Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riiit.com.mx

Transformación de embriones de papaya maradol (*Carica papaya* L.) con el gen 9/13 de la lipoxigenasa

Transformed embryos of Maradol papaya (*Carica papaya* L.) with the 9/13 lipoxygenase gene

Vela-Gutiérrez, G.[1], Del Angel-Coronel, O.A.[2], Cabrera-Ponce, J.L.[3], Gómez-Lim, M.A.[3], García-Galindo, H.S.[4]

[1]Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimentos; Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas; C. P. 29000. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
[2]Instituto Tecnológico Superior de Huatusco; C. P. 94100. Huatusco, Veracruz, México.
[3]CINVESTAV-Irapuato; C. P. 36821. Irapuato, Guanajuato, México.
[4]Instituto Tecnológico de Veracruz; C. P. 91860. Veracruz, Veracruz, México.
E-mail: gilber.vela@unicach.mx

Innovación tecnológica: Protocolo para la transformación de embriones de papaya por biobalística.

Área de aplicación industrial: Biotecnología.

Recibido: 17 mayo 2016.
Aceptado: 13 agosto 2016.

Abstract

Lipoxygenase (LOX, EC 1.13.11.12) is a class of non-heme, iron-containing dioxygenases, which are present in a number of plants and some prokaryotes; these enzymes catalyze the hydroperoxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs). The purpose was to evaluate the efficiency of co-transformation and selection of stable transformed callus of Maradol papaya. Globular somatic-embryos from immature fruits were co-bombarded with an equimolar mixture of a plasmid containing the antisense LOX gene (*pCambia2301LOX*) and the hygromycin phosphotransferase (*pWRG1515* or *pCambia1201*) gene on tungsten particles. Transient expression of beta-glucuronidase was measured. Somatic-embryos were maintained on plates with embryogenic media supplemented with 35 mg L-1 hygromycin B, and subsequently transferred to G medium. Transient expression was positive after 48 h of bombardment. Bombarded somatic-embryos were selected for six months on embryogenic media with hygromycin to produce 23 resistant embryogenic calluses. The calluses were derived from one initial resistant somatic-embryo, then propagated and generated an embryogenic callus later

evaluated as transgenic clone. Molecular biology evidence was provided by PCR analysis of the 517 bp fragment corresponding to the nptII gene present in *pCambia2301LOX*, thus indicating the presence of antisense lipoxygenase gene in regenerated transgenic papaya embryos.

Key Words: Co-transformation, hygromycin gene, lypoxigenase enzyme, papaya fruits, polyunsaturated fatty acids.

Resumen

La lipoxigenasa (LOX, EC 1.13.11.12) es una dioxigenasa que contiene hierro, no heme, se encuentra presente en una diversidad de plantas y algunos procariontes; este grupo de enzimas catalizan la hidroperoxidación de ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs). El propósito de la presente investigación fue evaluar la eficiencia de co-transformación y selección estable de embriones transformados de papaya Maradol. Embriones somáticos globulares provenientes de frutos inmaduros se co-bombardearon con una mezcla equimolar del plásmido que contenía el gen de LOX en antisentido (*pCambia2301LOX*) y el gen de la higromicina fosfotransferasa (*pWRG15115* o *pCambia1201*) sobre partículas de tugsteno. Se midió la expresión transitoria de la beta-glucoronidasa sobre los embriones co-bombardeados, éstos de mantuvieron sobre medio embriogénico adicionado con 35 mg L-1 de higromicina B, subsecuentemente transferido a medio G. La expresión transitoria fue positiva a las 48 h después del bombardeo. La selección en medio embriogénico con higromicina se realizó por seis meses para producir 23 callos embriogénicos resistentes. Los callos fueron propagados y generados de embriones somáticos resistentes, posteriormente evaluados como clonas transgénicas. La transformación se evidenció mediante análisis por PCR del fragmento de 517 bp correspondiente al gen nptII presente en *pCambia2301LOX*, esto indica además la presencia del gen de la lipoxigenasa en antisentido en los embriones de papaya transgénicos regenerados.

Palabras claves: Co-transformación, gen de la higromicina, enzima lipoxigenasa, frutos de papaya, ácidos grasos poliinsaturados.

1. Introducción

La papaya (*Carica papaya* L.) es un fruto tropical originario de América central y conocido en todo el mundo por su agradable sabor y por sus diferentes propiedades, en general por su fácil digestibilidad. La producción de papaya se ha extendido a la mayoría de los países tropicales y subtropicales del mundo. En la actualidad, el papayo se cultiva en forma comercial no solo en las regiones de América, sino también en África, Asia, Australia, Filipinas y en los Estados Unidos (Hawaii y Florida) (1).

México ocupa el tercer lugar a nivel mundial en la producción de papaya, solo después de Brasil y Nigeria. De acuerdo al SIAP (2) para el ciclo 2011 en México, la superficie cultivada de papaya era de 16,984.43 ha, con una producción de 634,368.99 ton, y un rendimiento de 44.60 ton/ha. Entre los tres principales estados productores se encuentran Chiapas (140,721.5 ton), Veracruz (115,056.5 ton) y Oaxaca (113,705.25 ton).

Los frutos de papaya se caracterizan por ser de tipo climatérico, con altas tasas de respiración y producción de etileno, con pericarpio delgado y frágil que los hace altamente susceptibles y perecederos, con una vida de anaquel relativamente corta, según su manejo pre-cosecha y post-cosecha, y de las condiciones climáticas de cada región productora (3).

Existen diversos reportes que indican que las pérdidas post-cosecha de papaya Maradol oscilan entre 5 y 40% de la producción total de una huerta, dependiendo de diversas circunstancias: el nivel tecnológico del productor, la época de cosecha y la accesibilidad al mercado. Las principales causas de pérdidas durante la post-cosecha son la antracnosis, daño por frío, daño mecánico por compresión, golpes y roces, sobre-maduración, entre otros. A nivel mundial, las pérdidas post-cosecha de papaya varían entre 40 y 100%, y son ocasionadas generalmente por las siguientes causas: a) enfermedades fúngicas; b) desórdenes fisiológicos; c) daños mecánicos y d) sobre-maduración de los frutos (4).

Algunas de las tecnologías utilizadas para disminuir las pérdidas post-cosecha e incrementar la vida útil de los frutos son control de temperatura durante el transporte y almacenamiento (13ºC, cuando los frutos se encuentran hasta ¼ amarillo-naranja y 10ºC cuando están de ¼ a ½ amarillo-naranja, con una humedad relativa de 90 a 95%); atmósfera controlada de 3-5% de oxígeno y 5-8% de bióxido de carbono (3); uso de 1-metilciclopropano, el cual es un inhibidor del etileno que reduce el deterioro de los frutos, compite por el sitio de unión del etileno a los receptores de la membrana celular y bloquea la activación de los procesos metabólicos. Recientemente, se han utilizado herramientas de ingeniería genética para manipular genes involucrados en el proceso de maduración de los frutos. Tal es el caso de los trabajos reportados por Lucchetta (5) y Ayub *et al.* (6) en los que realizaron una inserción en antisentido del gen de la ACC sintasa y ACC oxidasa (ACO1), y una supresión antisentido del gen de ACC oxidasa, respectivamente; ambos trabajos se realizaron mediante tecnología transwitch en melones, generando con esto bloqueo de la producción de etileno, sin presentar crisis climatérica en los frutos, lo que indica una inhibición de los procesos etileno-dependientes (color, olor, entre otros) y que fueron restaurados al aplicar etileno exógeno, permitiendo así la maduración de los frutos.

Las lipoxigenasas (LOXs; linoletae oxygen oxidoreductase; EC 1.13.11.12) se distribuyen ampliamente en la naturaleza, están presentes en eucariotes y algunos procariotes; contienen hiero no heme, son dioxigenasas que catalizan el primer paso de

un grupo de compuestos cíclicos y acíclicos llamados oxilipinas, a partir de la oxigenación de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI´s), entre los que se incluyen los ácidos linoleico, linolénico y araquidónico, para producir hdroperóxidos (7,8). Diversos estudios indican que se encuentran involucradas con respuesta al estrés, al daño y ataque por patógenos, así como en la producción de compuestos de aromas.

Las LOXs contribuyen a la maduración y senescencia de los frutos en dos caminos. El primero, se asocia con el deterioro de las membranas en el tejido de las plantas a través de la peroxidación de los AGPIs; esta disfunción de la membrana ha sido identificada como proceso clave en la senescencia, resultando en pérdidas de la compartimentalización, consecuentemente ruptura celular. Segundo, LOX promueve el proceso de maduración y senescencia en cooperación con el etileno; la síntesis de etileno está relacionado con los productos de LOX, tales como, radicales libres de superoxidos e hidroperóxidos en maduración y senescencia (9). El deterioro de la membrana y la perdida de la estructura del tejido debido al incremento de la actividad de LOX han sido reportados durante la maduración de saskatoon, aguacate, pera y tomate (10).

Considerando el corto tiempo de vida útil de los frutos de papaya Maradol y las ventajas del uso de herramientas de ingeniería genética, además de la posible participación de la Lipoxigenasa (LOX) en el proceso de ablandamiento de los frutos, en el presente trabajo se propuso transformar embriones de papaya Maradol con el gen de la LOX en antisentido y el de resistencia a higromicina (*hpt*II), este trabajo corresponde a la primera parte del proyecto en el que se busca extender la vida útil de frutos de papaya *Maradol* mediante el silenciamiento del gen de la Lipoxigenasa.

2. Materiales y equipos

2.1 Plásmidos

Se utilizaron tres plásmidos, los que se describen a continuación: El gen de LOX (1566 pb) fue aislado y purificado de tomate (TomLox B) por Kausch y Handa (11), se secuenció y clonó en anti-sentido en el plásmido *pCambia2301*, ligado mediante sitios PstI, dicho vector se encuentra bajo el control doble del promotor *CaMV35S* del virus del mosaico de la coliflor y del terminador Nos poly A. El vector también contiene el gen *uidA* como gen marcador y como gen de selección al de la neomicina fosfotransferasa II (*ntpII*). El plásmido completo (*pCambia2301LOX*) es de 13,200 pb (figuras 1 y 2).

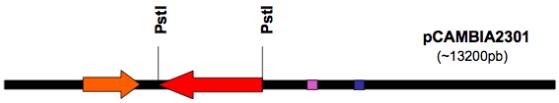


Figura 1. Segmento del Vector *pCambia2301LOX* con LOX en anti-sentido.

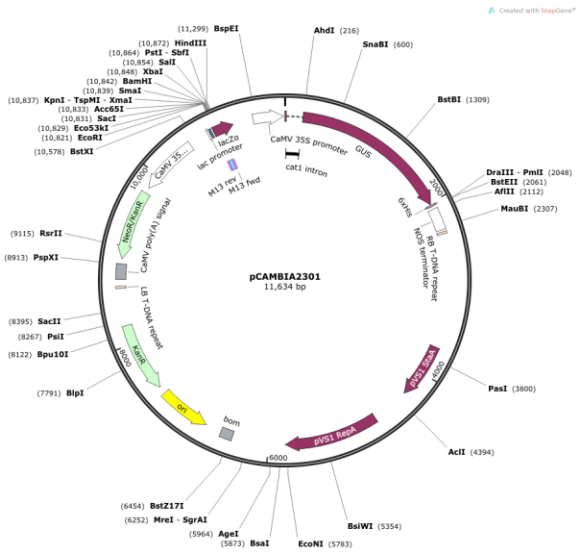


Figura 2. Plásmido *pCambia*2301 (30).

El plásmido *pWRG1515* (7665 pb) contiene el gen reportero de la β-glucuronidasa (*uidA*) y el gen *hptII* de resistencia a Higromicina (higromicina fosfotransferasa II) para plantas, ambos controlados por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV).

El plásmido *pCambia1201* (12001 pb) contiene el gen de resistencia a cloranfenicol (cmr) para selección en bacterias, el gen *hptII* de resistencia a higromicina (hygromicina fosfotransferasa II) para selección en plantas y gen reportero de la β-glucuronidasa (*uidA*).

2.2. Materiales y Equipo de bombardeo

Microproyectiles de tungsteno M10 (0.73 µm de diámetro) y de oro (1.0 µm de diámetro). Equipo para transformación por biobalística (Dupont®). Membrana y disco flotante (kampton Biorad®) de 1.2. Cámara de electroforesis (Biorad®). Equipo para PCR (Biorad®). Campana de flujo laminar provista de luz ultravioleta y luz blanca, con microscopio estereoscopio (Velab®). Cámara bioclimática para crecimiento de plantas provista de luz blanca fría e incandescente (Aesa®).

3. Métodos experimentales

3.1. Obtención de embriones

Se utilizaron frutos inmaduros de *Carica papaya* L. cv. Maradol. Los frutos se lavaron con agua y jabón, y se desinfectaron con una solución al 20% de cloro comercial, posteriormente se limpiaron con etanol al 70%. Se extrajeron y seleccionaron en condiciones de esterilidad las semillas de los frutos, se colocaron en cajas Petri estériles para su conservación. Las semillas se desinfectaron con etanol al 96% durante 5 minutos, y con una solución de Clorox® al 20% (se adicionaron 2 gotas de Tween 20) durante 20 minutos; posteriormente se realizaron varios lavados con agua destilada desionizada estéril. En condiciones de esterilidad se diseccionaron para obtener embriones; esto se efectuó con la ayuda de un microscopio estereoscópico, modificando el método publicado por Cabrera-Ponce *et al*. (12).

Los embriones se cultivaron en placas que contenían medio para inducción de embriogénesis (MEmb: medio fuerte en macro y micronutrientes, hierro, mio-inositol y vitaminas de Murashige y Skoog (13) (MS), suplementado con 0.4 g/L de glutamina, 1 mg/L (4.5 µM/L) de 2,4-D (2,4- ácido diclorofenoxiacético), 6% de sacarosa, pH de 5.8; finalmente se le adicionaron 8 g/L de agar-agar, se mantuvieron en la obscuridad a 26°±1C durante tres meses.

3.2. Transformación

3.2.1. Preparación del microproyectil.

Los plásmidos (*pWGR1515, pCambia1201 y pCambia2301LOX*) se amplificaron en *Escherichia coli*, posteriormente se aislaron por midiprep. El DNA purificado se suspendió en TE buffer (1 mM Tris pH 7.8, 0.1 mM Na_2-EDTA) y ajustando a 1 µg/µL para la preparación de partículas para bombardear. Se prepararon dos mezclas equimolares, una con los plásmidos *pWGR1515* y *pCambia2301LOX,* y la otra con *pCambia1201* y *pCambia2301LOX*; ambas mezclas se conformaron de 50 µL de micropartículas, 10 µL de ADN, 50 µL de $CaCl_2$ (2.5 M) y 20 µL de espirimidina (100 mM) esterilizada. Cada mezcla se precipitó sobre los microproyectiles de tungsteno y de oro, se siguió el método publicado por Cabrera-Ponce *et al*. (12). Los tres bombardeos realizados fueron: T1) *pCambia2301LOX* y *pWRG1515*, T2)

pCambia2301LOX y *pCambia1201*, ambos con micropartículas de tungsteno y T3) *pCambia2301LOX* y *pCambia1201* con micropartículas de oro.

3.2.2. Bombardeo

Se colocaron aproximadamente 15 embriones (40-50 mg de peso fresco de embriones somáticos separados de callos embriogénicos como pequeños grupos de estructuras globulares, corazón y etapa temprana de torpedo) en el centro de placas petri con MEmb (adicionado con 12% de sacarosa) utilizado para experimentos de bombardeo, los embriones se colocaron en la caja petri veinticuatro horas previas al bombardeo.

Las placas con los embriones somáticos (tejido diana) se colocaron a 7.0 cm del punto de lanzamiento y se bombardearon a 900 psi. La cámara de la muestra se presurizó a 20 mm Hg y el tubo de aceleración con Helio a la presión del gas elegida.

3.2.3 Prueba de GUS (expresión transitoria)

Los embriones de papaya bombardeados se mantuvieron en las mismas placas por 48 horas antes de evaluarse la expresión transitoria de la *β-glucuronidasa* (GUS), mediante la reacción histoquímica específica de X-gluc por inmersión de embriones bombardeados en 100 µL de tinción de X-gluc por 1 a 12 horas a 37ºC siguiendo el método de Jefferson (14). La prueba se realizó por triplicado a cada tratamiento.

Se utilizó un microscopio estereoscópico para contabilizar el número de puntos azules como respuesta positiva a la expresión de GUS.

3.3. Selección con higromicina y obtención de clonas

Después del bombardeo, los embriones se mantuvieron por 48 horas en MEmb con 12% de sacarosa, después se sub-cultivaron en MEmb durante dos semanas para su recuperación, posteriormente se sub-cultivaron en MEmb con 35 mg/L de higromicina por seis meses (sub-cultivos en medio nuevo cada mes). Durante todo este proceso se mantuvieron en condiciones de obscuridad a 27ºC; bajo estas condiciones emergieron del material senescente pequeños embriones globulares, en forma de corazón y torpedos (clonas), que luego fueron sub-cultivados en MEmb para su propagación.

3.4. Prueba de expresión estable

Se tomaron pequeños porciones de embriones de papaya después de la selección de cada tratamiento y se les evaluó expresión estable de la β-glucuronidasa (GUS), mediante la reacción histoquímica específica de X-gluc, descrita anteriormente (14).

3.5. Propagación de clonas (embriones transformados).

Los embriones resistentes a Hyg, se transfirieron y mantuvieron en cajas petri con MEmb adicionado con 25 mg/L de higromicina, hasta producir suficiente cantidad de embriones (subcultivos a intervalos de un mes).

3.6. Análisis molecular.

El ADN genómico se extrajo utilizando el reactivo de Plant DNAzol (Invitrogen™) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de PCR de 25 µL contuvo 0.1 µL de Taq polimerasa, 0.2 µL de dNTP, 10x del

buffer de reacción de PCR y 50 ng de ADN genómico. Los primeros utilizados para el gen *nptII* fueron, 5´ TATTCGGCTATGACTGGGCA y 3´ GCCAACGCTATGTCCTGATA; estos amplifican un fragmento de 517 pb, correspondiente a una porción interna del gen de la neomicina fosfotransferasa II (*nptII*). Las condiciones de PCR fueron: temperatura inicial de 94ºC por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización (94ºC) por 30 segundos, alineación (45ºC) por 90 segundos y 10 min a 72ºC de extensión, el producto obtenido se observó en electroforesis simple, utilizando gel de agarosa (1.0%).

Análisis de datos

Los resultados de expresión transitoria se trataron estadísticamente mediante análisis de varianza, utilizando el software estadístico Minitab® versión 17.0 para windows.

4. Resultados y Discusión

4.1. Obtención de embriones

Los embriones globulares se obtuvieron después de dos sub-cultivos (en periodos de un mes cada uno) en MEmb (Sales de MS suplementado con 4.5 µM/L de 2,4-D) de los embriones provenientes de semillas de frutos inmaduros de papaya *Maradol* (figura 3). Cai *et al*. (15) publicaron resultados concordantes al haber inducido la formación de embriones globulares, de corazón y torpedos después de cuatro a cinco semanas de cultivar embriones cigóticos en medio de inducción. El callo embriogénico se forma a partir de los meristemos apicales y radiculares del embrión. Los callos embriogénicos se observaron de color amarillo, fueron de consistencia frágil y exudan un líquido claro y denso. Se ha reportado que la presencia de sacarosa en el medio de cultivo tiene un efecto significativo en la embriogénesis somática. Este efecto se ha observado en la frecuencia de formación de embriones somáticos en *Carica papaya* L. cuando se cultivan en medio adicionados con 7% de sacarosa (16).

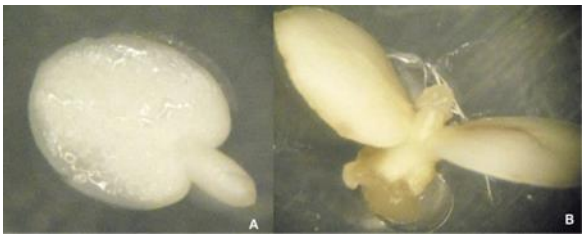


Figura 3. A. Embrión recién obtenido de semilla de frutos inmaduros de papaya Maradol. B. Embrión con cotiledones abiertos dos semanas de cultivo.

Para producir suficiente cantidad de callos embriogénicos se realizaron de 3 a 4 sub-cultivos en MEmb (figura 4). La cantidad de callo embriogénico se incrementa en el explante conforme es transferido a medios frescos en presencia de la auxina (2,4-D), de esta forma se induce a sucesivas fases embriogénicas (embriogénesis secundaria). Resultados similares fueron reportados por Posada-Pérez *et al*. (17) al estudiar la embriogénesis somática en papaya (*Carica papaya* L.) var. Maradol rojo. En la figura 4, se pueden observar embriones generalmente en el estadio globular, y muy pocos en fase de corazón y torpédica. La fase globular y de corazón son las más apropiadas para transformación de embriones mediante el método de biobalística. Se ha demostrado que el 2,4-D estimula la síntesis de otras auxinas, como el ácido indol acético (AIA), en células de zanahoria (*Daucus carota* L).

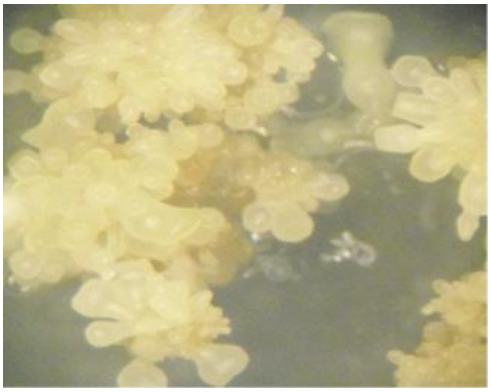


Figura 4. Embriones en fase globular, de corazón y torpedos de papaya Maradol.

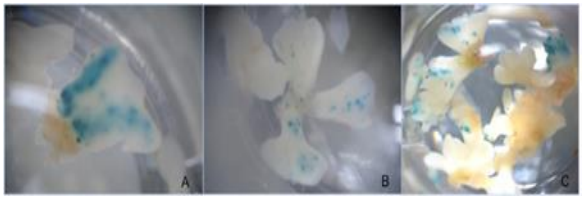


Figura 5. Embriones de papaya Maradol bombardeados, evaluados con expresión transitoria (X-glu); los paneles A, B y C corresponden al primero, segundo y tercer bombardeo respectivamente.

4.2. Transformación de embriones y expresión transitoria

Previo al bombardeo los embriones se mantuvieron en MEmb adicionado con 12% de sacarosa, ya que existen reportes que indican que una pre-incubación en estrés osmótico hace más competentes a los embriones a la transformación. Los embriones de los dos primeros ensayos se bombardearon con partículas de tungsteno (M10) y el tercer ensayo con partículas de oro. Reportes como el de Cabrera-Ponce *et al.* (12), indican que las partículas de tungsteno (M10) tienen una mayor eficiencia de transformación (expresión de GUS) en embriones cigóticos que las partículas M5 y M17 del mismo elemento, así como mayor estabilidad para la transformación. En la figura 5, se muestran los embriones bombardeados a los que se les realizó la prueba de expresión transitoria (X-glu). En ésta se puede observar que en el primer bombardeo se presentan zonas azules extendidas sobre el embrión (5 A), mientras que en el segundo y tercer bombardeo se observan puntos de coloración azul bien definidos (5 B y C). Las zonas coloreadas indican las zonas transformadas de los embriones. La eficiencia de transformación transitoria se puede medir de acuerdo al área azulada con relación al área total sometida a bombardeo.

La enzima β-glucuronidasa (GUS E.C.3.2.1.31) cataliza la hidrólisis de una amplia variedad de glucurónidos (14). Al poner en contacto los tejidos bombardeados con la solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-glucuronido (X-Glu) ocurre una reacción histoquímica, produciéndose la coloración azul, lo que evidencia la presencia del transgen en los embriones. En la tabla 1, se evidencia estadísticamente ($p<0.05$) que el tercer tratamiento indujo mayor eficiencia de transformación (65.68±3.58%), seguido del segundo, con 40.00±2.00%. Cabe mencionar que en el segundo y tercer tratamiento se utilizó el plásmido *pCambia1201*, mientras que en el primero el *pWRG1515*, donde se obtuvo menor eficiencia (10.33±1.53%) de transformación. Debe notarse, además, que en el tercer bombardeo se utilizó oro como microproyectil; estos componentes (el plásmido *pCambia1201* y las micropartículas de oro), conjugados al plásmido *pCambia2301LOX*, probablemente permitieron que se alcanzara la mayor eficiencia de transformación en el tercer ensayo. Después de evaluar la expresión transitoria, los embriones se colocaron en medio MEmb (6% de sacarosa y 4.5 µM de 2,4-D) para su regeneración y propagación. Existen estudios que indican que la combinación apropiada de sacarosa y de 2,4-D induce favorablemente la formación y

maduración de los embriones. Tal es el caso del reporte de Fitch (18), que evaluó la inducción de embriogénesis en hipocotilos de papaya "Kapoho" variando la concentración de sacarosa y 2,4-D; lo que produjo una embriogénesis en los hipocotilos superior al 95% cuando el medio de cultivo contenía un 6% de sacarosa y 112.5 μM de 2,4-D. El autor concluye que la formación de callos embriogénicos se debe a la combinación de estos dos componentes (presión osmótica producida por el azúcar) en el medio de cultivo, pero sobre todo en presencia del herbicida (2,4-D).

Tabla 1. Resultados de expresión transitoria.

Tratamiento	Eficiencia (%)
T1	10.33±1.53a (manchas extendidas)
T2	40.00±2.00b (puntos definidos)
T3	65.68±3.58c

*Letras diferentes en la misma columna muestra diferencias estadísticas significativas (ANOVA, $p<0.05$).

4.3. Selección de embriones resistentes a higromicina.

Los embriones somáticos bombardeados se sub-cultivaron mensualmente por seis meses en MEmb fresco suplementado con higromicina B (Hyg) (35 mg/L) para eliminar los embriones no-transformados; éste proceso se efectuó bajo condiciones de obscuridad. En la figura 6, puede verse la selección de embriones transformados sobre el MEmb con Hyg. Las figuras 6 E a la H muestran la regeneración de nuevos embriones resistentes al antibiótico, lo que indica la presencia del gen *hptII* (clonas resistentes a hyg); de las figuras 6 A a la D muestran los embriones no bombardeados (testigo). La muerte gradual de los embriones somáticos testigo atribuida a la presencia del antibiótico se observa claramente. Después de cuatro meses, la desintegración de los embriones puede ser notoria. Seis sub-cultivos de un mes en MEmb con Hyg (35 mg/L) fueron necesarios para obtener embriones transformados con el gen de LOX en anti-sentido y el gen *hptII*. Valdivia-Rojas *et al*. (19) reportaron que 50 mg/L de hyg es suficiente para seleccionar eficientemente callos embriogénicos de arroz (*Oryza sativa* L. subespecie indica) variedad Morelos A-92, transformados con el gen sacarosa fosfato sintetasa de Synechocystis. Se ha utilizado un amplio rango de concentraciones de hyg para la transformación de varias especies de plantas, por ejemplo de 3 mg/L para colza, 100 mg/L para ajo, para el caso de hipocotílos de Crambe la adición de 5 mg/L puede reducir hasta el 18% la frecuencia de regeneración (20). García-Zare *et al*. (21) reportaron que durante la selección con hyg, masas embriogénicas blancas y obscuras pueden presentarse como síntomas de toxicidad del antibiótico, lo que indica que el material no fue transformado. Ellos también reportan que en un proceso de selección de este tipo, es práctico considerar embriones amarillos como un signo de supervivencia y de material transformado (GM), además el material resistente en subcultivos extensivos en medios selectivos incrementa la presión de selección y previene los eventos de escapes. De acuerdo a los resultados encontrados (no mostrados en el presente estudio), la dosis recomendada de hyg para una eficiente selección de transformación de embriones somáticos de papaya se encuentra en el rango de 30-35 mg/L durante cinco a seis meses; esto garantiza la baja posibilidad de escape durante el proceso de selección. Según Christou y Ford (22), el tiempo de selección tiene un fuerte impacto sobre el fenotipo de plantas transgénicas regeneradas. Los mismos autores indican que dentro de los parámetros principales para la transformación se encuentran la condición fisiológica de explantes previo al bombardeo, el ADN y la velocidad de la micropartícula, el voltaje de aceleración y la

profundidad de penetración de la partícula, así como el uso efectivo de agentes selectivos para eliminar o limitar el número de plantas no transformadas.

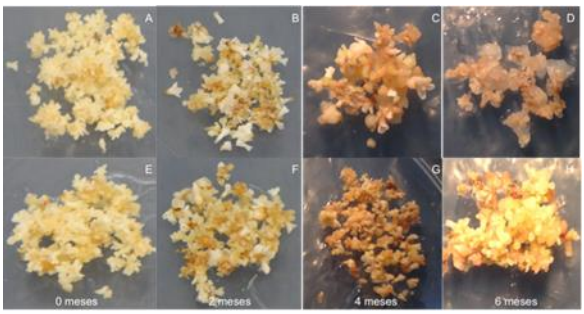


Figura 6. Embriones no bombardeados (testigo) (A-D) y bombardeados (E-H) en MEmb con 35 mg de Hyg por litro de medio de cultivo durante seis meses en condiciones de obscuridad.

4.4. Generación de clonas (embriones transformados) y expresión estable

De un total de 12 cajas Petri que contenían los embriones somáticos transformados con el plásmido *pCambia2301LOX* y el plásmido con el gen de resistencia a hyg (6 cajas con el plásmido *pWRG1515* y 6 cajas con el *pCambia1201*), se obtuvieron 49 posibles clonas después de seis meses de selección. Con el ensayo de la prueba de GUS se encontraron 23 (46.94%) clonas transgénicas (expresión estable). De éstas, 15 (65.22%) correspondiente al co-bombardeo con el plásmido *pCambia1201* (figura 7 J y K), y el resto 8 (34.78%) a embriones co-bombardeados con el plásmido *pWRG1515* (figura 7 I). Como muestra en la figura 7 (J y K), la coloración en los embriones transformados con los plásmidos *pCambia2301LOX* y *pCambia1201* son más intensos y cubren casi el área total del embrión, mientras en los embriones transformados con los plásmidos *pCambia2301LOX* y *pWRG1515*, la coloración es menos intensa y cubre menos área; puede incluso ser observado que la mancha formada es diseminada dentro de la solución X-GLU.

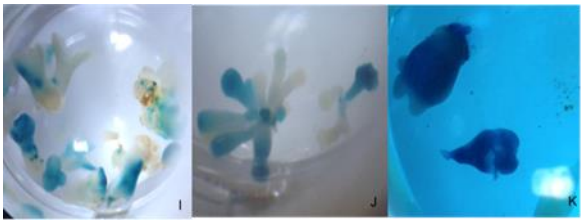


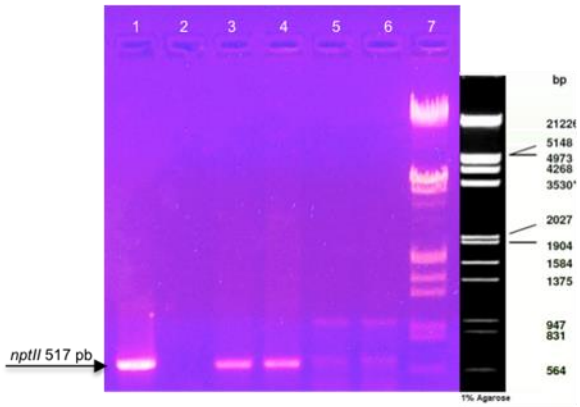
Figura 7. Expresión estable, I: embriones transformados con pCambia2301LOX y pWRG1515 (T1), J y K: embriones transformados con pCambia2301LOX y pCambia1201 (T2 y T3, respectivamente).

Un factor importante a considerar en la transformación es el tipo de explante empleado. Particularmente, en el presente trabajo el uso de embriones a temprana edad (estadio globular, corazón y temprana edad de torpedos) para la transformación fue determinante, debido a que el nivel de especialización de las células es baja y activas mitóticamente (23). Este comportamiento ha sido descrito por varios autores. Luth y Moore (24) reportaron que solo el 11.9% de los brotes de toronja manifestaron con claridad la expresión de GUS; Motioike *et al.* (25), indicaron mayor expresión del marcador en las raíces que en los tejidos verdes. Ferrer *et al.* (26) reportaron niveles de expresión del gen de GUS más elevados en callos embriogénicos, respuesta atribuida a la actividad mitótica. La expresión no uniforme del gen de la β-glucuronidasa podría estar asociada al mismo proceso de silenciamiento génico, a la posición en el cromosoma o al silenciamiento post-transcripcional (27). Ying *et al*. (28) reportaron que los genes de *nptII* y *uidA* fueron detectados por PCR en siete líneas seleccionadas con kanamicina, pero no en las plantas no transformadas, en un ensayo desarrollado para obtener plantas transformadas de papaya a partir de

embriones transformados por *Agrobacterium tumefaciens*.

4.5. Análisis molecular.

En la figura 8, se muestra el análisis de amplificación por PCR de ADN genómico de cuatro masas embriogénicas regeneradas resistentes a higromicina de dos diferentes eventos de transformación. Como se puede observar, las líneas 3, 4, 5 y 6 muestran la banda correspondiente al fragmento interno del gene *nptII* (517 pb) de la neomicina fosfotransferasa II (*nptII*, neomicina fosfotransferasa II), tal y como se observa el producto amplificado por PCR del plásmido original (línea 1). Este gen, junto al de la LOX en anti-sentido, se encuentran contenidos en el plásmido *pCambia2301LOX* que se utilizó en la co-transformación junto al plásmido (*pCambia1201* o *pWRG1515*) que contiene el gen de selección a plantas (*hptII*, higromicina fosfotransferasa II). La presencia de higromicina no tiene efecto sobre la maduración de embriones de masas embriogénicas transgénicas, pero si inhibe la formación de embriones somáticos de masas embriogénicas no-transformadas (29). La presencia de la banda (517 pb) es consistente con la evidencia de expresión estable mostrada en los embriones y hojas de las plantas transformadas. Esto sugiere la presencia del transgen (LOX en antisentido) en el embrión somático.



1: Control positivo (pCambia 2301), 2: Agua, 3: Embriones de papaya transgénicos 1, 4: Embriones de papaya transgénicos 2, 5: Embriones de papaya transgénicos 3, 6: Embriones de papaya transgénica 4, 7: Marcador de PM

Figura 8. Resultados de la PCR de embriones transformados utilizando primers de nptII.

5. Conclusiones

1. El procedimiento utilizado (técnica y medios de cultivo) permitió obtener plántulas de papaya *Maradol* mediante un sistema de embriogénesis somática eficiente y con bajos niveles de contaminación.
2. La mayor eficiencia de co-transformación (65.68%) se logró con los plásmidos *pCambia2301LOX* y *pCambia1201*.
3. Se obtuvo un proceso de selección con higromicina (35 mg/L medio) eficiente, observado mediante la expresión estable (prueba de la β-glucuronidasa) de embriones y plántulas transformadas.
4. Se logró la transformación genética por biobalística y regeneración de embriones somáticos que expresaron el gen de selección *nptII* y gen el reportero *uidA*, lo anterior como primera parte del proyecto "Extensión de la vida útil de frutos de papaya Maradol mediante el silenciamiento del gen de la Lipoxigenasa"

6. Agradecimientos

Los autores agradecen al CONACyT por la beca de León-García Elizabeth (Conacyt 333349), y beca PRODEP para los autores Vela-Gutiérrez (PROMEP/103.5/11/5735) and Del Angel-Coronel (PROMEP/103.5/12/6066).

7. Referencias

1. Secretaría de Desarrollo Rural (SDR). 2010. Papaya, perfil comercial. Gobierno del estado de Colima. Accesado: 04/10/2012. Disponible: http://seder.col.gob.mx/seder20011/Comercializacion/perfiles/papaya.pdf.

2. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2012. Producción agrícola de papaya (ciclo 2011). Accesado 04/10/2012. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351Kader, 1992.

3. Vazquez, G.E., Mata, V.H., Ariza, F.R. Santamaría, B.F. 2010. Producción y manejo postcosecha de papaya Maradol en la planicie Huasteca. C. E. Las Huastecas – CIRN. Libro técnico Num. 4.

4. Kader, A.A. 2010. Department of Pomology, University of California, Davis, CA. Accesado 25/05/2011. Disponible en: http//postharvest.ucdavis.edu/Produce/Produce.

5. Lucchetta, L., Valmor, R.C., Silva, J.A., Pegoraro, C., Zanusco, M.R., Vieira, C.V. 2014. The effect of eethylene on transgenic melón ripening and fruit quality. African *J Biotechnol*. 13(32):3252-3261. D DOI: 10.5897/AJB2013.132188.

6. Ayub, R., Guis, M., Amor, M.B., Gillot, L., Roustan, J-P., Latché, A., Bouzayen, M., Pech, J-C. 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature Biotechnology* 14:862-866.

7. Geuna, F., Banfi, R., Bassi, D. 2005. Identification and characterization of transcripts differentially expressed during development of apricot (Prunus armeniaca L.) fruit. Tree Gent Genomes. 1:69-78. DOI 10.1007/s11295-005-0010-4.

8. Meng, K., Hou, Y., Huber, D. J., Dong, X., Ban, Q., Chang, X., Zhang, T., Rao, J. 2016. Molecular cloning, Structural Characterization, and Ripening-Related Expression of Lipoxygenase Genenes from Three Persimmon Cultivars Differing in Postharvest Ripening Rate. *Plant Mol Biol Rep*. 34:854-868. DOI 10.1007/s11105-015-0971-x.

9. Han, M., Zhang, T., Zhao, C., Zhi, J. 2011. Regulation of the expression of lipoxygenase genes in *Prunus pérsica* fruit ripening. *Acta Physiol Plant* 33:1345-1352. DOI 10.1007/s11738-010-0668-6.

10. Mondal, K., Malhotra, S. P., Jain, V., Singh, R. 2009. Oxidative stress and antioxidant systems in Guava (*Psidium guajava L.*) fruits during ripening. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 15(4):328-335.

11. Kausch, K.D. Handa, A.K. 1997. Molecular cloning of a ripening-specific lipoxygenase and its expression during wild-type and mutant tomato fruit development. Plant Physiology 113:1041-250.

12. Cabrera-Ponce, J. L., Vegas-Garcia, A., Herrera-Estrella, L. 1995. Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Reports.* 15:1-7.

13. Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for growth and bioassay with tabacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15:431-497.

14. Jefferson, R.A. 1989. The GUS reporter gene system. Nature 342:837-838.

15. Cai, W., Gonsalves, C., Tennant, P. Fermin, G., Souza, M., Sarindu, N., Jan, F. J., Zhu, H. Y. Gonsalves, D. 1999. A protocol for efficient transformation and regeneration of Carica papaya L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant.* 35:61-69.

16. Rudiyanto., Efendi, D., Ermayanti, T.M. 2014. Somatic Embryo Germination of *Jatropha curcas* L in Presence of Sucrose and Poly Ethylene Glycol (PEG). *Ann Bogorienses*. 18(1):35-43.

17. Posada-Pérez, L., Kosky, R. G., Reyes, M. 2007. Embriogénesis somática en Carica papaya L. var. Maradol rojo. *Biotecnología Vegetal*. 7(3):131-138.

18. Fitch, M.M.M. 1993. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 32:205-212.

19. Valdivia-Rojas, G., Cabrera-Ponce, J.L., Carreón-Abud, Y. Martínez-Trujillo, M. 2010. Transformación de plantas de arroz *(Oryza sativa* L. subespecie Indica) de la variedad Morelos A-92 con el gen de la SPS de Synechocystis. *Rev Biología.* 12:116-121.

20. Li, X., Fan, J., Gruber, J., Guan, R., Frentzen, M. Zhu, L. H. 2013. Efficient selection and evaluation of transgenic lines of *Crambe abyssinica*. *Frontiers in Plant Science.* 4:1-9.

21. García-Zare, l., Valadez-Ramírez, P., Guzmán-González, S. Silva-Rosales, L. 2010. Transformación genética de papaya Maradol con el gen truncado p1 de PRSV-P. In: Primer Congreso Peruano de Mejoramiento Genético y Biotecnología Agrícola. Perú.

22. Christou, P. Ford, T.L. 1995. The impact of selection parameters on the phenotype and genotype of transgenic rice callus and plants. *Transgenic Research.* 4:44-51.

23. Park, M.Y., Ni, N.R., Lee, H.Y., Kim, S.T., Kim, M., Park, J.H., Kim, J.K., Lee, J.S., Cheong, J.J., Choi, V.D. 2002. Generation of chlorosulfuron resistant transgenic garlic plants (*Allium sativum* L.) by particle bombardment. *Molecular Breeding.* 9:171-181.

24. Luth, D. Moore, G. 1999. Transgenic grapefruit plants obtained by Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 57: 219-222.

25. Motioike, S.Y., Skirvin, R.M., Norton, M.A. Otterbacher, A.G. 2002. Development of methods to genetically transform American grape (*Vitis x*

labruscana L. H. Bailey). *J Hort Sci Biotechnol*. 77:691-696.

26. Ferrer, E., Linares, C. González, J.M. 2000. Efficient transient expression of the β-glucoronidase reporter gene in garlic (*Allium sativum* L). *Agronomie* 20:869-874.

27. Iocco, P., Franks, T. Thomas, M.R. 2001. Genetic transformation of major wine grape cultivars of *Vitis vinifera* L. *Transgenic Research.* 10:105-112.

28. Ying, Z., Yu, X. Davis, M. J. 1999. New method for obtaining transgenic papaya plants by Agrobacterium-mediated transformation of somatic embryos. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 112:201-205.

29. Tian, L.N., Charest, P.J., Séguin, A. Rutledge, R.G. 2000. Hygromycin resistance is an effective selectable marker for biolistic transformation of black spruce (*Picea mariana*). *Plant Cell Reports.* 19:358-362.

30. National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2016. Binary vector pCAMBIA-2301. Consultado: 10/Julio/2016. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/7638149?report=genbank&to=11633.