se insertó en el vector binario pZP200hyg (paso 2, Fig 16). Como resultado, se obtuvo la construcción pZPhygA44. También en este caso el fragmento p35SA44 podía ligarse en las dos orientaciones posibles. En consecuencia, se realizó un análisis de restricción con la enzima *Sac* I para dirimir la orientación correcta en la construcción final (Fig. 15.b).



11.a



11.b

Fig. 11. Mapa de restricción del clon A44. a. Representación esquemática de los sitios de corte de las enzimas de restricción, relativos al extremo 5' del clon. En los flancos del inserto se muestran las enzimas del sitio de clonado múltiple del vector *pcDNA11*. b. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los fragmentos obtenidos por digestión con diversas enzimas de restricción; M: marcador de peso molecular  $\lambda$ -Bst EII; 2: *Xba* I; 3: *Sph* I; 4: *Apa* I; 5: *Spe* I; 6: *Kpn* I; 7: *Nsi* I; 8: *Bam* HI; 9: *Eco* RI; 10: *Eco* RV; 11: *Hha* I; 12: *Hha* I + *Hind* III; 13: *Nde* I; 14: *Nde* I + *Hind* III; 16: *Eag* I; 17: *Eco* RV + *Hind* III.



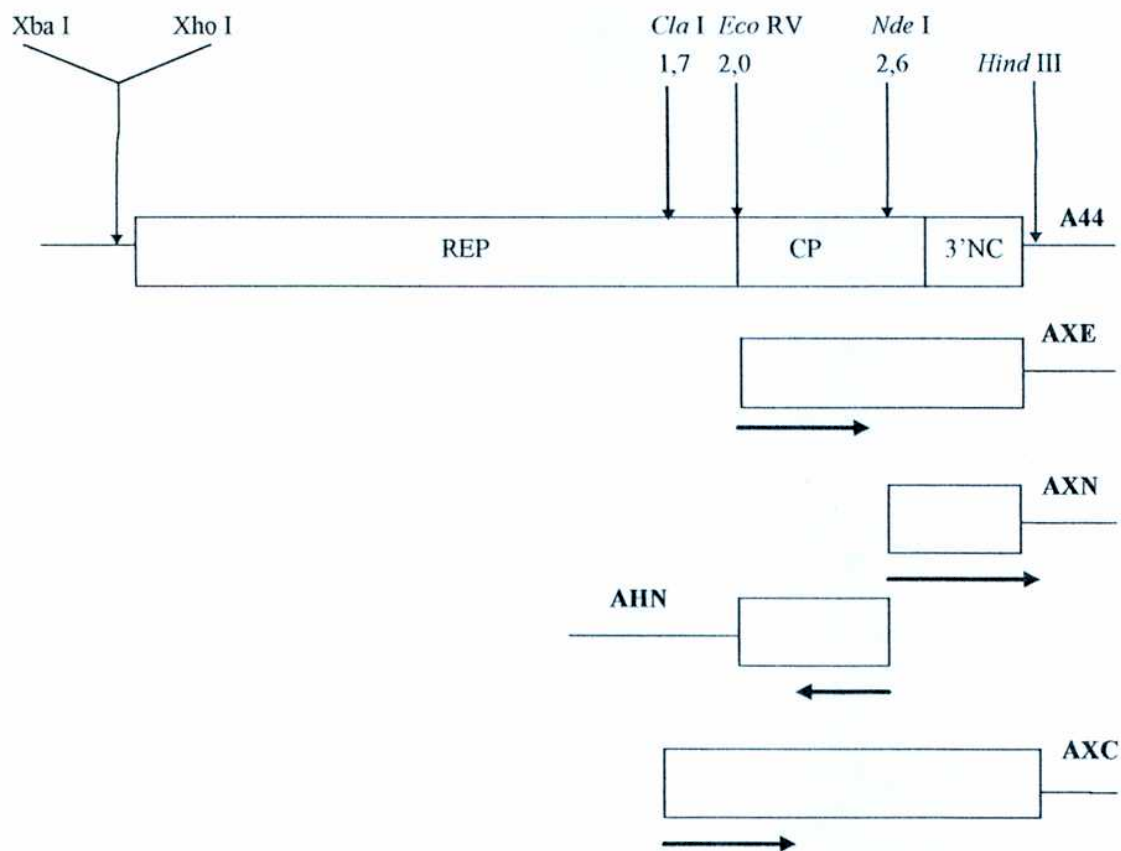


Fig 12. Representación esquemática de la estrategia seguida para obtener la secuencia del gen de la cápside del clon A44. Los subclones se obtuvieron a partir de deleciones del clon original utilizando los sitios de corte indicados. Las flechas indican las regiones secuenciadas de cada uno de ellos. A partir del mapa de restricción de A44 se obtuvieron las siguientes construcciones, por un sistema de dobles digestiones, llenado de extremos cohesivos con la enzima *Klenow*, y religado. AXE: digestión de A44 con *Xba* I y *Eco* RV; AXN: digestión de A44 con *Xho* I y *Nde* I; AHN: digestión de AXE con *Hind* III y *Nde* I; AXC: digestión de A44 con *Xho* I y *Cla* I.

AGTGEDAAAQ <b>S</b> TA <b>K</b> Q <b>I</b> AQKDKDQVDAGTTGKF <b>P</b> VPRIKALSDKMRFRKVG <b>K</b> MVVLNA <b>E</b> DLLAY <b>E</b>	<b>A44</b>
AGDGEDAAAQ <b>S</b> NT <b>S</b> KQ <b>V</b> SKQDKDQVDAGTTGKF <b>T</b> VPRIKALSDKMRFPKVG <b>K</b> SVVLNADLLAY <b>•</b>	<b>A6</b>
KPEDQ <b>I</b> OEL <b>•</b> NTRATAQ <b>Q</b> <b>•</b> FENW <b>Y</b> MA <b>I</b> KRE <b>Y</b> GVDDEQMKI <b>I</b> LDGLMVWCIENGTS <b>P</b> N <b>L</b> TGNWT <b>M</b> MDG	<b>A44</b>
K <b>P</b> <b>•</b> DQ <b>I</b> <b>•</b> ELYNTRATAQ <b>Q</b> <b>Q</b> FENW <b>F</b> GA <b>I</b> KKEYDVNDEQMKI <b>I</b> LNGLMVWCIENGTS <b>P</b> N <b>L</b> SGNWT <b>M</b> MDG	<b>A6</b>
DEQVEYPLAPILDNAK <b>P</b> <b>•</b> FRQIMAHFSDAAEAY <b>I</b> EYRNAT <b>G</b> KYMPRYGLQ <b>R</b> N <b>L</b> TELSLARYAFDF <b>Y</b> E	<b>A44</b>
DEQVEYPLAPILDNAK <b>P</b> <b>T</b> FRQIMAHFSDAAEAY <b>I</b> EYRNAT <b>E</b> KYMPRYGLQ <b>R</b> N <b>L</b> TELSLARYAFDF <b>Y</b> E	<b>A6</b>
MT <b>L</b> KTPKRAKEAHMQMKA <b>A</b> AVRGAA <b>N</b> R <b>L</b> FGLDGNVNTTEEDTERHTAADVN <b>Q</b> HQHT <b>T</b> LLGI <b>K</b> M*	<b>A44</b>
MT <b>S</b> KTPKRAKEAHMQMKA <b>A</b> AVRGAT <b>N</b> R <b>L</b> FGLDGNVNTTEEDTERHTAADVN <b>K</b> NQHT <b>•</b> LLGI <b>R</b> M*	<b>A6</b>

Fig 13: Comparación de secuencias aminoacídicas de las proteínas de la cápside de OYDV-G codificadas en los clones A44 y A6. Las letras en **negrita** indican los aminoácidos diferentes en las secuencias derivadas de los genes de ambos clones. Los “**•**” indican la ausencia de un aminoácido con respecto al otro clon.



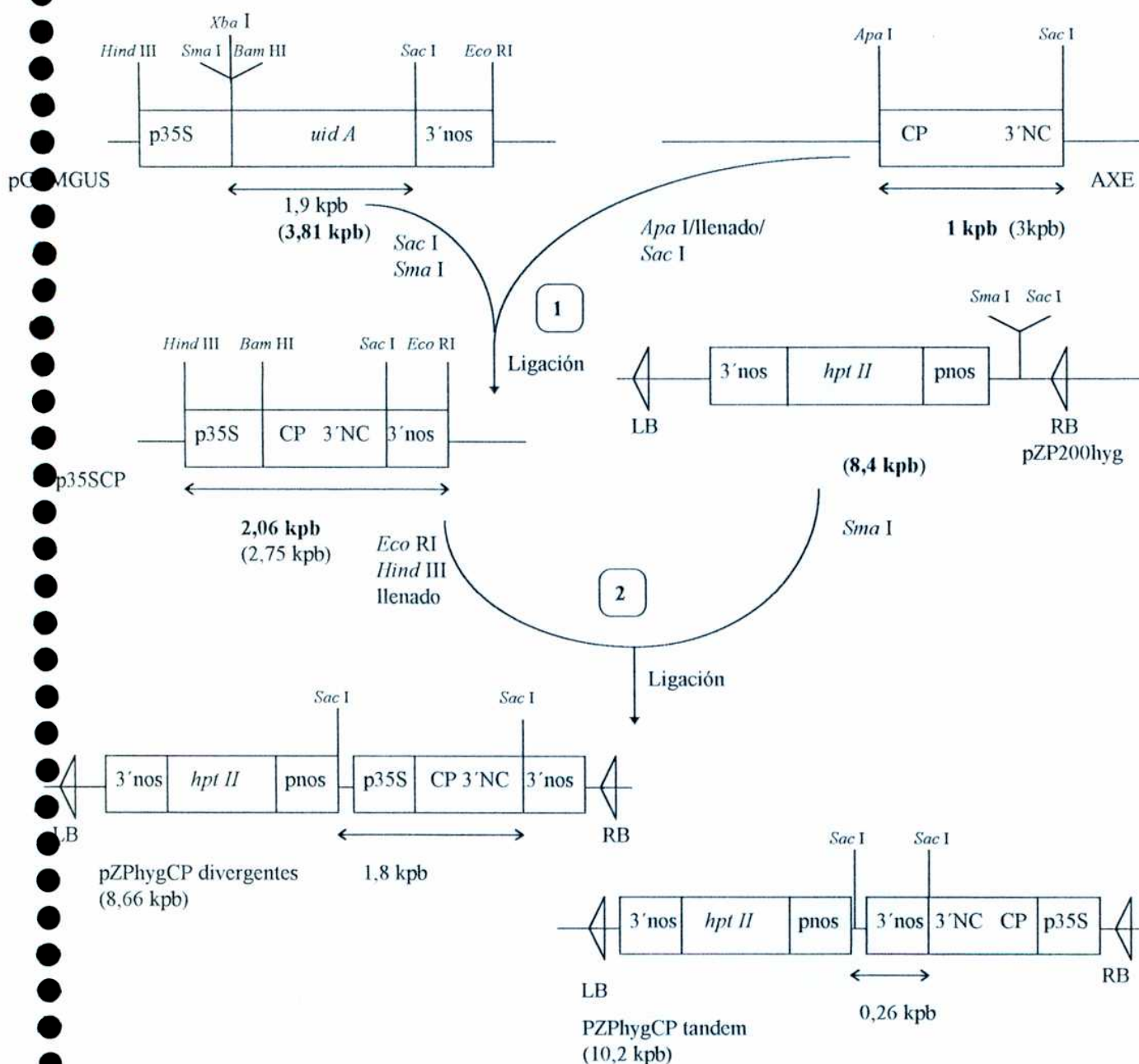


Figura 14: Representación esquemática de la construcción del vector pZPhygCP. 1: paso 1, ligación doble. 2: paso 2, ligación doble. *p35S*: promotor del transcripto 35S del CaMV; *uid A*: gen de la  $\beta$ -glucuronidasa; *hpt II*: gen de la higromicina fosfotransferasa; *3'nos*: región 3' del gen de la nopalina sintetasa; *pnos*: promotor de la nopalina sintetasa; *CP*: secuencia del gen de la cápside de OYDV-G del clon A44; *3'NC*: región 3' no codificante del genoma de OYDV-G del clon A44. RB: borde derecho del T-DNA; LB: borde izquierdo del T-DNA. Las flechas de dos puntas indican la longitud de la secuencia entre dos enzimas de restricción. Los números debajo de las flechas indican la longitud de dichos fragmentos. Los números entre paréntesis indican la longitud del resto del plásmido luego de la digestión con las enzimas. "llenado" indica la polimerización de extremos cohesivos con la enzima *Klenow*, la barra indica su inactivación. Los números en negrita indican la longitud del fragmento utilizado para el subclonado.

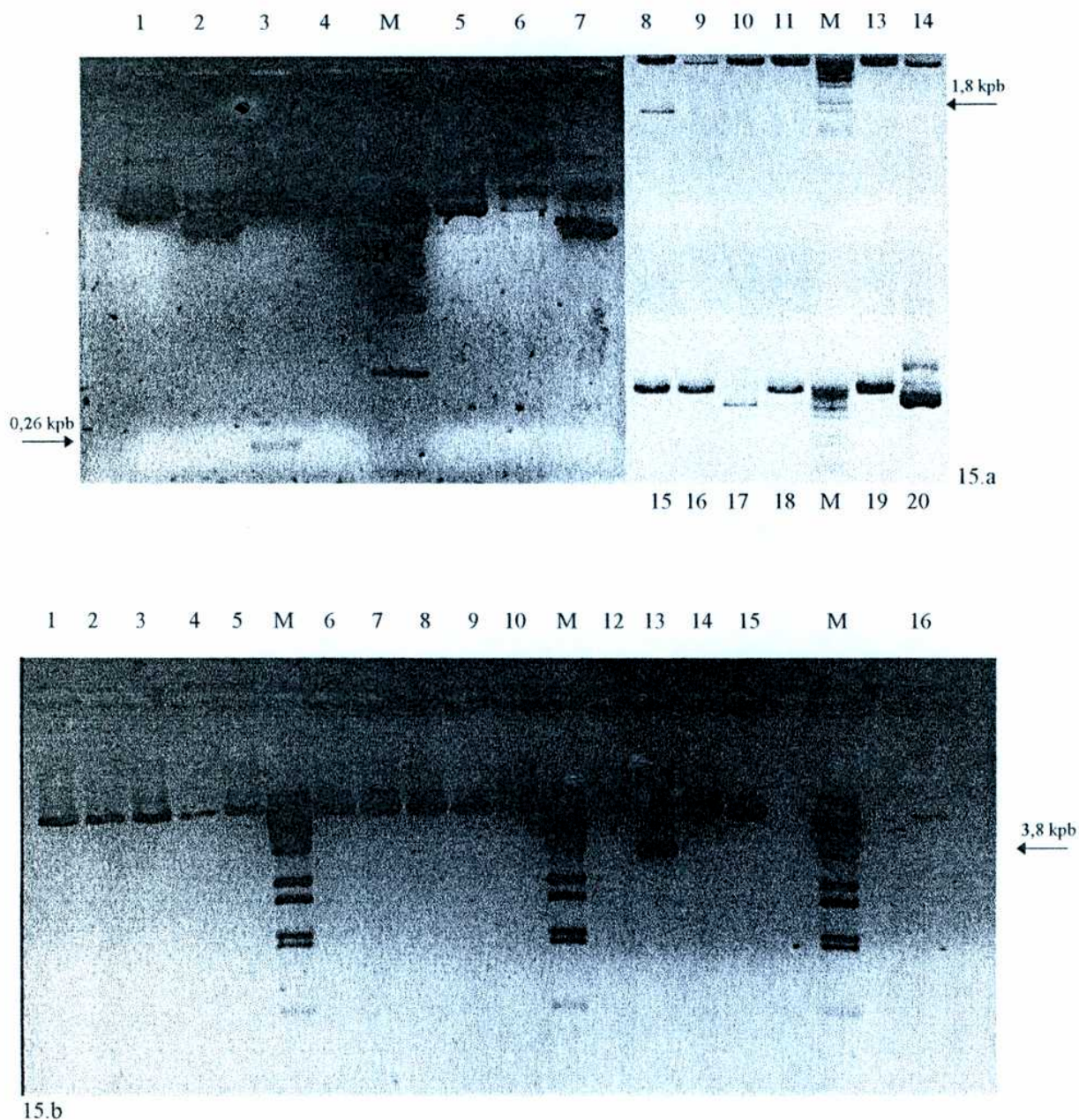


Fig 15. Identificación de las construcciones pZPhygCP y pZPhygA44. Se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico de colonias elegidas al azar y luego, estos clones fueron digeridos con *Sac* I, con el objeto de identificar los plásmidos recombinantes y sus orientaciones. Los productos de la reacción fueron separados por una electroforesis en gel de agarosa 1%. Las flechas indican la banda distintiva del plásmido recombinante. a. Vector pZPhygCP, en la calle 3 se identificó a pZPhygCP tandem (banda de 0,26 kpb) y en la calle 8 a pZPhygCP divergente (banda de 1,8 kpb). b. Vector pZPhygA44, en la calle 13 se identificó a pZPhygA44 divergente (banda de 3,8 kpb). M: marcador de peso molecular  $\lambda$ -BstE II.



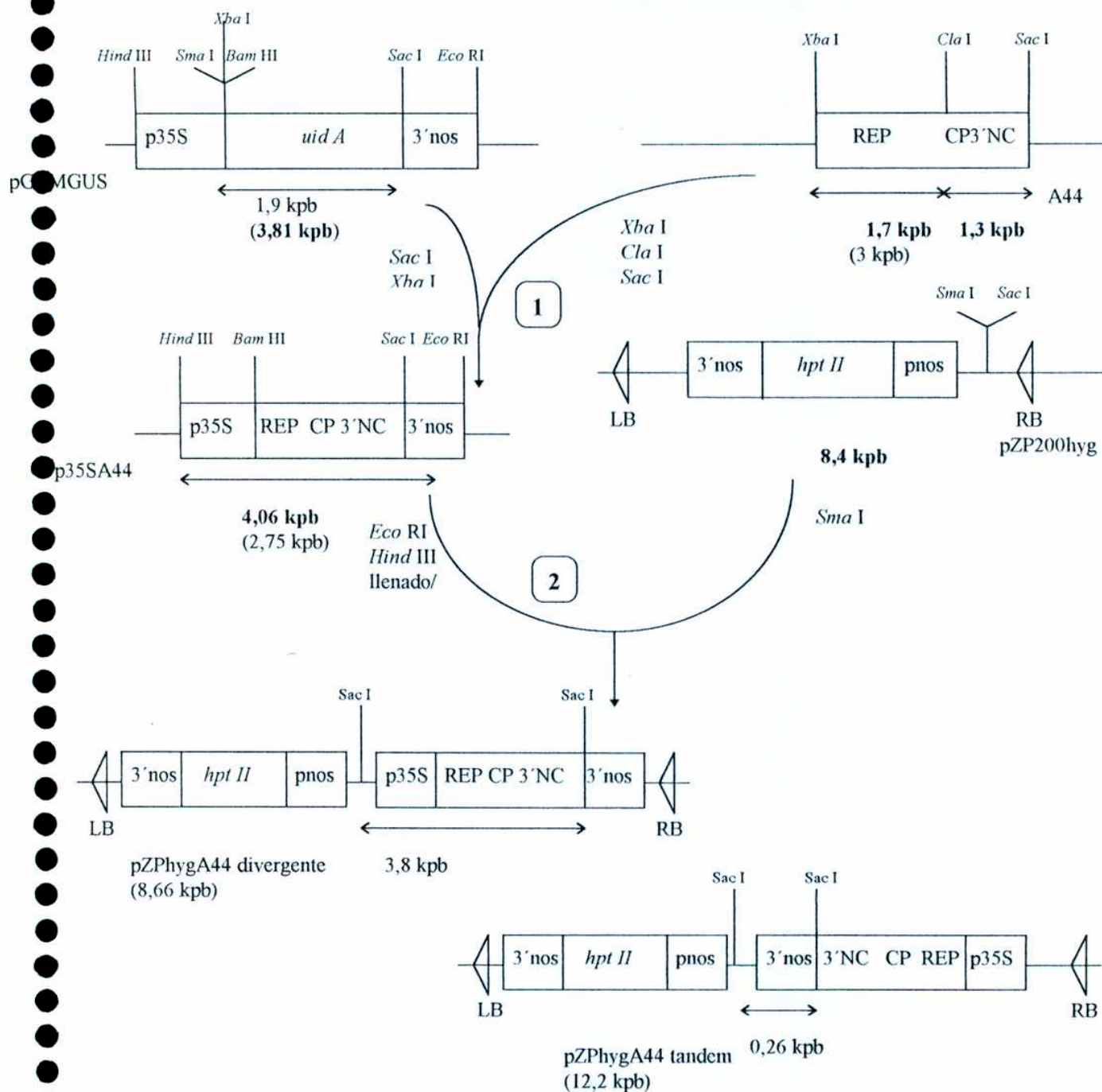


Figura 16: Representación esquemática de la construcción del vector pZPhygA44. 1: paso 1, ligación triple. 2: paso 2, ligación doble. p35S: promotor del transcripto 35S del CaMV; *uidA*: gen de la  $\beta$ -glucuronidasa; *hpt II*: gen de la higromicina fosfotransferasa; 3'nos: región 3' del gen de la nopalina sintetasa; pnos: promotor de la nopalina sintetasa; REP: región 3' del gen de la replicasa de OYDV-G del clon A44; CP: secuencia del gen de la cápside de OYDV-G del clon A44; 3'NC: región 3' no codificante del genoma de OYDV-G del clon A44. RB: borde derecho del T-DNA; LB: borde izquierdo del T-DNA. Las flechas de dos puntas indican la longitud de la secuencia entre dos enzimas de restricción. Los números debajo de las flechas indican la longitud de dichos fragmentos. Los números entre paréntesis indican la longitud del resto del plásmido luego de la digestión con las enzimas. "llenado" indica el rellenado de extremos cohesivos con la enzima *Klenow*, la barra indica su inactivación. Los números en negrita indican la longitud del fragmento utilizado para el subclonado.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Cultivo de Tejidos de *Allium sativum***

#### **4.1.1 Extracción de meristemas apicales**

Se compraron cabezas de ajo de la variedad “Colorado” en un comercio minorista. Se trabajó todo el tiempo en condiciones de esterilidad, en una cámara de flujo laminar. Se adoptó el siguiente procedimiento: 1) se pelaron los dientes de ajo; 2) se los lavó en etanol 70% durante 1 min; 3) se los esterilizó superficialmente en una solución de 16,5 g/l de hipoclorito de sodio durante 15 min; 4) se los lavó con H<sub>2</sub>O bidestilada autoclavada (20 min a 1 atm); 5) se cortó con bisturí a un tercio de la base del diente y se descartó la zona superior; 6) se descartó la base del diente con un pequeño corte al ras; 7) se hizo un corte de contorno a 3-5 mm de la base y se ajustó la forma del diente a la de un paralelepípedo, para un manipuleo sencillo; 8) se descartaron las hojas reservantes que recubrían al meristema con sus primordios foliares; 9) se trabajó bajo lupa con aumento de 10X: con agujas histológicas se removieron los primordios foliares y se llegó al meristema, de forma oval, de un diámetro de décimas milímetro; 10) se trasvasó a un tubo cilíndrico de 10 cm de alto por 1,2 cm de radio, que contenía medio para crecimiento de meristemas apicales D1 (Moriconi *et al.*, 1990). Los meristemas se mantuvieron en periodos de luz-oscuridad de 16 h, a 23±3 °C.

#### **4.1.2 Medios de cultivo para ajo**

Todos los medios de cultivo se basaron en el medio de Murashige y Skoog (1962). Se utilizó el medio MS de GIBCO BRL. Todas las preparaciones se hicieron a una concentración de 34,57 g/l y se disolvieron en H<sub>2</sub>O bidestilada. El medio base para el cultivo de tejidos de ajo se componía de medio MS, suplementado con: ácido nicotínico 0,5 mg/l, piridoxina-HCl 0,5 mg/l, glicina 2 mg/l, hemisulfato de adenina 80 mg/l (se filtró y se agregó después de autoclavar la solución), agar A 6.500 mg/l. Las hormonas utilizadas para suplementar los distintos medios fueron: ácido indolacético 0,1 mg/l; kinetina 0,1 mg/l (medio D1 para cultivo de meristemas); ácido indolacético 2 mg/l, kinetina 2 mg/l, 2,4-diclorofenoxiacético 1mg/l (medio R para desdiferenciación de callos); 2-isopenteniladenina 3 mg/l, ácido naftalenacético 0,3 mg/l (medio D5 para multiplicación de plantas adultas). Todas las hormonas fueron obtenidas de SIGMA, se prepararon a partir de soluciones stock concentradas 1.000X y se esterilizaron a través de filtros Millipore de 0,2 µm.

#### **4.1.3 Medios de selección**

Los medios de selección se basaron en los medios de cultivo normales, los que se suplementaron con distintas concentraciones del agente selector. Se preparó una solución *stock* de higromicina B y, a partir de ella, se obtuvieron los distintos puntos de la curva de selección. Las concentraciones finales utilizadas fueron de 25, 50, 75, 100, y 200 mg/l.

Se preparó una solución stock de fosfotricina de 1mg/ml, esterilizada por filtración. A partir de esta solución se elaboraron los distintos puntos de la curva de selección, que fueron de 0,5;1; 1,5 y 2 mg/l de solución de medio de cultivo.



#### 4.1.4 Callos embriogénicos derivados de meristema radicular

Los callos se obtuvieron a partir de raíces de plantas de ajo “Colorado” saneadas por termoterapia, provistas por el Ing. Agr. D. Moriconi. Se extrajeron raíces de plantas crecidas en medio de cultivo D5, se tomaron fragmentos de 1 cm que poseían el meristema radicular y se los colocó en cajas de Petri conteniendo medio R, manteniéndolos en oscuridad. El período de crecimiento de callos a partir de las raíces varió entre 2 y 5 meses, y la frecuencia de formación de callos embriogénicos fue menor al 20%. Se observó que las raíces más robustas eran las que daban más callos, mientras que raramente se observó esto en las más magras y filiformes.

La calidad de los callos variaba según su tamaño. Se comprobó que repicando callos por debajo de cierto tamaño (5 mm), el tejido se oxidaba (presuntamente por secreción de compuestos fenólicos), se cubría con una capa compacta de células muertas, y degeneraba. Otro inconveniente muy frecuente fue la contaminación de los tejidos, por la presencia de hongos y bacterias endofíticas. La frecuencia de aparición de este inconveniente fue superior en callos que en plantas saneadas o en meristemas de origen no saneado.

#### 4.1.5 Plántulas

Las plantas utilizadas fueron de la variedad ajo “Colorado”, saneadas por termoterapia y provistas por el Ing. Agr. D. Moriconi. Se las multiplicó en medio de D5, en frascos de vidrio cilíndricos de 3 cm de radio por 10 cm de alto. Se mantuvieron en períodos de luz-oscuridad de 16 h, a  $23\pm 3$  °C.

### **4.2 Tecnología de ADN recombinante**

Las técnicas de ADN recombinante que se mencionan en la sección de Materiales y Métodos del presente trabajo fueron realizadas de acuerdo con las técnicas estándar (Sambrook *et al*, 1989). Las enzimas se compraron a New England Biolabs, GIBCO BRL, Promega y se usaron según las indicaciones de los distintos proveedores. Para los análisis con enzimas de restricción se emplearon alrededor de 5 unidades de cada enzima para una alícuota de 300-500 ng de ADN plasmídico.

#### 4.2.1 Purificación de ADN plasmídico en pequeña escala

En general, los métodos más comúnmente usados para preparar ADN plasmídico se valen del tamaño relativamente pequeño de la molécula de ADN plasmídico y de su naturaleza circular covalentemente cerrada. En el caso de la lisis alcalina, se desnaturaliza tanto el ADN cromosómico como el plasmídico, aunque las hebras de este último no se separan por estar superenrollado. De esta manera, en el momento de la neutralización las hebras complementarias se aparean correctamente, quedando el plásmido en forma soluble, mientras que el ADN genómico, de gran tamaño, precipita formando una malla, junto con otros restos celulares. Es importante no usar agitador, y trabajar con cuidado para evitar la ruptura mecánica del ADN genómico, ya que si éste se fragmenta demasiado puede renaturalizarse con más facilidad y quedar soluble contaminando la preparación de plásmido.



#### 4.2.1.1 Purificación común

Se inocularon 5 ml de LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, llevado a pH 7,5 con NaOH y autoclavado) conteniendo el antibiótico para el cual confiere resistencia el plásmido que se deseó purificar, con una colonia aislada de bacterias transformadas. Se dejó crecer durante toda la noche a 37 °C con agitación constante hasta llegar a saturación. Se centrifugó a 5.000 g durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 300 µl de solución I (Tris-HCl, pH 8 25 mM, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM). Se agregaron 300 µl de solución II (NaOH 1,2 N, SDS 1%) y se mezcló suavemente por inversión (para reducir la contaminación con ADN cromosómico que se rompe *mecánicamente*). Se dejó de 3 a 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 300 µl de solución III (acetato de potasio 5 M 60 ml, ácido acético glacial 11,5 ml, H<sub>2</sub>O 28,5 ml), se mezcló suavemente por inversión y se dejó 10 min en hielo. Se centrifugó 10 min a 12.000 g y se recuperó el sobrenadante con cuidado para no remover el *pellet* (restos celulares y ADN cromosómico). Se extrajo el sobrenadante con fenol-cloroformo- alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó 5 min a 12.000 g para separar las fases. Se recuperó la fase acuosa (superior) y se extrajo con 1 vol de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó 1 min a 12.000 g. Se recuperó la fase acuosa (superior). Se agregaron 2 vol de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se dejó 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 min a 12.000 g. Se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el *pellet* en 200 µl de H<sub>2</sub>O. Se agregaron 2 µl de una solución 10 mg/ml de RNasa A y se incubó a 37 °C durante 30 min. Se agregaron 20 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5,2 y 450 µl de etanol absoluto. Se dejó 10 min a 4 °C. Se centrifugó y se resuspendió el *pellet* en 20 µl de H<sub>2</sub>O. En general, 3 µl de esta solución eran suficientes para realizar un análisis con enzimas de restricción.

#### 4.2.1.2 Purificación con polietilenglicol

El ADN plasmídico se obtuvo a partir de una minipreparación pero, para mejorar la calidad del mismo se introdujeron las siguientes modificaciones. A partir del momento en que se agregó la solución III, se centrifugó 10 min a 12.000 g, y se tomaron 750 µl del sobrenadante. Se agregaron 0,6 vol de isopropanol 100% (500 µl) y se mezcló por inversión. Se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13.000 r.p.m. por 10 min y se descartó el sobrenadante. Se lavó el *pellet* con 500 µl de etanol 70%, se descartó el sobrenadante, se secó el *pellet* y se lo resuspendió en 300 µl. Luego se agregaron 30 µl de acetato de sodio 3 M pH 5,2. Se extrajo con 1 vol de cloroformo, se centrifugó y se tomó la fase acuosa. Se precipitó el ADN con 1 vol de isopropanol 100%. Se centrifugó 10 min a temperatura ambiente. Se lavó el *pellet* con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 32 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada, 8 µl de NaCl 4 M y 40 µl de polietilenglicol 8.000 13% y se mezcló vigorosamente. Se incubó en hielo durante 20 min y se centrifugó a 13.000 r.p.m. a 4 °C. Se descartó el sobrenadante. Se lavó el *pellet* con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 20 µl. Se obtuvieron rendimientos cercanos a 400-500 ng/µl, cuantificado en geles de agarosa.

#### 4.2.2 Preparación de ADN plasmídico a gran escala (maxipreparación)

Para la purificación del ADN plasmídico en gran escala se utilizó el *kit* comercial “QIAGEN tip 500 Maxi”, de la empresa QIAGEN.



#### 4.2.3 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*. Todos los cultivos fueron hechos en medio LB. En el caso de medio sólido se agregó ágar hasta una concentración final de 1,5%. Para seleccionar colonias resistentes, el medio fue suplementado con: ampicilina (100  $\mu$ g/ml) o espectinomicina (100  $\mu$ g/ml).

#### 4.2.4 Ligación de ADN con extremos cohesivos y romos con T4 ADN ligasa

Las ADN ligasas catalizan la formación de enlaces fosfodiéster entre los fosfatos de extremos 5' y los hidroxilos de los extremos 3' del ADN. La mezcla de reacción estaba compuesta por: 40 mM de Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10 mM de DTT; 10-50 ng de ADN vector; una cantidad variable de inserto de ADN; 0,5 mM de ATP; 50  $\mu$ g/ml de BSA, 1U "Weiss" de T4 ADN ligasa; H<sub>2</sub>O c.s.p. 20  $\mu$ l. Se incubó a 12-16 °C durante 10-16 h. Se detuvo la reacción mediante el agregado de 0,2  $\mu$ l de EDTA 0,5 M.

La relación entre los extremos libres pertenecientes al vector y al fragmento debía ser tal que se favoreciesen los enlaces intermoleculares. Dada la imposibilidad de conocer con exactitud la concentración de extremos libres, se optó por realizar una curva de reacciones de ligación con distintas relaciones molares entre vector e inserto. Para ello, se mantuvo constante la concentración del vector y se varió la concentración de inserto en un rango que iba desde 1:1 a 6:1/ moles inserto:moles vector.

#### 4.2.5 Purificación de fragmentos de ADN por electroelución

La electroelución de ADN de geles de agarosa es utilizada frecuentemente para aislar un fragmento de ADN en una muestra que contiene otros de distinto tamaño. Para lograrlo, se digirió el ADN con las enzimas de restricción adecuadas, se separaron los fragmentos producidos por medio de una electroforesis en gel de agarosa y se procedió a electroeluir la banda de interés. Los pasos a seguir fueron los siguientes: se corrió la muestra digerida en un gel de agarosa hasta que las bandas a separar estuviesen bien alejadas; se visualizó la banda a extraer con un transiluminador de luz UV y se cortó con un bisturí el trozo del gel que contuviese la banda; se colocó el trozo de gel dentro de un tubo para microcentrífugas Eppendorf siliconado de 0,5 ml con un agujero en el fondo tapado con lana de vidrio; se colocó el tubo dentro de otro tubo Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 15 min; se descartaron los restos de agarosa del tubo chico y se precipitó el ADN con 3 vol de etanol y 0,5 vol de acetato de amonio 7,5 M; por último, se resuspendió en H<sub>2</sub>O.

#### 4.2.6 Preparación de bacterias *E. coli* competentes

A partir de una colonia aislada en una placa de medio mínimo (o del medio selectivo adecuado para la cepa de *E. coli* a utilizar), se realizó una estría en una placa de medio LB. Luego de incubar durante toda la noche, se tomaron con un ansa varias colonias de aproximadamente 2-3 mm de diámetro, se las colocó en un tubo Falcon de 50 ml con 5 ml de medio LB, se la dejó crecer 10-16 h, y se tomó 1 ml para inocular 100 ml de LB contenidos en un Erlenmeyer de 500 ml. Se incubó a 37°C con agitación hasta DO<sub>550</sub> = 0,45 y luego se enfrió el cultivo colocándolo en hielo durante 15 min. Se cosecharon las bacterias por centrifugación en tubos de 50 ml a 3.500 r.p.m. durante 15 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante por volcado suave. Las células se resuspendieron en TBF I (KCl 100 mM, acetato de potasio 30 mM, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 50 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10 mM, 15% glicerol, llevado



a pH 5,8 con ácido acético 0,2 M), utilizando la mitad del volumen original. Se dejó en hielo por 5 min y luego se centrifugó por 5 min a 3.000 r.p.m., a 4°C. Se descartó el sobrenadante por volcado suave y se resuspendió en 1/10 de vol de TBF II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 15% glicerol). Se incubó en hielo por 15 min y se alicuotó (en Eppendorf de 1,5 ml) de a 300 µl. Se congeló en hielo seco y luego se guardó a -80 °C. Para cada evento de transformación se utilizaron 50 µl de bacterias. Después de la preparación de bacterias, se hizo un ensayo de viabilidad para determinar la eficiencia de la preparación.

#### 4.2.7 Transformación de bacterias *E. coli* competentes

Se agregó ADN (en un volumen máximo de 5 µl) a un tubo conteniendo 50 µl de células competentes. Se agitó y se incubó en hielo durante 40 min. Se colocó el tubo en un baño de 42 °C durante 90 seg y luego en hielo durante 2 min. Se agregaron 800 µl de medio LB y se incubó a 37 °C por 45 min con agitación moderada. Se centrifugó durante 5 seg en microcentrífuga y se descartaron 800 µl del sobrenadante. Luego de resuspender las células en los 200 µl restantes del sobrenadante, se las sembró sobre una placa de Petri conteniendo medio selectivo. Se incubó por 10-16 h a 37 °C.

#### 4.2.8 Llenado de extremos 5' protruyentes con la enzima Klenow

Se utilizó el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli* sintetizado por *New England Biolabs*, USA y se lo utilizó según las instrucciones del distribuidor.

#### 4.2.9 Creación de extremos romos con la T4 DNA polimerasa

Se utilizó la enzima T4 DNA polimerasa del fago T4 de *New England Biolabs*, USA y se la implementó según las instrucciones del distribuidor.

#### 4.2.10 Defosforilación de los extremos 5' protruyentes y romos

Se utilizó la enzima CIP de *New England Biolabs*, USA según las instrucciones del distribuidor.

#### 4.2.11 Construcción de plásmidos

##### 4.2.11.1 pGUS<sub>hyg</sub>

Para la construcción del vector pGUS<sub>hyg</sub> se partió de tres construcciones previas:

1. pGEMGUS (cedido por el Dr. F. Bravo Almonacid) posee el gen de la β-glucuronidasa (*uid A*), dirigido por el promotor del transcripto 35S del CaMV (p35S), y la secuencia terminadora de la transcripción del gen de la nopalina sintetasa (3' nos).
2. pGSC1703A (vector binario desarrollado por Plant Genetics Systems, Bélgica) posee los promotores Tr 1 y 2, de la síntesis de octopinas. El pTr 1 dirige la expresión del gen de la higromicina fosfotransferasa II (*hpt II*), con la secuencia terminadora de la transcripción del gen de la octopina sintetasa (3' ocs). El pTr 2 dirige la expresión del gen de la neomicina fosfotransferasa II (*npt II*), con la secuencia terminadora de 3' de g7. Una desventaja del vector es poseer un origen de replicación de bajo número de copias, lo cual fue un fuerte obstáculo para obtener un alto rendimiento en la purificación del mismo.



3. pBS8, derivado del vector comercial pBluescriptSK+ (Stratagene), contiene un inserto que codifica para la cápside viral de PVY, de 1,2 kpb, en el sitio *Eco* RI. La ventaja de este vector consiste en poseer un origen de replicación de alto número de copias.

Se digirió vector pGEMGUS (a partir de una muestra purificada y concentrada en gradiente de CICs) con las enzimas *Bam* HI y *Eco* RI. Se purificó el fragmento de 2.160 pb (contenía la secuencia de *uid A* y 3' nos), por el sistema de electroelución en geles de agarosa. Se digirió pBS8 (a partir de una muestra purificada y concentrada en gradiente de CICs), con las enzimas *Xba* I y *Eco* RI. Se purificó el fragmento de 2,95 kpb (el vector pBluescript, linealizado sin inserto), como en el caso anterior. Asimismo, se digirió al vector pGSC1703A con *Xba* I y *Bam* HI, y se purificó el fragmento de 2,2 kpb (los promotores Tr, la secuencia del gen de *hpt II* y el 3' ocs), por el mismo método antes descrito. La relación de la reacción de ligación fue de 1:1:1 molar o 1:1:1 masa entre los distintos fragmentos. Se transformaron bacterias *E. coli* competentes según el protocolo descrito y se utilizó ampicilina como antibiótico para la selección de las bacterias transformantes. Se hicieron minipreparaciones plasmídicas de las colonias obtenidas y se las sometió a diversas digestiones para determinar la existencia de clones recombinantes.

#### 4.2.11.2 Construcciones AXE, AXN, AXC y AHN

Para la construcción de AXE, AXN y AXC se partió del clon A44 de la biblioteca genómica construida por Kobayashi *et al.* (1996), en el vector comercial *pcDNAII* (Invitrogen). Excepto por las enzimas de digestión, en los tres casos se utilizó el mismo material de partida y se rellenaron los extremos 5' protruyentes con la enzima *Klenow* de la DNA polimerasa de *E. coli* y se ligaron según el protocolo 4.2.4. La transformación fue según la descrita en el protocolo del punto 4.2.7.

AXE: fue digerido con las enzimas *Xba* I y *Eco* RV, para liberar un fragmento de 2 kpb, se rellenaron los extremos y se religó el vector, obteniéndose un plásmido de 4 kpb. AXN: A44 fue digerido con *Xho* I y *Nde* I, para liberar fragmentos de 0,6 y 2 kpb, se rellenaron los extremos y se religó, poseyendo una longitud de 3,5 kpb. AXC: A44 se digirió con *Xho* I y *Cla* I, se procedió como en los otros casos, obteniéndose un plásmido de 4,3 kpb. AHN: se digirió AXE con las enzimas *Nde* I y *Hind* III. Se prosiguió como en los casos anteriores, obteniéndose un plásmido de 3,5 kpb.

La confirmación de los distintos clones se hizo por dobles digestiones: AXE, al digerirse con *Nsi* I y *Apa* I liberó los fragmentos de 3 y 1,2 kpb. AXN liberó fragmentos de 0,6 kpb y 3 kpb al digerirse con *Nsi* I y *Apa* I. AHN liberó fragmentos de 0,4 y 3 kpb al ser digerido con las mismas enzimas. AXC liberó fragmentos de 1 y 3,3 kpb al digerirse con *Eco* RV y *Hind* III. La detección de los distintos fragmentos permitió caracterizar las construcciones respectivas.

#### 4.2.11.3 pZPhygCP

Para la primera etapa se partió de AXE y pGEMGUS. AXE se digirió con la enzima *Apa* I, se tornó como el extremo 3' protruyente con la enzima T4 DNA polimerasa, se inactivó la enzima y se cortó con *Sac* I, liberándose un fragmento de 1 kpb, el cual fue aislado como se describe en el punto 6.2.5. Se digirió pGEMGUS con *Sma* I y *Sac* I y se purificó el fragmento de 3,81 kpb. Se tomaron los fragmentos aislados, se los ligó según 4.2.4 y se transformó con la mezcla de reacción, según el punto 4.2.7. Se obtuvo el plásmido p35SCP, aislado en medio con ampicilina. En la segunda etapa se digirió esta construcción con *Eco* RI y *Hind* III, con un rellenado de los extremos. Se aisló el fragmento de 2,06 kpb. Se digirió el vector



pZP200hyg (CyTED) con *Sma* I, los extremos se sometieron al tratamiento con fosfatasa alcalina, se inactivó la enzima y se utilizó parte de esta mezcla de reacción para la ligación con el fragmento de 2,06 kpb de p35SCP. Se transformó de acuerdo a 4.2.7 y las minipreparaciones, obtenidas en medio rico con espectinomicina de las colonias obtenidas, fueron digeridas con *Sac* I, liberando los fragmentos de 0,26 y 10,2 kpb para las construcciones de pZPhygCP con los genes en tandem, y de 1,8 y 8,66 kpb para la construcción de pZPhygCP con los genes orientados en sentido divergente.

#### 4.2.11.4 pZPhygA44

Se partió del clon A44, el cual fue digerido con tres enzimas, *Xba* I, *Cla* I y *Sac* I, aislándose los fragmentos de 1,3 y 1,7 kpb. Se digirió a pGEMGUS con *Sac* I y *Xba* I, y se aisló el fragmento de 3,81 kpb. Los fragmentos aislados fueron ligados según 6.2.4 y transformados en bacterias *E. coli* competentes según 4.2.7. Se obtuvieron colonias en LB con ampicilina y a la construcción intermedia se la denominó p35SA44. A partir de este paso se procedió igual que con pZPhygCP. Al digerirse las colonias recombinantes con *Sac* I sólo se obtuvo uno de los clones esperados, pZPhygA44 con los genes orientados en sentido divergente, que liberó un fragmento de 10,2 kpb y otro de 1,8 kpb.

#### 4.2.12 Electroforesis en geles de agarosa nativos

Se utilizaron geles de agarosa 1%. El *buffer* utilizado fue TBE (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM, pH8). Los geles contenían 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. En general, las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm y a temperatura ambiente. La composición del *buffer* de siembra 5X utilizado fue glicerol 50%, TBE 5X y BPB 1%. Los geles fueron fotografiados en un transiluminador de luz ultravioleta de 300 nm, una cámara Polaroid MP-4 con filtro rojo (RCP4) utilizando una película Polaroid 667.

#### 4.2.13 Secuenciación de ADN doble cadena

Se realizó por el método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977).

##### 4.2.13.1 Secuenciación automática

Se siguió el protocolo descrito por *Prism™ Ready Reaction Dye Primer Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). Se utilizó 1 µg de templado -purificado por el método de polietilenglicol- por reacción. Se utilizaron los primers Forward y Reverse (provistos por el fabricante) marcados fluorométricamente para cada dideoxinucleótido. Se utilizó un secuenciador automático *Applied Biosystems*, de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes.

### 4.3 Técnicas de bombardeo

#### 4.3.1 Preparación de los explantos de ajo para el bombardeo

##### 4.3.1.1 Brotes apicales

Se tomaron brotes de ajo y se extrajeron las hojas, hasta lograr una buena exposición del meristema. Se trasvasaron a un medio D1 común y se los dejó hasta el día siguiente en el régimen de luz-oscuridad y temperatura mencionados en el apartado de extracción de meristemas. Al día siguiente, 4 h antes del bombardeo, los explantos se trasvasaron a medio



D1 osmótico (12 % de sacarosa, 1 % ágar). Los brotes fueron posicionados de forma que los meristemas recibieran las micropartículas recubiertas con ADN. Al cabo de las 4 h se bombardearon los brotes meristemáticos. Permanecieron en el medio D1 osmótico por 24 h, hasta la realización del ensayo histoquímico de actividad  $\beta$ -glucuronidasa.

#### 4.3.1.2 Meristemas

Se extrajeron meristemas mediante el procedimiento descrito anteriormente. Se transvasaron los explantos a un medio D1 osmótico 5 h antes del bombardeo con las micropartículas. Se siguió el mismo procedimiento que en el caso de los brotes apicales.

#### 4.3.2 Preparación de micropartículas

##### 4.3.2.1 Preparación de la suspensión de micropartículas:

Se pesaron 60 mg de micropartículas de tungsteno de 0,8  $\mu\text{m}$  (Sylvania M10) y se las resuspendió en 1 ml de etanol 100%. Se las dispersó en un baño ultrasónico durante 5 min. Se centrifugó durante 5 min a 13.000 r.p.m. a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril. Se repitió la centrifugación y la resuspensión de la preparación dos veces más. Finalmente, se resuspendieron las partículas en  $\text{H}_2\text{O}$  estéril y se las dispersó con Vórtex.

##### 4.3.2.2 Recubrimiento de las micropartículas con ADN

Se tomaron 50  $\mu\text{l}$  de una suspensión de micropartículas a 60 mg/ml. Se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de ADN, 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Se agitó la muestra con Vórtex y se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  2,5 M y 20  $\mu\text{l}$  de espermidina 100 mM. Se agitó la muestra con Vórtex por 10 min y luego se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 5 seg. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de etanol 100%. Se resuspendió en Vórtex hasta la eliminación de grumos. Se repitieron la centrifugación y la resuspensión una vez más. Las micropartículas se resuspendieron en 60  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto y se colocaron sobre las membranas macrocargadoras en sus respectivos soportes. La suspensión se agitó vigorosamente con Vórtex y se depositaron 10  $\mu\text{l}$  de la misma en cada membrana. Se secó el etanol por exposición al ambiente.

#### 4.3.3 Cañón de micropartículas de alta presión y bombardeo de los explantos

El acelerador de micropartículas a alta presión de gas helio fue descrito por Aragão *et al.* (1996). Los siguientes accesorios son necesarios para el funcionamiento del sistema: una bomba de vacío ( $\frac{3}{4}$  a 1 HP), un tanque de gas helio comprimido (ultrapuro), un regulador de alta presión del gas. La distancia entre la cámara de gas de alta presión (generadora de la onda de choque) y la membrana cargadora conteniendo las micropartículas cubiertas con ADN es de 8 mm. La distancia entre la malla de retención y la membrana macrocargadora es de 13 mm. La distancia entre la malla de retención y el material a ser bombardeado es de 60 mm. La presión de vacío generada es de 27 pulgadas de Hg (700 mm de Hg). La presión de gas helio utilizada fue de 1.100 psi.

Se abrió la válvula de salida del gas helio y se ajustó el regulador de alta presión a 1.100 psi. Se colocaron las membranas de ruptura en la tuerca de la cámara de alta presión de helio (a razón de una cada 300 psi) y se ajustó la tuerca. Se colocó la malla de retención en el cilindro de bronce y la membrana macrocargadora en su soporte y sobre el cilindro de bronce. Se



colocó el cilindro de bronce en la bandeja superior del cañón. En la bandeja inferior se ubicó una placa de Petri (con medio D1) conteniendo los explantos. Se cerró la puerta de la cámara y se encendió la bomba de vacío. Mientras la presión disminuía, se abrió la llave de entrada de helio a la cámara de alta presión y se la volvió a cerrar. Cuando la presión llegó a 27 pulgadas de Hg, se cerró la llave de “entrada” de vacío y se accionó el disparador. Se abrió la válvula de salida de vacío, y la llave de salida para eliminar el gas sobrante. Al abrir la cámara se retiró la placa de Petri con el material bombardeado. Los explantos utilizados en el ensayo se incubaron a la temperatura y fotoperíodo convencionales, durante 24 h, previo al ensayo de expresión transitoria mediante el análisis histoquímico de  $\beta$ -glucuronidasa.

#### 4.3.4 Análisis histoquímico de actividad $\beta$ -glucuronidasa

El ensayo de GUS permite visualizar actividad  $\beta$ -glucuronidasa en preparados histológicos o en tejidos enteros. La mayoría de las células vegetales no poseen dicha actividad, por lo que el gen *uid A*, dirigido por un promotor vegetal, es efectivo para reportar la expresión transgénica. Sin embargo, hay algunos casos (Gallagher, 1992) en que se observó actividad endógena, la que puede dar falsos positivos. Para reducir esta actividad se implementaron modificaciones en el *buffer* de la reacción, cuyo pH normal es 7; incrementándolo a 8, o bien agregando metanol a una concentración final de 20%.

Composición de los distintos *buffer* utilizados:

<u>Buffer pH 7</u>	<u>Buffer pH 8</u>	<u>Buffer metanol 20%</u>
50 mM NaPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> pH 7	50 mM NaPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> pH 8	50 mM NaPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> pH 7
0,5 % Tritón X-100	0,5 % Tritón X-100	0,5 % Tritón X-100
0,5 mM Ferricianuro	0,5 mM Ferricianuro	0,5 mM Ferricianuro
0,5 mM Ferrocianuro	0,5 mM Ferrocianuro	0,5 mM Ferrocianuro
10 mM EDTA	10 mM EDTA	10 mM EDTA
		20% metanol

Luego de comprobar que los explantos poseían actividad  $\beta$ -glucuronidasa endógena cuando eran tratados con el *buffer* pH 7, se ensayó con los otros dos *buffers*, siendo el óptimo el *buffer* metanol 20%. Se incubó 16 h a 37 °C, se lavó varias veces con etanol 96% y se observaron los puntos azules con una lupa estereoscópica.

#### 4.3.5 Software utilizado para el análisis de secuencias

Se utilizaron los programas FASTA y DNASIS.

## **DISCUSIÓN**



## 5. DISCUSIÓN

El presente trabajo de Tesis de Licenciatura involucra distintos aspectos relacionados con la puesta a punto de la transformación de ajo. Aunque preliminares, los resultados obtenidos representan un avance importante en esta dirección y han permitido sentar las bases para optimizar este proceso en el futuro. A continuación, se discuten los principales resultados obtenidos en cada uno de los campos implicados.

### 5.1 Elección de un gen selector

Tanto los meristemas como los distintos tipos de callos embriogénicos son explantos adecuados para encarar la transformación de ajo por su capacidad de regenerar plantas enteras. Por esta razón, se los eligió como material de partida en los ensayos de susceptibilidad a distintos agentes selectivos.

Los genes *npt II*, *hpt II* y *bar*, que, respectivamente, confieren resistencia a kanamicina, higromicina y fosfinotricina, son los más frecuentemente utilizados en la selección de plantas transformadas. Para determinar la utilidad de estos agentes en la selección de tejidos transformados de ajo, se realizaron curvas de susceptibilidad a cada uno de ellos empleando distintos explantos de ajo y plántulas *in vitro*. En análisis efectuados previamente en el laboratorio se había demostrado que la kanamicina no era eficaz como agente selector en callos y plántulas de ajo hasta concentraciones de 100 mg/l. Estos resultados concordaban con otros trabajos reportados en la literatura, que sugieren que la kanamicina es un mal agente selector para monocotiledóneas (Wilmink y Dons, 1993; Schoepke *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la higromicina actúa como un buen agente selector en brotes apicales a una concentración de 25 mg/l y que la fosfinotricina disminuye fuertemente la tasa de crecimiento de callos embriogénicos a partir de 2 mg/l. Sin embargo, tanto la higromicina en callos como la fosfinotricina en meristemas, fueron ineficaces en los rangos de concentración probados: no se observó inhibición en el crecimiento de callos en medio conteniendo 200 mg/l de higromicina, ni se observó necrosis en meristemas conteniendo 2 mg/l de fosfinotricina. Este último hecho resulta contradictorio con lo observado en plántulas, en las que se constató necrosis a partir de concentraciones de 0,5 mg/l de fosfinotricina. Sin embargo, esta discrepancia es aparente, ya que los tiempos empleados para los distintos explantos son distintos.

La susceptibilidad diferencial de los distintos explantos a la fosfinotricina había sido observada ya por otros autores (Wilmink y Dons 1993; Casas *et al.*, 1993) que demostraron que el tejido de callos era resistente a concentraciones que producían necrosis en las plántulas. Se ha intentado explicar este fenómeno en base a que el blanco de acción de la fosfinotricina, la enzima glutamina sintetasa, presenta mayores niveles de actividad durante la fotosíntesis, y a que los callos, al crecer en la oscuridad, serían menos susceptibles al agente selector. Sin embargo, no se dispone de una explicación coherente para justificar la falta de susceptibilidad observada en los tejidos meristemáticos.

Para elegir el tipo de explanto con que se proseguiría trabajando, se sopesaron las ventajas y desventajas que presentaban callos y meristemas. Los callos presentan un crecimiento lento, una alta contaminación endofítica y el riesgo de generar variación somaclonal en cultivos prolongados (Novák y Dolezel, 1982). Este último hecho podía afectar las características del



cultivar seleccionado para la transformación. Por otra parte, una posible ventaja de los callos embriogénicos, el poder disponer de una gran masa de tejido para los ensayos de transformación, no pudo ser capitalizada en el caso de ajo, debido a las bajas tasas de desarrollo de embriones somáticos y de regeneración de plantas obtenidas mediante el procedimiento puesto a punto en el laboratorio. Mientras se continúa trabajando para hacer mas eficientes estos procesos, se decidió utilizar meristemas, ya que éstos presentan las ventajas de una obtención relativamente fácil y un crecimiento muy rápido, con tasas de regeneración altas.

Esta decision condujo a elegir a la higromicina B como agente selector. Esta elección se vio reforzada por la alta susceptibilidad a este antibiotico encontrada anteriormente en plantas (Moriconi, comunicacion personal). Por todo ello, se decidió utilizar el gen de resistencia a higromicina, *hpt II*, como marcador de selección en el vector empleado en los ensayos de bombardeo.

## 5.2 Construcción del plasmido pGUS<sub>hyg</sub>

El diseño elegido, que hizo uso de un origen de replicación de alto número de copias y, que además disminuía el tamaño del vector resultante, resultó el más adecuado para incrementar los rendimientos en las preparaciones del plásmido. Este es un factor importante en la planificación de la construcción, ya que los ensayos de bombardeo de micropartículas se emplea una gran masa de ADN.

## 5.3 Expresión transitoria en tejidos de *Allium sativum*

La ausencia de actividad endógena en los organismos a ser transformados es un prerequisite importante para el uso de genes reporteros. La frecuente utilización del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa en los experimentos de transformación de plantas se debe a que esta actividad enzimática se encuentra generalmente ausente en los tejidos vegetales (Gallagher, 1992). Sin embargo, durante el desarrollo de este trabajo, se observó que todos los tejidos de ajo ensayados poseían un nivel endógeno de esta actividad (datos no mostrados). Esta actividad era más evidente en aquellos tejidos que habían sido sometidos a estrés osmótico. Para eliminar esta interferencia, se probaron diferentes mezclas de reacción, obteniéndose resultados óptimos con aquella que contenía 20% de metanol.

En los ensayos de expresión transitoria se demostró que los promotores Tr 2, provenientes de la región T del plasmido Ti de *Agrobacterium* y el promotor del transcripto de 35S del *cauliflower mosaic virus* funcionaron eficazmente en el entorno celular de esta monocotiledónea. La actividad de estos promotores en tejidos de ajo no había sido reportada con anterioridad y esta demostración constituía un requisito importante para su utilización en las construcciones subsiguientes. Las condiciones de bombardeo utilizadas en este trabajo demostraron ser adecuadas para lograr expresión transitoria. Para determinar las mismas, se tuvieron en cuenta los reportes de Hunold *et al.* (1994), Iglesias *et al.* (1994) y Tsuchiya *et al.* (1996), los que demostraron la importancia de un *shock* osmótico previo para optimizar la expresión transitoria de genes marcadores.

Asimismo, resultó importante haber obtenido un alto número de eventos de expresión transitoria en meristemas extraídos el día previo al ensayo de bombardeo. El hecho de minimizar los tiempos requeridos para la recuperación del tejido permitirá agilizar el proceso de extracción, bombardeo y regeneración de los explantos. En conjunto, la utilización de



meristemas en lugar de callos embriogénicos permitiría acelerar así todo el proceso de transformación, ya que lo acortaría a un lapso de semanas. El proceso de obtención de callos comprende en cambio varios meses.

El hecho de observar la expresión del gen reportero en hojas nos permite utilizar este explanto para monitorear la transformación de la planta, sin tener que recurrir a la extracción del meristema.

Aun cuando los resultados obtenidos resultan alentadores, es necesario optimizar el bombardeo de meristemas, ajustando, por ejemplo, la presión de helio para lograr una adecuada penetración de los microproyectiles. De la misma forma, es necesario optimizar las distintas variables de trabajo para lograr una mayor cantidad de eventos de expresión transitoria y una mejor tasa de regeneración. Una vez que esto se haya logrado, se podrá avanzar firmemente con los experimentos de transformación estable, de acuerdo con las etapas que se mencionan a continuación:

- a) Bombardeo de meristemas con pGUS<sub>hyg</sub> luego de un pretratamiento de *shock* osmótico.
- b) Tratamiento de recuperación de los explantos bombardeados
- c) Selección de explantos transformados con higromicina B
- d) Ensayos histoquímicos en actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en las hojas de las plantas resistentes a higromicina.
- e) Regeneración de plántulas a partir de tejidos homogeneamente transformados.

#### **5.4 Obtención de construcciones para desarrollar resistencia a OYDV-G**

El análisis de la secuencia aminoacídica de la cápsides virales codificadas en los clones A44 y A6 demostró conclusivamente que ambos contenían secuencias pertenecientes a OYDV-G. Las diferencias encontradas en las secuencias contenidas en ambos plásmidos se deben a la alta tasa de polimorfismos presentes en las poblaciones genómicas de los virus a ARN. El alto grado de homología obtenido entre las dos secuencias de aminoácidos (88,3 %) es compatible con la pertenencia al mismo virus.

Con el fin de determinar si existe, tal como ha sido reportado en otros casos una secuencia mínima capaz de conferir resistencia mediada por la expresión de ARN viral (Pang *et al.*, 1997), se construyeron dos plásmidos basados en el clon A44 que contenían secuencias virales de distinta longitud (1.000 pb y 3.000 pb a partir del extremo 3' terminal). Estas construcciones, denominadas respectivamente pZPhygCP y pZPhygA44 incluían en ambos casos al gen de resistencia a higromicina como gen selector. Paralelamente al sistema de transformación basado en el bombardeo con microproyectiles, en el laboratorio se está explorando la posibilidad de transformar ajo vía *Agrobacterium tumefaciens*. Las construcciones obtenidas pueden ser utilizadas indistintamente en ambos sistemas de transformación, lo que simplifica las manipulaciones a realizar para implementar esta estrategia de resistencia.

## CONCLUSIONES



---

## **6. CONCLUSIONES**

1. La higromicina B es un buen agente selector para meristemas apicales de ajo (concentración efectiva 25mg/l) al cabo de 60 días, pero no para callos embriogénicos (no se observan efectos hasta 200 mg/l) al cabo de 12 días.
2. La fosfinotricina es un buen agente de selección para callos embriogénicos (concentración efectiva 2 mg/l) y para plántulas (1 mg/l) a los 60 días, pero no para meristemas (no se observan efectos hasta 2 mg/l) al cabo de 12 días.
3. Se demostró por primera vez que los promotores Tr 2 de *Agrobacterium tumefaciens* y p35S de *cauliflower mosaic virus* dirigen eficientemente la expresión génica en tejido de ajo.
4. Se han obtenido dos construcciones para desarrollar resistencia mediada por ARN contra el virus OYDV-G. Ambas construcciones poseen un gen de resistencia a higromicina y pueden ser utilizadas para la transformación mediante bombardeo con micropartículas o vía *Agrobacterium*.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## **7. BIBLIOGRAFÍA**

- Abo EL-Nil MM, (1977) Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic (*Allium sativum* L.) Plant Sci Lett 9: 259-264
- Aragão FJL, Barros LMG, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Smith FD, Sanford JC, Faria JC, Rech EL (1996) Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. Theor Appl Gen 93: 142-150.
- Ayabe M, Taniguchi K, Sumi, S (1995) Regeneration of whole plants from protoplasts isolated from tissue-cultured shoot primordia of garlic (*Allium sativum*), Plant Cell rep 15: 17-21
- Benfey PN, Chua NH (1990) The Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. Science 250: 959-966
- Casas AM, Kononowicz AK, Zehr UB, Tomes DT, Axtell JD, Butler LG, Bressan RA, Hasegawa PM (1993) Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. Proc. Natl. Acad Sci, USA 90: 11212-11216.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green Fluorescent Protein as a marker for gene expression. Science 263: 802-805
- Christou P (1996) Transformation technology. Trends Plant Sci 1: 423-431
- Christou P, McCabe DE, Martinell BJ, Swain WF (1990) Soybean Genetic Engineering-Commercial production of transgenic plants. Trends Biotech 8:145-151
- Conci V y Nome S (1988) Identificación de virus de ajo en Argentina. RIA vol XXII (1):225
- Conci V y Nome S (1991) Virus Free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. J Phytopathol 132: 186-192
- Conci V, Canavelli A, Cafrune E, Nome S (1995) Incidencia de las virosis en el cultivo del ajo. IV curso-taller sobre producción, comercialización e industrialización del ajo, Mendoza: 5P-9P
- Conci V, Helguera M, Nome S (1992b) Estudio de distribución de frecuencia de garlic yellow streak virus, onion yellow dwarf virus y carnation latent virus en ajo en Argentina. VI Congreso Latinoamericano de Fitopatología. 11 al 15 de mayo. Sevilla - España
- Conci VC y Nome SF (1992a) Filamentous viruses of garlic in Argentina. Plant Dis 76:594-596
- Conci VC, Moriconi DN, Nome SF (1986) Cultivo de meristemas apicales de 6 diferentes tipos clonales de ajo (*Allium sativum* L.). PHYTON 46(2): 187-194
- De Haan P, Gielen JJL, Prins M, Wijkamp IG, Van Schepen A, Peters D, Van Grinsven MQJM, Goldbach R (1992) Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco. Bio/Technology 10: 1133-1137.
- Fromm M, Taylor LP, Walbot V (1986) Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. Nature 319: 791-793
- Gallagher (1992) GUS Protocols, Academic Press Inc, p 23-43; 103-124; 163-177
- Golemboski DB, Lomonosoff GP, Zaitlin M (1990) Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. Proc Natl Acad Sci, USA 87: 6311-6315



- Havranek P (1974) Effect of virus on garlic yield. *Ochrana Rostlin*. 10: 251-256
- Helguera M, Bravo-Almonacid F, Kobayashi K, Rabinowicz P, Conci V, Mentaberry AN (1997) Immunological detection of a GarV-type virus in Argentina garlic cultivars. *Plant Dis* 81: 1005-1010
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6: 271-282
- Hunold R, Bronner R, Hahne G (1994) Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location. *Plant J* 5: 593-604
- Iglesias V, Gisel A, Bilang R, Leduc N, Potrykus I, Sautter C (1994) Transient expression of visible marker genes in meristem cells of wheat embryos after ballistic microtargeting. *Planta* 192: 84-91
- Inoue Y, Mimaki Y, Sashida A, Nishino Y, Satomi W, Nishino H (1995) Steroidal glycosides from *Allium macleanii* and *A. senescens*, and their inhibitory activity on tumour promoter-induced phospholipid metabolism of HeLa cells. *Phytochemistry* 40: 521-525
- Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T (1996) High efficiency of transformation maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* 14: 745-750
- Italia R (1995) Panorama de la producción de ajo en el centro-norte de la provincia de Córdoba. IV Curso-Taller sobre producción, comercialización e industrialización de ajo, Mendoza: 11-15
- Kehr AE y Schaeffer GW (1976) Tissue Culture and Differentiation of Garlic. *HortSci* 4: 422-423
- Klein TM, Wolf DE, Wu R, Sanford JC (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70-73
- Kobayashi K, Rabinowicz P, Bravo-Almonacid F, Helguera M, Conci V, Lot H y Mentaberry AN (1996) Coat protein gene sequences of garlic and onion isolates of the onion yellow dwarf potyvirus (OYDV). *Arch Virol* 141: 2277-2287
- Kobayashi K, Tesis de Licenciatura: "Clonado Molecular y Caracterización Inmunológica de la Proteína de Cubierta del Virus del Enanismo Amarillo de Cebolla "Onion Yellow Dwarf Virus" (OYDV). Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Kost B, Schnorf M, Potrykus Y, Neuhaus G (1995) Non-destructive detection of firefly luciferase (LUC) activity in single plant cells using a cooled, slow-scan CCD camera and an optimized assay *Plant J* 8: 155-166
- Lee S, Steiner M, Lin R (1994) Thioallyl compounds: potent inhibitors of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* 1221: 73-7
- Li HQ, Sautter C, Potrykus Y, Puonti-Kaerlas J (1996) Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology* 14: 736-740
- Lindbo JA, Dougherty WG (1992) Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Mol Plant-Microbe Interact* 5: 144-153.
- Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM, Dougherty WG (1993) Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulations of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5: 1749-1759
- Ludwig SR, Bowen B, Beach L, Wessler SR (1990) A regulatory gene as a novel visible marker for maize transformation. *Science* 247: 449-450



- Marrou J, Messiaen C, Quiot J, Leroux J (1974) La selection sanitaire des semences d'ail. In G.N.I.S. Journées Nationales de l'ail. Beaumont de Lomagne, 7 et 8 de mai: 21-24
- McCabe DE y Martinell BJ (1993) Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. *Bio/Technology* 11: 596-598.
- Meins F, Kunz C (1995) Gene silencing in transgenic plants: A heuristic autoregulation model. *Gene silencing in Higher Plants and Related Phenomena in Other Eukaryotes* 197: 105-120
- Moriconi D, Conci V, Nome S (1989) In vitro plantlet regeneration from callus in garlic (*Allium sativum* L.). *PHYTON* 49: 97-103
- Moriconi D, Conci V, Nome S (1990) Rapid Multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) in vitro. *PHYTON* 51: 145-151
- Moriconi D, Fontan H, Conci V, Beretta R, Funes J (1984) Producción de semilla básica de ajo (*Allium sativum* L.) originada en cultivos *in vitro* de meristemas apicales. 7º Reunión Nacional de Olericultura, San Pedro: 12
- Mueller E, Gilbert J, Davenport G, Brigneti G, Baulcombe DC (1995) Homology-dependent resistance: transgenic virus resistance in plant related to homology-dependent gene silencing. *Plant J* 7: 1001-1013
- Muñoz JO, Sosa C, Conless (1990) Un método rápido y eficiente para detección de virosis en ajo. III Jornadas de Investigación, diciembre, Fac. Cs. Agrarias U.N.C. (Abstract): 15
- Murashige T y Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Nagasawa A y Finer JJ, (1988) Development of morphogenic suspension cultures of garlic (*Allium sativum* L.) *Plant Cell Tiss Org Cult* 15: 183-187
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a chimaeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in a reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289
- Nome S, Abril A, Racca R (1981) Obtaining virus-free garlic (*Allium sativum* L.) plants by apical meristem culture. *PHYTON* 41: (1 / 2): 139-151
- Novák FJ, Dolezel J, (1982) In Abstracts of the 15th Cytogenetics Symposium. Czechoslovak Biol Soc Czechoslovak Acad Sci Praha p 36
- Palmgren G, (1997) Transgenic Plants: environmentally safe factories of the future. *Trends Genet* 13: 348
- Pang S-Z, Slightom JL, Gonsalves D (1993) Different mechanisms protect tobacco against tomato spotted wilt and impatiens necrotic spot *Tospoviruses*. *Bio/Technology* 11: 819-824
- Pang S, Jan F, Gonsalves D (1997) Nontarget DNA sequences reduce the transgene length necessary for RNA mediated tospovirus resistance in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci, USA* 94: 8261-8266
- Peña-Iglesias A y Ayuso P (1982) Characterization of spanish garlic viruses and their elimination by *in vitro* shoot apex culture. *Acta Hort*: 127-183
- Phillips RL, Kaeppler SN, Olhoff P (1994) Genetic instability of plant tissue culture: Breakdown of normal controls. *Proc Natl Acad Sci, USA* 91: 5222-5226
- Powell PA, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738-743
- Powell PA, Sanders PR, Tumer N, Fraley RT, Beachy RN (1990) Protection against



- tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. *Virology* 175: 124-130
- Prins M y Golbach R (1996) RNA-mediated virus resistance in transgenic plants. *Arch Virol* 141: 2259-2276
  - Quiot J, Messiaen C, Marrou J, Leroux J (1972) Regeneration by meristem culture of garlic cloves chronically infected with garlic mosaic virus. *Act 3<sup>rd</sup> Congr Phytopathologie Mediteranee*:429-433.
  - Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring harbor Laboratory, New York
  - 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
  - Sanford JC, Johnson SA (1985) The concept of pathogen derived resistance. *J Theor Biol* 113: 395-405
  - Sanford JC, Klein TM, Wolf DE, Allen NJ (1987) Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J Part Sci Techn* 6:559-563
  - Sanger F, Nickel S, Coulson AR (1977) DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
  - Saul MW *et al.* (1987) Methods for direct gene transfer to plants. *Plant Physiol Biochem* 25: 361-364
  - Sautter C, Waldner H, Neuhaus-Url G, Galli A, Neuhaus G, Potrykus Y (1991) Microtargeting: High efficiency gene transfer using a novel approach for the acceleration of micro-projectiles. *Bio/Technology* 9: 1080-1085
  - Sijen T, Wellink J, Hiriart JB, van Kammen A (1996) RNA-mediated virus resistance: role of repeated transgenes and delineation of targeted regions. *Plant Cell* 8: 2277-2294
  - Smith HA, Powers H, Swaney S, Brown C, Dougherty WG (1995) Transgenic potato virus Y in potato: evidence for an RNA-mediated cellular response. *Phytopathology* 85: 864-870
  - Smith HA, Swaney SL, Parks TD, Wersnamnn EA, Dougherty WG (1994) Transgenic plant virus resistance mediated by an untranslatable sense RNAs: expression, regulation and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell* 6: 1441-1453
  - Sumi S, Tsuneyoshi T, Furutani H (1993) Novel rod-shaped viruses isolated from garlic, *Allium sativum*, possessing a unique genome organization. *J Gen Virol* 72: 9-14
  - Svendsen S, Rattan I y Clark B (1994) Testing garlic for possible anti-ageing effects on long-term growth characteristics, morphology and macromolecular synthesis of human fibroblasts in culture. *J Ethnopharmacol* 43: 125-133
  - Swaney S, Powers H, Goodwin J, Rosales LS, Dougherty WG (1995) RNA-mediated resistance with nonstructural genes from the tobacco etch virus genome. *Mol Plant -Microbe Interact* 8: 1004-1011
  - Takeuchi Y, Dotson M, Keen NT, (1992) Plant transformation: a simple particle bombardment device based on flowing helium. *Plant Mol Biol* 18: 835-839
  - The Herbalist, Newsletter of the Botanic Medicine Society, Dec 1988
  - Tsuchiya T, Takumi S, Shimada T (1996) Transient expression of reporter gene in bulb scales and immature embryos of three *Lilium* species is affected by 5'upstream sequences and culture conditions. *Physiologia Plantarum* 98: 699-704
  - Van Blokland R, Van der Geest N, Mol JNM, Kooter JM (1994) Transgene - mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petuni hybrida* results



from an increase in RNA turnover

- Van der Vlugt RAA, Ruiter RK, Goldbach R (1992) Evidence for sense RNA-mediated resistance to PVY<sup>N</sup> in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Mol Biol* 20: 631-639
- Velten J y Schell J (1985) Selection expression plasmid vectors for use in genetic transformation of higher plants. *Nucl Acid Res* 13: 6981-6998
- Walkey DG (1990) Viruses Diseases. In: Onions and Allied crops, Volume II. Rabinowitch HD and brewster JL (Eds), CRC Press, Boca Ratón: 191-212
- Walkey DG y Antill DN (1989) Agronomic evaluation of virus free and virus infected garlic. *J Hortic Sci* 64: 53-64
- Walkey DG, Webb MJ, Bolland CJ, Miller A (1987) Production of virus free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum*) by meristem-tip culture. *J Hortic Sci* 62: 211-220
- Walters DA, Vestch CS, Potts DE, Lundquist RC (1992) Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants. *Plant Mol Biol* 18: 189-200
- Wassenegger M, Heimes S, Reidel L, Sanger H (1994) RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76: 567-576
- Wilmink A y Dons JJ, (1993) Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. *Plant Mol Biol Rep* 11: 165-185
- Yamashita T, Iida A, Morikawa H (1991) Evidence that more than 91% of  $\beta$ -glucuronidase-expressing cells after particle bombardment directly receiving the foreign gene in their nucleus. *Plant Physiol* 97: 829-831

# Gun - Corte Frontal

