

# EXPRESIÓN TRANSITORIA DEL GEN DE LA $\beta$ -GLUCORONIDASA Y EFECTO DEL BOMBARDEO EN TEJIDO DE CRISANTEMO (*Dendrathera grandiflorum*)

M. Chávez-Camacho<sup>1</sup>; E. Valadez-Moctezuma<sup>2†</sup>; G. Carrillo-Castañeda<sup>1</sup>; E. Lozoya-Gloria<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Especialidad de Genética. Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco. C.P. 56230. Montecillo, Estado de México. México.

<sup>2</sup>Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. C.P.56230. Chapingo, Estado de México. México.

Correo-e: evaladez@taurus1.chapingo.mx (<sup>†</sup>Autor responsable).

<sup>3</sup>Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Unidad Irapuato. Km. 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León. Apartado Postal 629. CP.36500 Irapuato, Gto. México. Correo-e: elozoya@ira.cinvestav.mx

## RESUMEN

Se transformó tejido de hoja de crisantemo (*Dendrathera grandiflorum*) del cv. Tikara con el gen reportero de  $\beta$ -glucoronidasa (GUS) utilizando microproyectiles de tungsteno de 0.7 mm acelerados a alta velocidad con gas helio. Se evaluaron diferentes condiciones de precultivo y de bombardeo, encontrando que el período adecuado de cultivo previo fue de 3 días; período en que el tejido adquiere la resistencia suficiente para soportar el daño físico infringido por los microproyectiles. Mediante tinción histoquímica se detectó la expresión transitoria del gen GUS en explantes bombardeados a 10 cm de distancia en un sistema de biobalística no comercial. Las pruebas estadísticas indicaron que algunas respuestas morfogenéticas, así como la obtención de transformantes con expresión transitoria depende de la distancia y del diámetro del microproyectil utilizado durante el bombardeo.

**PALABRAS CLAVE ADICIONALES:** biobalística, biotecnología, expresión transitoria, gen reportero GUS, gen de selección.

## TRANSIENT EXPRESSION OF $\beta$ -GLUCORONIDASE GENE AND THE EFFECT OF BIOLISTIC BOMBARDMENT CHRYSANTHEMUM (*Dendrathera grandiflorum*) TISSUE

## SUMMARY

The leaf tissue of chrysanthemum (*Dendrathera grandiflorum*) cv. Tikara with the reporter gene  $\beta$ -glucoronidase (GUS) was transformed using 0.7 mm tungsten microprojectiles accelerated to high velocity with helium gas. Different pre-culture and bombardment conditions were evaluated. It was found that the appropriate pre-culture period was 3 days, the period in which the tissue acquires sufficient resistance to withstand physical damage inflicted by the microprojectiles. Using histochemical staining, transient expression of the GUS gene was detected in explants bombarded at a distance of 10 cm in a non-commercial biolistic system. The statistical tests indicated that some morphogenetic responses, as well as obtaining transformants with transient expression, depend on the distance and diameter of the microprojectile used during bombardment.

**ADDITIONAL KEY WORDS:** biotechnology, transient expression, reporter gene GUS, selection gene.

## INTRODUCCIÓN

La transformación genética es una estrategia que actualmente se utiliza en la mayoría de los programas de fitomejoramiento. La capacidad de introducir y expresar genes en plantas data de 1984, cuando se reportó por vez primera la transformación genética de *Nicotiana tabacum* con un gen bacteriano mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Birch, 1997). Posteriormente, se desarrollaron técnicas alternativas y más eficientes que hicieron posible esa transferencia y expresión de genes en diferentes especies de plantas, cuyo objetivo fue proveerlas de mecanismos de resistencia a plagas, enfermedades,

herbicidas y genes modificadores de procesos biosintéticos. Estas características nuevas introducidas, eran codificadas por genes exógenos que provenían de diferentes organismos (principalmente de bacterias); y su transferencia respondió a la mínima o nula posibilidad de mejorar genéticamente a las plantas con técnicas tradicionales (Dale *et al.*, 1993).

La biobalística es una de esas técnicas que permite transferir genes a organismos recipientes con una alta posibilidad de éxito. Este sistema utiliza partículas microscópicas de metales de oro, tungsteno o platino (microproyectiles) recubiertas con el ADN de interés, que

son aceleradas a altas velocidades en un sistema llamado "pistola de genes" (Morrish *et al.*, 1993). El ADN introducido de esta forma en las células, permanece biológicamente activo y puede expresarse de manera transitoria o integrarse en el núcleo dando lugar a una transformación estable. Esta técnica se considera la más eficiente para fines de transformación genética en vegetales después de *A. tumefaciens* (Varsha *et al.*, 1997), ya que ha sido posible obtener plantas transgénicas de un gran número de especies, incluyendo al maíz (Gordon-Kamm *et al.*, 1990) y caña de azúcar (Bower y Birch, 1992).

La pistola de genes fue diseñada por Sanford y colaboradores (Klein *et al.*, 1987). Actualmente los diseños se han mejorado para hacer más eficiente la introducción de microproyectiles, los cuales pueden ser impulsados mediante descarga eléctrica (McCabe *et al.*, 1988), aire comprimido (Oard *et al.*, 1990), nitrógeno (Morikawa *et al.*, 1989) o helio (Johnston, 1990). Sin embargo, al igual que otras técnicas alternativas, la biobalística requiere de definición de condiciones específicas para cada especie; como son, definir el diámetro, cantidad apropiada, velocidad y distancia de bombardeo de los microproyectiles, concentración óptima de ADN, estimación de la permeabilidad y la resistencia de las células; así como el número de bombardeos (Wang *et al.*, 1988; Klein *et al.*, 1988ab; Klein y Maliga, 1991; Russell, 1993; Morrish *et al.*, 1993).

Normalmente en las construcciones genéticas que se diseñan para la transformación de células vegetales, es común introducir además del gen de interés, dos tipos de genes adicionales, un gen de selección y un gen reportero. El primero, codifica una enzima capaz de inactivar un antibiótico particular que se adiciona al medio de cultivo para la morfogénesis *in vitro*; cuya función es permitir solamente la regeneración de las células que adquirieron la información, normalmente se utiliza el gen NPT II (neomicin fosfotransferasa II) o el gen CAT (cloranfenicol acetiltransferasa) que confieren resistencia a kanamicina y a cloranfenicol respectivamente. Los genes reporteros evidencian desde fases tempranas y de manera directa a las células transformadas. El gen más utilizado para este propósito es el gen GUS (proveniente de *Escherichia coli*). Este gen codifica para la enzima  $\beta$ -glucoronidasa ( $\beta$ -D-glucoronide gluconohidrolase) y se caracteriza en primer lugar, porque la enzima se mantiene estable a altas temperaturas, resiste la fijación histoquímica y su expresión se detecta fácilmente en el tejido. Su expresión se hace evidente por el típico color azul que adquiere la célula transformada debido a la hidrólisis de sustratos colorigénicos, como el *p*-nitrophenyl-glucoronide (PNPG, X-gluc), el 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucoronide (X-gluc); o fluorogénicos como el 4-methyl-umbelliferyl-glucoronide (MUG), entre otros (Naleway, 1992; Chi *et al.*, 1998). La importancia de utilizar el gen GUS como reportero radica en que la mayoría de los eucariontes, pero

especialmente las plantas, tienen una baja o nula actividad endógena detectable de esta enzima; finalmente, su expresión transitoria se hace evidente a las pocas horas de realizada la transformación, lo que implica que la información introducida se encuentra en el núcleo y está siendo traducida, pero no es posible asegurar que se encuentre integrada establemente dentro del genoma.

El objetivo principal de este reporte técnico, fue definir los parámetros óptimos para transformar células de tejido de hoja de dos cultivares de crisantemo con el gen reportero GUS mediante biobalística. La razón de definir los parámetros de transformación genética respondió en primer lugar, a que el sistema de biobalística no era de marca comercial; y en segundo lugar, porque el cultivo de crisantemo en México es económicamente importante; pero no está exento de problemas bióticos y abióticos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, permitirían considerar a corto plazo la transformación genética de la especie con genes que le confieran características agronómicas deseables; y de esta manera, apoyar los programas de fitomejoramiento diseñados para la misma. Además, esta especie ornamental cuenta con antecedentes de cultivo *in vitro*, lo que representa un avance para su respuesta morfogénica después de la transformación (Mityushkina *et al.*, 1995).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Se utilizaron explantes de hojas de *D. grandiflorum* cvs. Tikara y Harman de 0.7 cm de diámetro. Los explantes del cv. Harman se lavaron con detergente y se desinfectaron con alcohol 70 % y cloro 1.5 %, porque provenían de invernadero; los explantes del cv. Tikara se obtuvieron de plantas conservadas *in vitro*. El medio de cultivo usado para la proliferación de brotes fue el propuesto por Murashige y Skoog (1962) complementado con 100 mg-litro<sup>-1</sup> de meso-inositol, 0.5 mg-litro<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0.5 mg-litro<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0.1 mg-litro<sup>-1</sup> de tiamina-HCl, 2 mg-litro<sup>-1</sup> de glicina, 30 g-litro<sup>-1</sup> de sacarosa y 4 g-litro<sup>-1</sup> de agar. Para el cv. Harman se adicionaron al medio 6-benzilaminopurina 2 mg-litro<sup>-1</sup> y ácido 1-naftalenacético 0.5 mg-litro<sup>-1</sup> (MSR1) y para el cv. Tikara se utilizaron 20 g-litro<sup>-1</sup> de sacarosa, 4 mg-litro<sup>-1</sup> de ácido indolacético, 2 mg-litro<sup>-1</sup> de cinetina y 200 ml-litro<sup>-1</sup> de agua de coco (MS2); el pH se ajustó a 5.8. Los reguladores de crecimiento y concentraciones adicionadas a MSR1 y MS2 fueron previamente reportadas por Mityushkina *et al.*, 1995, como óptimas para la proliferación de brotes adventicios en cultivares de crisantemo. Los medios utilizados para seleccionar los transformantes contenían 15 mg-litro<sup>-1</sup> de kanamicina (Kantrex®). Esta concentración se determinó con base a la respuesta previa de los cultivares con diferentes concentraciones en el medio de cultivo (0, 15, 25, 50 y 100 mg-litro<sup>-1</sup>) y la concentración de 15 mg-litro<sup>-1</sup>

fue la que inhibió totalmente *in vitro* la formación o diferenciación de callo a partir de los explantes.

Para estimar la eficiencia de transformación con el sistema de biobalística, se utilizó el plásmido pBI<sub>121</sub> que contiene el gen reportero GUS y el gen de selección NPT II. Para purificarlo, se cultivó a la bacteria DH5a::pBI<sub>121</sub> en medio LB (bactotripton 10 g·litro<sup>-1</sup>, extracto de levadura 5 g·litro<sup>-1</sup> y NaCl 2 g·litro<sup>-1</sup>, pH 7.5) y 50 mg·litro<sup>-1</sup> de kanamicina.

### Preparación de microproyectiles

Las partículas de tungsteno M5, M10 y M17 (Bio-RAD Biolistic®) de 30 mg cuyo diámetro promedio es de 0.4, 0.7 y 1.1 µm, respectivamente, fueron suspendidas en 500 µl de etanol 70 % durante 15 min y luego se lavaron tres veces con agua destilada, desionizada y estéril. Posteriormente se resuspendieron en 500 µl de glicerol 50 % y se almacenaron a -20 °C protegidas de la luz. 50 µl de la suspensión de partículas fueron mezcladas por agitación durante 5 min con 50 µl de ADN de plásmido (1 µg·µl<sup>-1</sup>), 50 ml de CaCl<sub>2</sub> 2.5 M y 20 ml de espermidina 0.1 M. La mezcla se incubó por 10 min a -20 °C, después se centrifugó y la pastilla se lavó con etanol 70 %; finalmente ésta se resuspendió en 60 µl de etanol 70 %.

### Bombardeo

El sistema de biobalística utilizado fue un diseño no comercial modificado por el CINVESTAV- Unidad Irapuato, México. Inicialmente, se evaluó la respuesta de los dos cultivares de crisantemo al impacto de los microproyectiles sobre explantes precultivados durante 1, 3 y 6 días en los medios respectivos antes del bombardeo. Para cada experimento se utilizaron 45 explantes de cada cultivar distribuidos de forma concéntrica en la caja petri con la superficie del haz en contacto con el medio de cultivo; la posición del explante respondió a que el crisantemo, al igual que el resto de la familia *Compositae*, presenta cutículas cerosas y gruesas que pueden disminuir la eficiencia de penetración. Un solo bombardeo se realizó con los tres diferentes tipos de microproyectiles y a tres distancias a partir del macrocargador (7, 10 y 13 cm); la presión del gas en el sistema de biobalística se mantuvo constante a 80 psi y el vacío de la cámara del sistema fue de 40 psi. Posteriormente, los explantes se transfirieron a los medios de cultivo respectivos. Los microproyectiles utilizados para esta primer evaluación, fueron preparados de la misma manera como se indicó previamente, pero no contenían ADN. La evaluación correspondiente se hizo a los 20 días considerando porcentaje de explantes necrosados, porcentaje de explantes con callo, porcentaje de explantes con brotes y número de brotes por explante. La preincubación, se llevó a cabo con dos finalidades; primero, para seleccionar el periodo apropiado en donde el explante

adquiriera la resistencia necesaria para soportar el impacto físico de los microproyectiles; y la segunda, para estimular la activación del proceso de división celular en respuesta a los reguladores de crecimiento del medio (Hazel *et al.*, 1998). En este sentido, se ha reportado que un periodo largo puede endurecer al tejido y disminuir la penetración de las micropartículas; y un periodo corto, puede contribuir a un daño irreversible en los tejidos (Laparra *et al.*, 1995; Gallo e Irvine, 1993).

La experimentación final se realizó sólo en explantes del cv. Tikara, ya que el cv. Harman fue descartada por su baja respuesta al bombardeo en la evaluación previa. Para cada experimento con el cv. Tikara, se utilizaron dos repeticiones con 45 explantes cada una, distribuidos sobre las cajas petri de la misma manera que se mencionó anteriormente; una repetición fue bombardeada con micropartículas recubiertas con el plásmido pBI<sub>121</sub> y la otra con micropartículas sin ADN (testigos). Se aplicó un solo bombardeo en los explantes precultivados durante tres días con los tres tipos de microproyectiles y en las tres distancias consideradas. Posteriormente, el 10 % de los explantes se utilizó para la detección de la expresión del gen GUS mediante los ensayos de b-glucoronidasa y el 90 % restante, se transfirió a medio de cultivo fresco para promover su crecimiento, incubándolos a 26 ± 2 °C con un fotoperíodo de 16 h luz por 20 días. La evaluación correspondiente consistió en estimar el porcentaje de explantes con brotes, porcentaje de brotes por explante, brotes totales y expresión de GUS. Posteriormente, estos explantes se transfirieron a medio selectivo MS2K<sub>15</sub> y se mantuvieron durante 50 días más para seleccionar brotes transformados, este medio fue renovado cada dos semanas.

Los datos obtenidos correspondientes a los diferentes ensayos de bombardeo, fueron analizados mediante una prueba de X<sup>2</sup> para evaluar la hipótesis de independencia y posteriormente una prueba de homogeneidad para comparar el efecto de las distancias y del diámetro de las partículas independientemente. Los explantes mantenidos en medio selectivo (MS2K<sub>15</sub>) se analizaron mediante un ensayo tipo "Southern" no radioactivo para detectar la inserción del ADN del plásmido PBI<sub>121</sub>.

### Ensayo histológico para la detección de la β-glucoronidasa

El 10 % restante de los explantes bombardeados se transfirió a medio fresco y se mantuvieron con las mismas condiciones de incubación durante 72 h. Posteriormente, se realizaron los ensayos histoquímicos, para lo cual los explantes se infiltraron con una solución X-Gluc [50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>3</sub>·3 H<sub>2</sub>O, 0.1 % Triton X-

100 y X-Gluc 1 mg·ml<sup>-1</sup>]; se incubaron a 37 °C durante 16 h y después se lavaron cuatro veces con etanol 70 %. La clorofila se eliminó con varios lavados de acetona:metanol (1:3). El ensayo de  $\beta$ -glucoronidasa se realizó a los tres días después del bombardeo, tomando en cuenta que Laparra *et al.* (1995), entre otros, han reportado que este período es óptimo para la detección del máximo nivel de expresión transitoria de la enzima en tejidos vegetales. Para evaluar la eficiencia de transformación, se consideró el porcentaje de explantes con expresión transitoria tomado en cuenta el número de puntos azules por explante.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación de tolerancia a la kanamicina, demostró que los dos cultivares de crisantemo utilizadas fueron sumamente sensibles al antibiótico; ya que desde la concentración más baja (15 mg·litro<sup>-1</sup>) se inhibió totalmente la formación de callo y cualquier intento de desarrollo morfogénico en los explantes. La resistencia a este antibiótico varía enormemente entre las especies, pero el efecto final es el mismo; hay reducción significativa o total del crecimiento y amarillamiento del tejido, debido a que la kanamicina actúa afectando la traducción de la molécula de ARNm inhibiendo el alargamiento de la cadena polipeptídica y provocado errores en la lectura (Alberts *et al.*, 1983). Un efecto observado en los explantes que se encontraban en medios con 15 mg·litro<sup>-1</sup> de kanamicina, presentaron un ligero aumento en su volumen; pero mediante la observación al microscopio estereoscópico, se pudo corroborar que este aumento estaba dado por el incremento de volumen en las células y no por división celular. Pocos de estos explantes mostraron un desarrollo morfogénico lento y la mayoría de ellos presentaron amarillamiento respecto a los testigos que estaban en medio MS2; por lo que se consideró, que esta podría ser la concentración óptima que permitiría seleccionar los brotes transformados.

La respuesta al bombardeo de los explantes precultivados de los cultivares Harman y Tikara se muestra en el Cuadro 1. Los datos presentados son el promedio de los resultados obtenidos en cada experimento en donde se combinó el tamaño de partícula (M5, M10 y M17) con las tres distancias consideradas (7, 10 y 13 cm) en cada período de precultivo. Cabe mencionar que se indican solamente los promedios, ya que los resultados para cada experimento independiente fueron muy similares.

Se puede apreciar de manera general, que cuando los explantes se precultivan por menos tiempo, el daño por necrosamiento se incrementa respecto al causado cuando se precultivaron por 6 días (Cuadro 1); este efecto se observó principalmente en el cv. Harman. La respuesta morfogénica de los explantes sobrevivientes, a excepción

del porcentaje de explantes con callo (es decir, explantes con brotes y brotes por explante), también se afectó en los períodos de 1 y 6 días; por lo que se estimó, que un precultivo de 3 días previo al bombardeo en ambos cultivares, era conveniente para este caso en particular.

**CUADRO 1.** Respuesta morfogénica de explantes de hoja de *Dendrathera grandiflorum* cvs. Harman (H) y Tikara (T) a diferentes condiciones de bombardeo y período de precultivo.

Días de pre incubación	Explantes necrosados (%)		Explantes con callo (%)		Explantes con brotes (%)		Brotes por explante	
	H	T	H	T	H	T	H	T
1	9.9	6.8	99.7	99.4	0.5	39.2	1	2
3	7.0	4.0	98.7	95.2	6.6	50.3	1.6	4.3
6	2.0	2.2	93.5	94.8	1.3	40.6	1	3
Testigo	0.5	0.0	100	100	40	54	2	3

Este período coincide con el que autores como Laparra *et al.* (1995) trabajando en girasol y Gallo e Irvine (1993) en caña de azúcar, consideran como óptimo. La respuesta al bombardeo en los tres períodos de precultivo, reflejada en el porcentaje de explantes necrosados y con callo es muy similar; pero hubo una notable diferencia en el porcentaje de explantes con brotes, en donde el cv. Tikara respondió de mejor manera que el cv. Harman. Es posible que esta respuesta, esté relacionada con el efecto del agua de coco adicionada al medio MS2. Para este trabajo en particular, se consideró factible su uso, dado que incrementó considerablemente los porcentajes de brotación; condición indispensable para ampliar las posibilidades de éxito en cualquier trabajo de transformación genética en donde se pretenda obtener plantas transgénicas. Sin embargo, valdría la pena ensayar su efecto también en el cultivar Harman, con la finalidad de incrementar la cantidad de brotes adventicios.

Los resultados obtenidos al evaluar los diferentes experimentos diseñados para determinar las condiciones apropiadas para obtener transformantes con el plásmido pBI<sub>121</sub> a partir de explantes del cv. Tikara, se muestran en el Cuadro 2.

Para cada una de las respuestas morfogénicas (porcentaje de explantes con brotes, porcentaje de brotes con explantes y número de brotes totales) mostradas en este Cuadro, se realizó una prueba de X<sup>2</sup> para probar la hipótesis de independencia del efecto de las distancias del bombardeo y del diámetro de las partículas.

**CUADRO 2.** Respuesta de explantes de hoja de *Dendratheum grandiflorum* cv. Tikara bombardeados con tres diferentes diámetros de partículas de tungsteno (M5, 10 y 17, respectivamente a: 0.4, 0.7 y 1.1  $\mu\text{m}$ ) y tres distancias de bombardeo (D7, 10 y 13, respectivamente a: 7, 10 y 13 cm).

Tratamiento	Explantes con brotes (%)	Brotes por explante (%)	Brotes totales	Expresión GUS
M 5 - D7	37.8	5.5	207.9	No
M 5 - D10	51.4	3.0	154.2	No
M 5 - D13	35.0	3.0	105.0	No
M 10 - D7	30.8	2.0	61.60	No
M 10 - D10	25.0	2.0	50.40	Si
M 10 - D13	33.3	3.0	99.90	No
M 17 - D7	13.9	3.0	41.70	No
M 17 - D10	54.3	5.5	298.7	No
M 17 - D13	12.5	2.0	25.0	No
Testigo	54.0	3.0	162.0	No

Para el caso del porcentaje de explantes con brotes, la  $H_0$  fue rechazada con  $P \leq 0.05$ ; lo que indica que esta repuesta depende de la distancia y del diámetro del microproyector utilizado. Para el caso de el porcentaje de brotes por explante, la  $H_0$  fue aceptada con  $P \leq 0.05$ ; lo que significa que tanto las diferentes distancias de bombardeo como el diámetro de los microproyectiles es independiente para esta respuesta; y finalmente, para el número de brotes totales por explante, la  $H_0$  fue rechazada con el mismo nivel de probabilidad; indicando que el número de brotes totales depende de la distancia y del tamaño de la micropartícula bombardeada, tal como en el primer caso. En aquellas respuestas por parte de los explantes, en donde fue rechazada la  $H_0$ , se realizó una prueba de homogeneidad con la finalidad de estimar la combinación más apropiada para la mejor respuesta en cada caso. Para el porcentaje de explantes con brotes se comparó el efecto de D7 vs D10, D10 vs D13 y D7 vs D13; en las dos primeras comparaciones la  $H_0$  fue rechazada con  $P \leq 0.05$ , lo que sugiere que existe diferencia en la respuesta respecto a estas dos distancias; mientras que D7 vs D13 no tienen ningún efecto; es decir, para este caso la  $H_0$  no se rechazó. Al comparar el efecto por el diámetro del microproyector, se establecieron las comparaciones M5 vs M10, M5 vs M17 y M10 vs M17 y la  $H_0$  fue rechazada, solo para el caso M5 vs M17, lo que indica que efectivamente el diámetro de estas dos micropartículas afecta de manera diferente el porcentaje de explantes con brotes.

Las pruebas estadísticas realizadas con los valores del número de brotes totales, en donde la  $H_0$  también indicó que el efecto de las distancias y del diámetro de las partículas no son independientes; se encontró que las comparaciones entre D7 vs D10; D7 vs D13 y D10 vs D13, el efecto que cada distancia ocasiona sobre esta respuesta es diferente; ya que las  $H_0$  de cada comparación fue

rechazada con  $P \leq 0.05$ . Al comparar para este caso el efecto del diámetro de los microproyectiles (M5 vs M10; M5 vs M17 y M10 vs M17), las  $H_0$  respectivas, fueron también rechazadas, lo que indicó que el diámetro influye en el número de brotes totales. Estos resultados, concuerdan claramente con las observaciones de Klein *et al.* (1988a), Klein y Maliga, (1991); Russell (1993), en el sentido de que el daño ocasionado en el tejido esta en función directa del tamaño de la micropartícula utilizada y de la distancia de bombardeo, entre otros (Klein *et al.*, 1988a; Klein y Maliga, 1991; Russell).

Comparando la respuesta morfogénica de los tratamientos bombardeados con pBI<sub>121</sub> respecto a la obtenida con los testigos (bombardeados, pero sin el plásmido), se observó una tendencia general de mayor efecto (daño) en los tratamientos experimentales. No se consideró necesario mostrar todos los resultados correspondientes a los testigos, porque el objetivo principal era determinar los parámetros más apropiados para obtener transformantes; y estos de obtuvieron al utilizar la micropartícula M10 con D10 (Cuadro 2), puesto que fue la única combinación que permitió observar la expresión de GUS; respuesta indicativa de que hubo transformación con el plásmido (transformación transitoria).

Con la finalidad de obtener una respuesta morfogénica más eficiente para el crisantemo en experimentos de este tipo, sería conveniente considerar otro tipo de explantes. Se ha reportado, que si el explante proviene de tallo, se incrementa considerablemente la diferenciación de brotes adventicios (Augé *et al.*, 1984). Esta observación, podría ser de mucha utilidad al intentar transformar nuevamente el cv. Tikara; ya que se podían incrementar las posibilidades de obtener brotes transformados de manera estable y por lo tanto, plantas transgénicas.

El ensayo histoquímico realizado en el 10 % de los explantes tres días después del bombardeo, reveló expresión transitoria en el tratamiento M10 (0.7 mm) y distancia de bombardeo de 10 cm (Cuadro 2). El hecho de que sólo se lograra observar expresión transitoria en un tratamiento, quedó explicado en parte por el análisis estadístico realizado, en donde se encontró que a esa distancia y con ese diámetro de microproyector es posible transformar genéticamente células de crisantemo. Aunado a lo anterior, se ha reportado que los ensayos histoquímicos para la detección del gen GUS son poco sensibles y la detección de las células que expresan el gen no pueden ser reveladas claramente (Franks y Birch, 1991); tal como se aprecia en la Figura 1. Por otra parte, es importante tomar en cuenta que la expresión transitoria solo se analizó en el 10 % de los explantes y; además, los tratamientos en los que se presentan mayores índices de expresión transitoria, no necesariamente corresponden a los que generan transformantes estables.

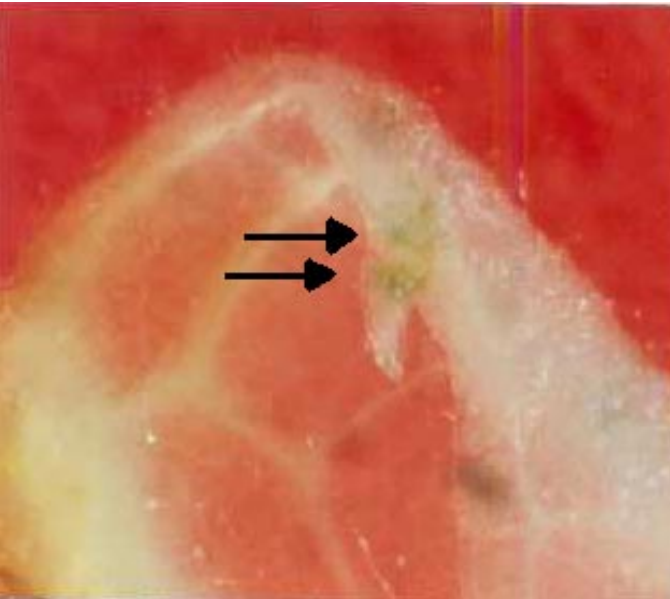


Figura 1. Expresión transitoria del gen GUS en explantes de hoja de *Dendrathera grandiflorum* cv. Tikara precultivados tres días y bombardeados con partículas de tungsteno de 0.7 mm de diámetro a una distancia de 10 cm. Las flechas señalan los puntos azules que caracterizan la expresión de la enzima.

Sin embargo, aun cuando fue posible detectar expresión transitoria, los explantes mantenidos en medio selectivo durante 50 días, no mostraron ninguna evidencia genética de la inserción del plásmido pBI<sub>121</sub>. En el Cuadro 3 se indica el comportamiento de los explantes bombardeados con plásmido y sin plásmido en el medio selectivo. Como se puede notar, los explantes bombardeados sin ADN fueron más sensibles al medio selectivo; en comparación a los bombardeados con ADN; sin embargo, con el paso del tiempo se detuvo totalmente el crecimiento de todos los callos y se presentó la muerte de todos los brotes. De los callos que sobrevivieron más tiempo, se obtuvo ADN y se hizo una prueba molecular para la detección del gen de kanamicina, con una sonda marcada con digoxigenina hecha a partir del mismo plásmido pBI<sub>121</sub> y los resultados fueron negativos; es decir, no se detectó el ADN que supuestamente se había transferido mediante el bombardeo. Se pueden considerar varias razones por las cuales este resultado fue negativo; normalmente, los tejidos transformados, deben ser transferidos a los medios selectivos con la finalidad de forzar a las células que hayan adquirido la información a expresarla y a mantenerla; ya que existen mecanismos de reparación celular que pueden escindir el ADN insertado si no está bajo presión. En este caso particular, se creyó conveniente dar un período de recuperación a los explantes después del bombardeo; pero al parecer fue prolongado

CUADRO 3. Respuesta de explantes de hoja de *Dendrathera grandiflorum* variedad Tikara en medio selectivo, evaluada a los 50 días del bombardeo.

Concentración de kanamicina (mg·litro <sup>-1</sup> )	Explantes con callo (%)		Explantes con brotes (%)		Brotes por explante	
	C/P	S/P	C/P	S/P	C/P	S/P
0	0.0	49.9	0.0	50.9	0.0	3.3
15	50.9	20.2	41.4	16.1	3.5	3.2

C/P: con el plásmido pBI<sub>121</sub>, S/P: sin plásmido

En segundo lugar, es posible que la detección no se haya evidenciado, porque en el ADN obtenido a partir de esos explantes, existían muy pocas copias del ADN proveniente de las células transformadas; y dado que este sistema de detección no es muy sensible, esa haya sido una de las causas por las cuales nuestro resultado en este caso fue negativo. Otra explicación está relacionada con la formación de una capa corchosa en la base del callo que puede actuar como aislante del antibiótico presente en el medio, razón por la cual estos callos hayan sobrevivido en el medio selectivo. Otra posible causa es mencionada por Stiff *et al.* (1995) quienes haciendo transformación en cebada reportaron que aproximadamente el 80 % de los callos recobrados en medio selectivo, no tenían insertado el gen de resistencia; y que es factible que las células transformadas, lograran detoxificar al medio permitiendo que otros tejidos cercanos no transformados sobrevivieran.

CONCLUSIONES

La serie de evaluaciones realizadas para definir los parámetros de transformación genética con un gen reportero en *D. grandiflorum*, permitieron lograr expresión transitoria al menos en uno de los tratamiento. Lo anterior indica que es factible obtener células transformadas con el sistema de biobalística utilizado. Aún cuando los resultados obtenidos fueron pocos, respecto a la expresión transitoria, indicaron la posibilidad de obtener transformantes en el cultivar Tikara, lo que significa que es factible regenerar y diferenciar transformantes con estas condiciones experimentales para la obtención de plantas transgénicas de esta especie.

LITERATURA CITADA

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. 1983. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc. New York, USA. pp. 543-596.

AUGÉ, R.; BEAUCHESNE, G.; BOCCON-GIBOD, J.; DECOURTYE, L.; DIGAT, B.; CL-GALANDRIN, J.; MINIER, R.; MORAND, J.-CL.; H. VIDALIE. 1984. Cultivo *in vitro*. Ed. Científica S.A de C.V. 1ª. Ed. en español. D. F., México.190 p.

BOWER, R.; BIRCH, R. G. 1992. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. Plant Journal 2: 409-416.

- BIRCH, R. G. 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 297-326.
- CHI, G. L.; GOH, H. K. L.; HOO, K. Y.; LEGAVRE, T.; DREW, R. A.. 1998. Gus gene expression in *Anthurium andreaeanum*, *Onbidium Gower Ramsey* and *Brassolaeliocattleya Orange Glory Empress* after particle bombardment. *Acta Horticulturae* 461: 379-383.
- DALE, P. J.; IRWIN, J. A.; SCHEFFLER, J. A.. 1993. Review. The experimental and commercial release of transgenic crop plants. *Plant Breeding* 111: 1-22.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- FRANKS, T.; BIRCH, R. G. 1991. Microprojectile techniques for direct gene transfer into intact plant cells, pp. 103-127. *In: Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology.* R. D. Murray (ed) Ed. C. A. B. International. Sydney, Australia.
- GORDON-KAMM, W. J.; SPENCER, T. M.; MANGANO, M. L.; ADAMS, T. R.; DAINES, R. J.; START, W.; O'BRIEN, J. V.; CHAMBERS, S. A.; ADAMS JR., W. R.; WILLETS N. G.; RICE, T. B.; MACKAY, C. J.; KRUEGER, R. W.; KAUSCH, A. P.; LEMAUX, P. G. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2: 603-618.
- GALLO-MEAGHER M.; IRVINE, J. E. 1993. Effects of tissue type and promoter strength on transient GUS expression in sugarcane following particle bombardment. *Plant Cell Reports* 12: 666-670.
- HAZEL, C. B.; KLEIN, T. M.; ANIS, M.; WILDE, H. D.; PARROTT, W. A. 1998. Growth characteristics and transformability of soybean embryogenic cultures. *Plant Cell Reports* 17(10): 765-772.
- JOHNSTON, S. A. 1990. Biolistic transformation: microbes to mice. *Nature* 346: 776-781.
- KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANFORD, J. C. 1987. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70-73.
- KLEIN, T. M.; MALIGA, P. 1991. Plant transformation by particle bombardment, pp. 105-117. *In: Biotechnology for Biological Control of Pest and Vectors.* Maramorosch, Karl (ed.). CRP Press. Florida, USA.
- KLEIN, T. M.; GRADZIEL, T.; FROMM, M. E.; SANFORD, J. C. 1988a. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. *Bio/Technology* 6: 559-563.
- KLEIN, T. M.; HARPER, E. C.; SVAB, Z.; SANFORD, J. C.; FROMM, M. E.; MALIGA, P. 1988b. Stable genetic transformation on intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85: 8502-8505.
- LAPARRA, H.; BURRUS, M.; HUNOLD, R.; BAMN, B.; BRAVO-ANGEL, A.; BRONNER, R.; HAHNE, G. 1995. Expression of foreign genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) – evaluation of three gene transfer methods. *Euphytica* 85: 63-74.
- MCCABE, D. E.; SWAIN, W. F.; MARTINELL, B. J.; CHRISTOU, P. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6: 923-926.
- MORIKAWA, H.; IIDA, A.; YAMADA, Y. 1989. Transient expression of foreign genes in plant cells and tissues obtained by a simple biolistic device (particle gun). *Bio/Technology* 31: 320-325.
- MORRISH, F.; SONGSTAD, D. D.; ARMSTRONG, C. L.; FROMM, M. 1993. Microprojectile bombardment: A method for the production of transgenic cereal crop plants and the functional analysis of genes, pp. 133-171. *In: Transgenic Plants: Fundamentals and Applications.* A. Hiatt (ed.). Ed. Marcel Dekker Inc. New York, USA.
- MITYUSHKINA, T. Y.; DOLGOV, S. V.; VAINSTEIN, A.; WEISS, D. 1995. Regeneration from leaf disks of *Crysanthemum morifolium* Ramat. *Acta Horticulturae* 420: 112-114.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, D. F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- NALEWAY, J. J. 1992. Histochemical, spectrophotometric, and fluorometric GUS substrate, pp. 61-76. *In: GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gen Expression.* S. R. Gallagher (ed). Ed. Academic Press Inc. San Diego, California, USA.
- OARD, J. H.; PAIGE, D. F.; SIMMONDS, J. A.; GRADZIEL, T. M. 1990. Transient gene expression in maize rice and wheat cells using an airgun apparatus. *Plant Physiology* 92: 334 – 339.
- RUSSELL, K. J. 1993. The biolistic ® PDS-1000/he device. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 33: 221-226.
- STIFF, C. M.; KILIAN, A.; ZHOU, H.; KUDRNA, D. A.; KLEINHOKS, A. 1995. Stable transformation of barley callus using biolistic ® particle bombardment and the phosphinothricin acetyltransferase (bar) gene. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 40: 243-248.
- VARSHA, R. L.; DUBEY, R. K.; SIRIVASTAVA, A. K.; KUMAR, S. 1997. Microprojectile mediated plant transformation: A bibliographic search. *Euphytica* 95: 269-294.
- WANG, J.; SHI, H. Z.; ZHOU, C.; YANG, H. Y.; ZHANG, X. L.; ZHANG, R. D. 1988. Beta-glucuronidase gene and green fluorescent protein gene expression in de-exined pollen of *Nicotiana tabacum* by microprojectile bombardment. *Sexual Plant Reproduction* 11(3): 159-162.