
**TRANSFORMACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE MANGO
POR BIOBALÍSTICA**

Marleny Chavarri, Ariadne Vegas, Asia Y. Zambrano y Jhonny R. Demey

RESUMEN

Con la finalidad de transformar genéticamente mango mediante biobalística, se bombardearon embriones somáticos de las variedades Haden, Madame Francis y Kent. Se determinó la dosis máxima de PPT en que los embriones somáticos sobreviven, cultivándolos en el medio Gamborg, Miller y Ojima en concentraciones de 0; 0,5; 1 y 2mg/l de PPT durante 3 meses y subcultivando mensualmente para evaluar peso fresco y seco. Los embriones somáticos fueron bombardeados con el plásmido CAMBIA 3201 que contiene los genes GUS y BAR, con dos tamaños de partículas de tungsteno (0,7 y 1,3 μ m), presión de 80psi, dos distancias de bombardeo (10,0 y 16,5cm) y 5 μ g de ADN. Se seleccionaron los embriones transformados en medio Gamborg, Miller y Ojima con 0,5mg/l de PPT. Las con-

diciones de bombardeo escogidas fueron el tamaño de partícula de 0,7 μ m y la distancia de bombardeo de 16,5cm. Después de tres meses de selección en las concentraciones de PPT utilizadas se hizo evidente la sobrevivencia de los embriones transformados en la variedad Kent, mientras que los embriones no transformados sobrevivieron en concentración de 0,5mg/l. Las variedades Haden y Madame Francis fueron sensibles a las condiciones de bombardeo y selección suministrados, muriendo después de este proceso. Se logró una sobrevivencia de 4% y la regeneración de 3 clones por 0,5g de tejido bombardeado. Se evidenció la actividad enzimática de la expresión transitoria del gen GUS pero no la estable y la incorporación de los genes GUS y BAR mediante PCR.

Introducción

En Venezuela, el mango *Mangifera indica* L. constituye uno de los frutales más difundido, dadas las extensas áreas que satisfacen sus necesidades edafoclimáticas (Avilán *et al.*, 1988). Su fruta se utiliza para consumo fresco y para la producción de pulpa. En los últimos años, se ha incrementado su participación en los mercados internaciona-

les y es uno de los productos agrícolas que genera divisas para el país.

Para que un cultivar de mango adquiera importancia económica debe poseer un conjunto de cualidades o características, entre las cuales se destacan: árboles de porte bajo y precoz, elevados niveles de rendimiento, hábito de producción regular, frutos de buen tamaño y coloración atractiva, alta relación pulpa/

semilla, frutos libres de ablandamientos internos; así como también, resistencia a plagas y enfermedades (Singh, 1969, 1978). El conjunto de características y cualidades citadas se pueden obtener mediante mejoramiento genético, el cual implica programas de mejoramiento a largo plazo, por ser el mango una planta perenne. El cultivo de tejidos y las técnicas de transformación

genética ofrecen la ventaja de disminuir el tiempo de mejoramiento genético, permitiendo la producción de materiales sanos, sobresalientes en una o varias características, y al mismo tiempo conservando las bondades de la variedad. Con estas técnicas es posible incorporar genes de interés agronómico como, por ejemplo, genes que controlen la maduración de los frutos y genes de re-

PALABRAS CLAVES / BAR / Biobalística/ Fosfinotricina / GUS / *Mangifera indica* L / PPT / Transformación Genética /

Recibido: 20/01/2004. Modificado: 27/04/2004. Aceptado: 30/04/2004.

Marleny Chavarri. Doctora en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Venezuela (UCV). Profesor, Facultad de Agronomía, UCV. e-mail: marleny62@yahoo.es.
Ariadne Vegas. Doctora en Ciencias Agrícolas, UCV. Investiga-

dor, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP), Maracay, Venezuela. e-mail: avegas@inia.gov.ve
Asia Y. Zambrano. Doctora en Ciencias Agrícolas, UCV. Investigador, INIA-CENIAP,

Maracay, Venezuela. e-mail: azambra@reacciun.ve
Jhonny R. Demey. Master en Estadística, Universidad Central de Venezuela. Bioestadístico, Centro de Biotecnología. Fundación Instituto de Estudios Avanzados

(IDEA), Venezuela. Dirección: Apartado 4521. Maracay, 2101. Venezuela. e-mail: jdemey@reacciun.ve.

SUMMARY

In order to genetically transform mango by biobalistic, somatic embryos of the varieties Haden, Madame Francis and Kent were bombarded. The maximum dose of PPT that somatic embryos survive was determined by exposing them in Gamborg, Miller y Ojima media containing 0, 0.5, 1 and 2mg/l PPT during 3 months and subculturing every month to evaluate fresh and dry weight. The embryos were bombarded with the plasmid CAMBIA 3201 with genes GUS y BAR, using two tungsten particle sizes (0.7 and 1.3 μ m), pressure of 80psi, bombardment distances of 10 and 16.5cm, and 5 μ g of DNA. Embryos were selected using 0.5mg/l PPT as selective agent. Particle size of

0.7 μ m and the bombardment distance of 16.5cm were selected. After 3 months of selection in the indicated PPT concentrations, selected clones of the Kent variety survived all concentrations, while non-transformed embryos survived only at 0.5mg/l. Haden and Madame Francis varieties were sensitive to the bombardment and selection conditions, and did not survive the process. Embryo survival was 4%, and 3 clones per 0.5g of tissues bombarded were regenerated. Enzymatic activity of transient expression of the GUS gene was observed and the incorporation of the GUS and BAR genes was demonstrated by means of PCR.

RESUMO

Com a finalidade de transformar geneticamente manga mediante biobalística, se bombardearam embriões somáticos das variedades Haden, Madame Francis e Kent. Determinou-se a dose máxima de PPT em que os embriões somáticos sobrevivem, cultivando-os no meio Gamborg, Miller e Ojima em concentrações de 0; 0,5; 1 e 2mg/l de PPT durante 3 meses e sub cultivando mensalmente para avaliar peso fresco e seco. Os embriões somáticos foram bombardeados com o plásmido CAMBIA 3201 que contém os genes GUS e BAR, com dois tamanhos de partículas de tungstênio (0,7 e 1,3 μ m), pressão de 80psi, duas distâncias de bombardeio (10,0 e 16,5cm) e 5 μ g de ADN. Se selecionaram os embriões transformados em meio Gamborg, Miller e Ojima com 0,5mg/l de PPT. As condições de bombar-

deio escolhidas foram o tamanho de partícula de 0,7 μ m e a distância de bombardeio de 16,5cm. Depois de três meses de seleção nas concentrações de PPT utilizadas se fez evidente a sobrevivência dos embriões transformados na variedade Kent, enquanto que os embriões não transformados sobreviveram em concentração de 0,5mg/l. As variedades Haden e Madame Francis foram sensíveis às condições de bombardeio e seleção subministrados, morrendo depois deste processo. Se conseguiu uma sobrevivência de 4% e a regeneração de 3 clones por 0,5g de tecido bombardeado. Se evidenciou a atividade enzimática da expressão transitória do gene GUS mas não a estável e a incorporação dos genes GUS e BAR mediante PCR.

sistencia a enfermedades de origen bacteriano y fúngico, para las cuales no se ha encontrado resistencia en variedades comerciales. Estos patógenos limitan la producción de este frutal y afectan seriamente la calidad del producto final (Rossetto *et al.*, 1996).

La biobalística es uno de los métodos directos de transformación más usados en la actualidad. Se basa en disparar hacia el núcleo de las células a transformar, con alta aceleración, pequeños proyectiles con ADN adherido en su superficie, permitiendo así la incorporación de ADN foráneo al ADN de la célula (Sanford, 1993).

En gramíneas como arroz, avena, caña de azúcar, cebada, maíz, pasto, trigo y sorgo, se han obtenido transformantes estables a partir de callos embriogénicos, que expresan los genes de selección NPTII (gen que incorpora resistencia al antibiótico kanamicina) y BAR (gen de resistencia al herbicida fosfitricina o PPT) y los genes

reporteros GUS (gen que codifica la enzima β -glucuronidasa) o sgfp (gen que codifica una proteína verde fluorescente), utilizando promotores específicos para monocotiledóneas, comprobándose la integración y expresión de los genes a través de pruebas de PCR, Southern y Western blotting y RT-PCR (Vallejos *et al.*, 1992; Vain *et al.*, 1993; Casas *et al.*, 1997; Yao y Kasha, 1997; Falco *et al.*, 2000; Toldi *et al.*, 2000; Kuai *et al.*, 2001; Richards *et al.*, 2001).

En lo que respecta a las dicotiledóneas, en la familia de las leguminosas se han transformado embriones cigóticos de *Phaseolus vulgaris* con el plásmido que contiene los genes 2s-albúmina y la secuencia estructural de β -glucuronidasa, bajo el control del promotor CaMV35S, obteniéndose tejidos quiméricos (Aragão *et al.*, 1992). En *Racoperma mangium* se ha confirmado la transferencia de ADN, tanto en callos de hipocótilo como en semillas. El

plásmido utilizado para el bombardeio fue el BI426 que contenía el gen GUS bajo el control del promotor CaMV35S. La expresión de este gen se observó después de 24 horas, siendo muy bajo el número de puntos azules (Quoirin *et al.*, 1997).

En raíces y tubérculos también ha sido señalado el uso de la biobalística para la transformación genética, obteniéndose transformantes estables en batata y yuca que expresan los genes NPTII y GUS. En yuca se han bombardeado tejidos derivados de suspensiones celulares y en batata hojas y pecíolos (Prakash y Varadarajan, 1992 y Schöpke *et al.*, 1997).

En lechosa (*Carica papaya* L.) se ha señalado transformación estable a través del bombardeio de microproyectiles utilizando tres tipos de explantes, embriones cigóticos inmaduros, secciones de hipocótilo y callos embriogénicos. Estos tejidos fueron bombardeados con partículas de tungsteno llevando los genes

de selección BAR y NPTII, de la proteína de la cápside del virus de la mancha anillada de la lechosa (PRSV-P) y el reportero GUS. Se hizo evidente la transformación cuando se realizaron las pruebas de actividad enzimática para la expresión de los genes GUS y NPTII, el PCR para el gen de la proteína de cápside del PRSV-P y Southern blot para el gen BAR (Fitch *et al.*, 1990; Cabrera *et al.*, 1995; Cai *et al.*, 1999).

En las variedades Kensington Pride y Carabao de mango ha sido señalada la optimización de las condiciones de bombardeio usando partículas de tungsteno de 0,7 μ m, una distancia entre la muestra y la zona de disparo de 15cm, y a una presión de bombardeio de 125psi, indicándose la transformación estable del tejido embriogénico por incorporación del gen GUS (Cruz-Hernández *et al.*, 2000). Existen otros trabajos en transformación genética de mango utilizando *Agrobacterium tumefa-*

ciens. Mathews *et al.* (1992) y Cruz-Hernández *et al.* (1996) lograron transformar genéticamente embriones somáticos de dos cultivares de mango, Hindi y Keitt, usando cepas de la bacteria que contenían plásmidos con genes marcadores que codifican para las enzimas β -glucuronidasa y neomicina fosfotransferasa. En el segundo trabajo se incluyeron además genes relacionados con la maduración de los frutos, clonados en la orientación antisentido. Estos autores seleccionaron los embriones transformados en medios con kanamicina y comprobaron la integración de los transgenes mediante la prueba histológica de GUS, PCR y Southern blot.

La presente investigación tuvo como objetivo establecer las condiciones de transformación por biobalística en embriones somáticos de mango bombardeados con el plásmido CAMBIA 3201, así como la comprobación de la incorporación de los genes a través de la actividad enzimática del gen GUS y la amplificación por PCR de los genes GUS y BAR.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se utilizó como material vegetal embriones somáticos originados del cultivo de embriones cigóticos de tres variedades de mango, dos monoembrionarias (Haden y Kent) y una poliembrionaria (Madame Francis). Frutos de las tres variedades fueron lavados con solución jabonosa a los 30-45 días después de la floración, introduciéndolos por 10min en etanol 70%. Luego se desinfectaron por 30min con hipoclorito de sodio 3%, y seguidamente se lavaron 3 veces con agua destilada estéril. Finalizada la desinfección, los frutos fueron bisectados y se extrajeron los embriones cigóticos según la metodología de Dewald *et al.* (1989), modificada

con la desinfección previa en etanol 70%.

Los embriones cigóticos se sembraron a un medio constituido por la mitad de las sales de Murashige y Skoog (MS; Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 10% de agua de coco, tiamina ($0,4\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), mioinositol ($100\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), ácido nicotínico ($0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), glutamina ($400\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), sacarosa ($30\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), agar ($7\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y Bencil amino purina (BAP; $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a pH 5,8. Las condiciones ambientales utilizadas fueron oscuridad, temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y 70-80% de humedad relativa, según protocolo señalado por Salazar (1997). Secciones de 0,5cm de los callos obtenidos de los embriones cigóticos de cada variedad fueron transferidos a un medio de B5 (Gamborg *et al.*, 1968), suplementado con tiamina ($0,4\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), ácido nicotínico ($0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), mioinositol ($100\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), glutamina ($400\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), agar ($7\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) y sacarosa ($30\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a pH 5,8; bajo temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, intensidad lumínica de $32\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ durante 16h y humedad relativa entre 70-80% (Salazar, 1997).

Prueba de susceptibilidad a fosfotricina (PPT)

Se estudió la susceptibilidad de los embriones somáticos de las tres variedades de mango a diferentes concentraciones del herbicida fosfotricina (PPT) cuyo ingrediente activo es glufosinato de amonio. Las concentraciones ensayadas en el primer experimento fueron 0; 1; 2 y $4\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, que correspondieron a los tratamientos T1, T2, T3 y T4, respectivamente; mientras que en el segundo experimento fueron 0; 0,5; 1 y $2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, en el medio B5, con la finalidad de escoger un rango de concentración que inhibiese el crecimiento de los embriones somáticos. Se determinó el peso fresco y el peso seco de los embriones somáticos que sobrevivieron

a las concentraciones del herbicida, cada 30 días de subcultivo.

Se utilizó un diseño completamente aleatorio con 5 réplicas, 6 cápsulas por réplica y 1 cápsula por unidad experimental con embriones somáticos de un peso aproximado de 0,5g (25 embriones). Los datos se transformaron con $\log(x)$, y se les realizó el Análisis de Varianza y las pruebas de medias de Rangos Múltiples de Duncan.

Plásmido

Se utilizó el plásmido CAMBIA3201, purificado a partir de cultivos de *Escherichia coli*, que contenía duplicado el promotor CAMV35S, los genes reporteros NPTII y GUS y el gen de resistencia BAR, producido por el Centro de Aplicación de la Biología Molecular de la Agricultura Internacional de Canberra, Australia (CAMBIA; www.Cambia.Canberra.au).

Preparación de las partículas

Se utilizaron partículas de tungsteno de 0,7 y $1,3\mu\text{m}$, (M10 y M20, respectivamente) las cuales se desinfectaron con etanol 95%, colocando 50mg de partículas en 500 μl de etanol en tubos de centrifuga de 1,5ml; luego se lavaron 3 veces con agua destilada estéril, se centrifugaron y suspendieron en 500 μl de agua. El plásmido se precipitó sobre las partículas, mezclando 50 μl de partículas de tungsteno, 5 μl del ADN (5 μg), 50 μl de 2,5M CaCl_2 estéril y 20 μl de espermidina 100mM esterilizada. Se centrifugó por 10min a 10000rpm y se eliminó el sobrenadante. Se le agregó 250 μl de etanol 100%, volviéndose a centrifugar por 10min a 10000rpm, y finalmente se eliminó el sobrenadante y se le agregó 60 μl de etanol 100% (Vain *et al.*, 1993). Todas las operaciones se

realizaron en la cámara de flujo laminar.

Bombardeo

Se colocaron 0,5g de los embriones somáticos en el centro de las cápsulas de Petri contentivas del medio B5. El bombardeo se realizó con el sistema de flujo de partículas (PIG). Se bombardearon 30 cápsulas por cada una de las variedades. Se colocaron 10 μl de la suspensión de partículas con el ADN en el porta filtro por bombardeo. Las distancias de bombardeo fueron de 10 y 16,5cm, el número de disparos fue de uno por muestra, y la presión de bombardeo de 80 y 70psi, para el primer y segundo experimento, respectivamente. A las 72h se transfirieron los embriones bombardeados al medio B5 con la adición del herbicida PPT a la dosis determinada en el ensayo de susceptibilidad. La eficiencia de la transformación por bombardeo se midió determinando el número de clones transformados por gramo de tejido bombardeados.

Pruebas comprobatorias de transformación

Expresión de la β -glucuronidasa (GUS). Se disolvió 5mg del sustrato x-gluc (5-Bromo-4-cloro-indolil- β -dimetilformamida) en 50 μl de dimetil formamida o DMSO; 1ml de tampón fosfato 500mM pH 7; 0,2ml de EDTA 500mM; 10 μl Triton-X100; y 50 μl de ferrocianuro de potasio 100mM. Se aforó a 10ml con agua destilada y se guardó congelado en alícuotas de 1ml. En los platos desechables usados para ELISA, se colocó 100 μl de la suspensión del reactivo preparado por celda. Seguidamente se introdujeron los embriones somáticos bombardeados y los testigos, incubándolos a 37°C toda la noche. Se considera la prueba positiva cuando aparece una coloración azul índigo, que indica la expresión del gen GUS en los tejidos transfor-

mados. Se realizó un contejo a los tres días del bombardeo (expresión transitoria), en 5 muestras por cápsula de Petri tratada. Esta prueba se aplicó nuevamente a los 6 meses del bombardeo para evaluar la expresión estable de los embriones somáticos bombardeados (Jefferson, 1987).

Sobrevivencia en medio selectivo con PPT. Se transfirieron 0,5g (25 embriones) de los embriones bombardeados al medio B5, en gradiente creciente de concentración de PPT (0; 0,5; 1 y 2mg·l⁻¹) durante 3 meses, subcultivándolos cada mes. Se utilizó un diseño completamente aleatorio con cinco réplicas y seis cápsulas por replica por unidad experimental.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para evidenciar la incorporación de los genes BAR y GUS. Para evaluar la incorporación de las secuencias de los genes BAR y GUS en el genoma de los embriones somáticos de mango bombardeados, se realizó la técnica de PCR. El ADN se aisló de los embriones regenerados según Zambrano *et al.* (2002) y la amplificación se realizó según Fernández-Da Silva y Menéndez-Yuffá (2003). Se usó una mezcla de reacción final de 10µl con 50ng de ADN genómico, 1µl de tampón 10X, 1µl dNTPs (2,5mM), 1µl MgCl₂ (25mM), 0,5µl de cada iniciador (100µM), 0,5U de Taq polimerasa (Promega). Para la amplificación del gen BAR se utilizaron los iniciadores LK2B: 5'CCAGAAACCCACGTGATGCC-3' y LK1F: 5'CAGGAACCGGCAGGAGTGGGA-3' y para el gen GUS 5'CCAGAAACCCACGTGATGCC-3' y 5'CAGGAACCGGCAGGAGTGGGA-3'. La amplificación de los genes BAR y GUS fue realizada en un termociclador modelo MJ Research PTC 200, bajo los siguientes perfiles de temperatura: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C por 1min; seguido de 40 ciclos cada uno con un segmento de desnaturalización a 94°C por 30s, uno de alineamiento a 65°C por 30s y

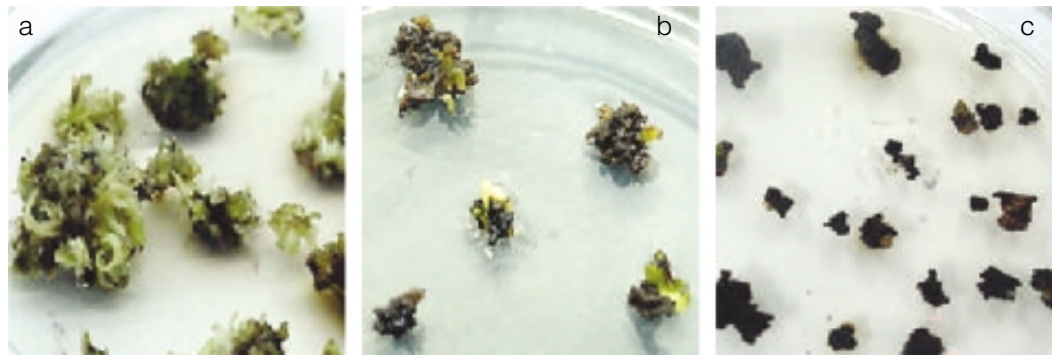


Figura 1. Embriones somáticos de mango variedad Kent a los 60 días después del tratamiento con PPT. a: Testigos a 0mg·l⁻¹ de PPT; b: Tratados con 0,5mg·l⁻¹ de PPT; y c: Tratados con 2mg·l⁻¹ de PPT.

uno de elongación a 72°C por 1min; con un ciclo de elongación final a 72°C por 1min. Las muestras amplificadas se corrieron en agarosa al 1,5%, a 50V y 100mA. Los productos de amplificación se visualizaron con bromuro de etidio y se digitalizaron las imágenes en gel Doc Biorad 2000.

Resultados y Discusión

Susceptibilidad de los embriones somáticos de mango al PPT

A los 30 días de tratamiento, los embriones somáticos de las tres variedades en estudio permanecieron vivos y de color blanco crema en los tratamientos T1 y T2 (0 y 0,5mg·l⁻¹ de PPT), con mayor incremento del peso fresco y seco en T1. En los tratamientos T3 y T4 (1 y 2mg·l⁻¹ de PPT) los embriones de las tres variedades tomaron una coloración marrón oscuro pero permanecieron vivos, con incrementos muy leves del peso fresco y seco.

A los 60 días de subcultivo, los embriones de las tres variedades mostraron la misma tendencia a la observada a los 30 días. Finalmente, a los 90 días, el tratamiento T1 mostró incrementos de peso fresco y seco, y hubo desarrollo de los embriones en todas las variedades. Algunos embriones de las diversas variedades permanecieron vivos en T2, con leves incrementos de peso fresco y seco, mientras que en T3 y T4 se hizo evidente la muerte celular en

todas las variedades en estudio, sin variar su peso fresco y seco al obtenido a los 60 días (Figura 1).

Bombardeo de los embriones somáticos de mango

Al bombardear los embriones somáticos de mango a una presión de 80psi, una distancia del ADN al tejido de 10cm y un tamaño de partícula de tungsteno de 0,7µm y 1,3µm, se observó muerte de todos los embriones de las tres variedades bombardeadas, subcultivados 72 horas después del bombardeo en el medio B5 con 0,5mg·l⁻¹ del agente selectivo PPT. Al bombardear los embriones con partículas de tungsteno de 0,7µm, a una presión de 80psi y una distancia del ADN al tejido de 16,5cm, hubo sobrevivencia de los embriones. Los resultados fueron similares cuando se utilizó 70psi. Estos embriones bombardeados fueron sometidos a una presión de selección durante seis meses con PPT (0,5mg·l⁻¹) y después pasaron al medio B5; bajo estas condiciones todos los embriones murieron con gran liberación de fenoles.

Se evidenció que los embriones fueron afectados negativamente a mayor tamaño de partícula y menor distancia de bombardeo, lo cual probablemente se debió a una mayor lesión del material vegetal, ocasionando la liberación de fenoles y posteriormente la muerte. Estos resultados concuerdan con

los de Morrish *et al.* (1993) en trigo y de Quoirin *et al.* (1997) en leguminosas, quienes mencionan que el tamaño de las partículas de tungsteno influye en la distribución del ADN, y en la lesión del material vegetal.

Finalmente, tomando en consideración los efectos detrimentales de la presión de selección prolongada, se realizó otro bombardeo con la variedad Kent, a 80psi, 16,5cm de distancia y un tamaño de partícula de 0,7µm, pero con una presión de selección de un mes con PPT (0,5mg·l⁻¹), lográndose mayor sobrevivencia del material vegetal. Después del reciclaje de los embriones en medio B5 se obtuvieron tres clones regenerados por 0,5g de tejido bombardeado. Estos resultados fueron similares a los obtenidos para las variedades Kensington Pride y Carabao por Cruz-Hernández *et al.* (2000), quienes señalaron como condiciones óptimas un tamaño de partícula de 0,7µm, una distancia de disparo de 15cm y una presión de 125psi, cuando usaron el mismo sistema de bombardeo. Estos autores aumentaron la eficiencia del proceso realizando 2 bombardeos por cápsula y adicionando manitol al medio de cultivo. Sin embargo, no es posible comparar la eficiencia en los dos trabajos, ya que Cruz-Hernández *et al.* (2000) sólo hicieron referencia a la expresión transitoria del gen GUS para medir la eficiencia de su protocolo.

Pruebas de transformación genética

Prueba transitoria y estable de β -glucuronidasa (GUS). Todos los embriones somáticos de la variedad Kent sometidos a la prueba de la β -glucuronidasa mostraron la coloración azul índigo a casi negro característica a los 2 días del bombardeo (prueba transitoria). Sin embargo, los embriones de las variedades Haden y Madame Francis permanecieron de color marrón claro al igual que el testigo, es decir que la prueba fue negativa, lo que indica que no hubo expresión transitoria del gen. A los 6 meses se sometieron los embriones de la variedad Kent a la prueba de la β -glucuronidasa y el resultado fue negativo. Estos resultados coinciden con los encontrados por Casas *et al.* (1997), donde la expresión de la actividad enzimática de GUS no se detectó a las 3 semanas del bombardeo, por lo que no se pudo detectar mediante esta prueba la incorporación de este gen en los tejidos bombardeados analizados. Se puede presumir el mecanismo de silenciamiento del gen GUS, lo que implicaría que un alto número de copias se insertaron en el genoma (Cervera *et al.*, 2000).

Prueba de selección con PPT. Los embriones bombardeados de la variedad Kent se cultivaron durante 6 meses en el medio B5, antes de someterlos a las pruebas de selección con PPT. Se encontraron diferencias significativas en las variables peso fresco y seco de los embriones somáticos con relación a las diferentes dosis del herbicida, en la prueba de selección después del bombardeo. La prueba de medias de rangos múltiples de Duncan indicó que el tratamiento testigo T1 (0mg·l⁻¹ de PPT) no produjo efecto negativo sobre el crecimiento evaluado a través de los pesos fresco y seco. Los tratamientos T2 (0,5 mg·l⁻¹ de PPT), T3 (1 mg·l⁻¹ de PPT) y T4 (2 mg·l⁻¹ de PPT) no muestran

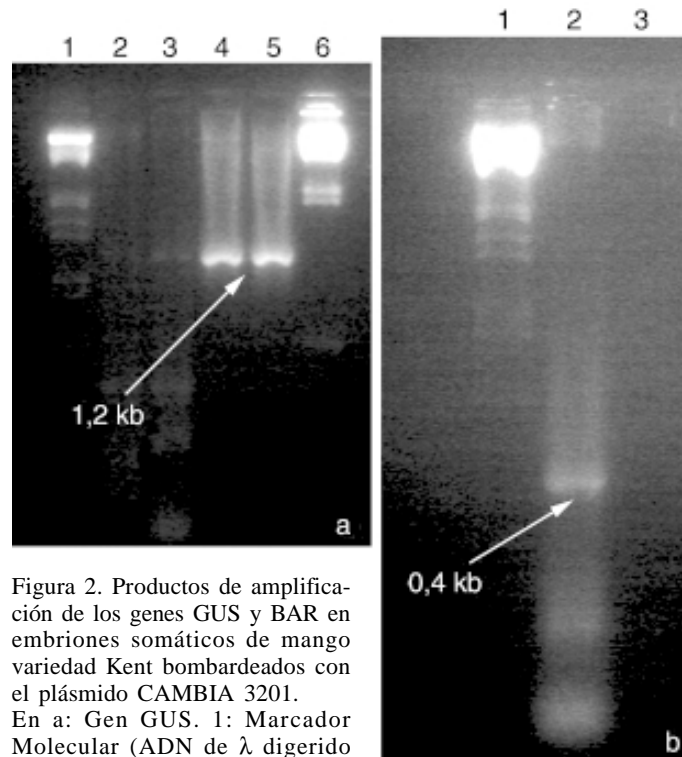


Figura 2. Productos de amplificación de los genes GUS y BAR en embriones somáticos de mango variedad Kent bombardeados con el plásmido CAMBIA 3201. En a: Gen GUS. 1: Marcador Molecular (ADN de λ digerido con EcoRI+Hind III); 2 y 3: ADN genómico de embriones no bombardeados (Testigo Negativo); 4: ADN genómico de embriones bombardeados; 5: ADN del plásmido CAMBIA 3201 (Testigo Positivo); y 6: Marcador Molecular (ADN de λ digerido con EcoRI). En b: Gen BAR. 1: Marcador Molecular (ADN de λ digerido con EcoRI + Hind III); 2: ADN genómico de embriones bombardeados; y 3: ADN genómico de embriones no bombardeados (testigo negativo).

diferencias significativas para el peso fresco de los embriones, en tanto que se evidencia diferencias entre los tratamientos T2 y T3 y T4, los cuales muestran un comportamiento similar para el peso seco de los embriones (Tabla I).

Los resultados evidencian que en la medida que se incrementó la dosis del herbicida PPT disminuyó el crecimiento y, finalmente, ocurrió muerte celular. La concentración de 0,5mg·l⁻¹ del herbicida

fosfotricina (PPT) permitió la sobrevivencia y crecimiento de los embriones somáticos de mango en estudio. No obstante, se podrían utilizar concentraciones menores de PPT a las empleadas en esta investigación, ya que es posible que todavía sea demasiado alta en periodos prolongados de tiempo. Igualmente, el tiempo de selección con herbicida también podría ser reducido, debido a que un periodo superior a un mes cons-

tituye una presión de selección muy fuerte.

PCR de los genes BAR y GUS. Los embriones somáticos de la variedad Kent que sobrevivieron al proceso de bombardeo, selección y subsecuentes subcultivos en el medio B5 fueron evaluados para la presencia de los genes GUS y BAR a través de su amplificación por PCR. En estas pruebas se amplificaron bandas de 0,4kb para el gen BAR y 1,2kb, para el gen GUS, idénticas a las amplificadas cuando se usó el plásmido CAMBIA3201 (testigo positivo). Por lo tanto se concluye que, en dichos tejidos, los dos genes resultaron incorporados al ADN, mientras que en el tratamiento testigo no se evidenciaron estas bandas (Figura 2).

En el presente trabajo se establecieron como condiciones de bombardeo de embriones somáticos de mango de la variedad Kent con el plásmido CAMBIA 3201 por el sistema de flujo de partículas, una distancia de disparo de 16,5cm; un tamaño de partículas M10 (0,7 μ m); una presión de bombardeo de 80psi y una concentración de ADN de 5 μ g. Estos embriones exhibieron la expresión transitoria de la β -glucuronidasa a los 2 días del bombardeo; sobrevivieron hasta 2mg·l⁻¹ del herbicida fosfotricina después de 3 meses de subcultivo en el mismo medio con el herbicida; y se comprobó la integración de los genes GUS y BAR a través de PCR, después de 12 meses en cultivo. Usando la mencionada metodología se generaron 3 clones por 0,5g de tejido bombardeado y la sobrevivencia fue de 4% (1 embrión por cada 25 sembrados). Se requeriría de un análisis de hibridación tipo Southern blot para conocer si se expresan los genes y su intensidad de expresión.

AGRADECIMIENTOS

La investigación fue parcialmente financiada por el INIA-CENIAP y FUNDACITE ARAGUA, Venezuela, a

TABLA I
EFECTO* DE LA CONCENTRACIÓN DEL HERBICIDA PPT EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE MANGO VAR: KENT, DESPUÉS DEL BOMBARDEO CON EL PLÁSMIDO CAMBIA 3201

Tratamientos	Peso fresco	Peso seco
T1 (0mg·l ⁻¹ PPT)	4,68a	0,40a
T2 (0,5mg·l ⁻¹ PPT)	0,79b	0,10b
T3 (1mg·l ⁻¹ PPT)	0,69b	0,07c
T4 (2mg·l ⁻¹ PPT)	0,54b	0,06c

* Expresado como medias en gramos. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (P \leq 0,05).

través del proyecto 1995-FCT-01-05-01-4. Los autores agradecen a Zaida Lentini del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) la donación del plásmido CAM-BIA3201.

REFERENCIAS

- Aragão F, Grossi M, Almeida L (1992) Particle bombardment mediated transient expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Mol. Biol.* 20: 357-359.
- Avilán L, Dorantes I, Rodríguez M (1998) Selección de cultivares de mango para el comercio de frutos frescos de la colección del centro nacional de investigaciones agropecuarias período 1952-1996. *Agronomía Tropical* (Venezuela) 48: 197-134.
- Cabrera JL, Vegas A, Herrera L (1995) Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Reports* 15: 1-7.
- Cai W, Gonsalves C, Tennant P, Fermin G, Souza M, Sarindu F, Zhu H, Gonsalves D (1999) A protocol for transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 35: 61-69.
- Casas A, Kononowicz A, Hann T, Zhang L, Rey T, Hasegawa P (1997) Transgenic *Sorghum* plants obtained after microprojectile bombardment of immature inflorescences. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 33: 92-100.
- Cervera M, Pina J, Juárez J, Navarro L, Peña L (2000) A broad exploration of a transgenic population of citrus: stability of gene expression and phenotype. *Ther. Appl. Genet.* 100: 670-677.
- Cruz-Hernández A, Gómez M, Litz R (1996) Genetic transformation of mango. *Acta Hort.* 455: 292-298.
- Cruz-Hernández A, Town L, Cavallaro A, Botella JR (2000) Transient and stable transformation in mango by particle bombardment. *Acta Hort.* 509: 237-241.
- Dewald S, Litz R, Moore G (1989) Optimizing somatic embryo production in mango. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114: 712-716.
- Falco M, Tulmann A, Ulian E (2000) Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. *Plant Cell Reports* 19: 1188-1194.
- Fernández Da Silva R, Menéndez-Yuffá A (2003) Transient gene expression in secondary somatic embryos from coffee tissue electroporated with the genes *gus* and *bar*. *Electr. J. Biotechnol.* 6: 29-38.
- Fitch M, Manshardt R, Gonsalves D, Slightom J, Sanford J (1990) Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports* 9: 189-194.
- Gamborg O, Miller PA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plant: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol.* 6: 265-270.
- Kuai B, Perret S, Wan S, Dalton S, Bettany A, Morris P (2001) Transformation of coat and inheritance of bar gene expression. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 66: 79-88.
- Mathews H, Litz R, Wilde H, Wetzstein H (1992) Genetic transformation of mango. *Acta Hort.* 341: 292-297.
- Morrish F, Sangstat DD, Armstrong CL, Fromm M (1993) Microprojectile bombardment: A method for the production of transgenic cereal crop plants and the functional analysis of genes. En Decker M (Ed.) *Transgenic Plants. Fundamentals and Applications*. Andrew Hiatt. New York, EEUU. pp. 133-171.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Prakash CS, Varadarajan U (1992) Gene transformation of sweet potato by particle bombardment. *Cell Reports* 11: 53-57.
- Qoirim M, Aragão F, Rech E, De Oliveira, DE (1997) Transient expression of reporter gene introduced by biobalistic bombardment into *Racosperma mangium* (Leguminosae family) tissue. *Braz. J. Genet.* 203: 507-510.
- Richards HA, Rudas VA, Sun H, McDaniel JK, Tomaszewski Z, Conger BV (2001) Construction of a GFP-BAR plasmid and its use for switchgrass transformation. *Plant Cell Reports* 20: 48-54.
- Rossetto C, Ribeiro J, Gallo P, Soares N, Sabino J, Martines A, Bartoletto N, Paulo E (1996) Mango breeding for resistance to diseases and pest. *Acta Hort.* 1: 282-303.
- Salazar E (1997) La propagación *in vitro* de plantas. En 1^{er} *Encuentro de Productores Agrícolas con la Biotecnología*. Maracaibo, Venezuela. pp. 53-65.
- Sanford JC (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Meth. Enzymol.* 217: 483-509.
- Schöpke C, Taylor NJ, Carcamo R, Beachy RN, Fauquet C (1997) Optimization of parameters for particle bombardment of embryogenic culture of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using computer image analysis. *Plant Cell Reports* 16: 526-530.
- Singh L (1969) Mango. En *Outlines of Perennial Crop Breeding in the Tropics*. Wageningen Landbouwhogescholl. Wageningen, Holanda. pp. 309-327.
- Singh L (1978) *Mango*. Serie N°3. India Council of Agricultural Research. New Delhi, India. 99 pp.
- Toldi O, Tóth S, Oreifig A, Kiss E, Jenes B (2000) Production of phosphinothricin-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) through the application of phosphinothricin as growth regulator. *Plant Cell Reports* 19: 1226-1231.
- Vain P, Keen N, Murillo J, Rathus C, Nemes C, Finner J (1993) Development of particle inflow gun. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33: 237-246.
- Vallejos R, Permingeat H, Ortiz JP, Cervigni G, Orsaria L, Regiardo M, Arana JL (1992) Transformation of cereals: transgenic maize and wheat plants obtained by particle bombardment. *BIOCILA*. Abstract CTR 40.
- Yao Q, Kasha K (1997) Potential of biolistic transformation of barley microspores based on viability activity. *Genome* 40: 639-643.
- Zambrano AY, Demey JR, Martínez G, Fuenmayor F, Gutiérrez Z, Saldaña G, Torrealba M (2002) Método rápido, económico y confiable de minipreparación de ADN para amplificaciones por RAPD en bancos de germoplasma. *Agronomía Tropical* (Venezuela) 52: 235-243.