

Optimización de las condiciones de biobalística de baja presión para análisis de expresión transitoria de genes heterólogos en hojas de tabaco cultivadas in vitro

Optimization of low pressure biobalistics conditions for analysis of transient expression of heterologous gene in tobacco leaves tobacco cultivated in vitro

Juan Carlos Vaca-Vaca, Andrea Jimena Pulido-Rendón y Karina López-López

Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 237. Palmira, Valle del Cauca, Colombia. Autor para correspondencia: klopezl@unal.edu.co

Rec.: 07.06.2014 Acep.: 22.10.2014

Resumen

Los estudios de expresión transitoria de genes heterólogos de interés biotecnológico son un paso previo a su expresión estable en plantas transgénicas. El objetivo del trabajo fue optimizar las condiciones de biobalística para realizar ensayos de expresión transitoria de genes heterólogos en *Nicotiana tabacum* variedad Xanthi (tabaco) utilizando la pistola de genes de baja presión Helios[®] Gene Gun (BioRad[®]). Como gen heterólogo se utilizó al promotor 35S de CaMV fusionado al gen *uidA* (GUS) clonado en el vector pBI121. Las condiciones evaluadas fueron: presión de disparo, número de disparos y distancia de disparo sobre discos de hojas u hojas completas de tabaco cultivadas in vitro. La expresión de GUS se evaluó como el promedio del número de puntos azules observados en los tejidos bombardeados. Únicamente se consideraron puntos azules cuando se utilizaron hojas completas de tabaco. Se observó un mayor número de puntos azules cuando se empleó una presión de 160 psi, cuatro disparos y un bombardeo directo sobre hojas completas. Para confirmar las condiciones obtenidas se utilizó el vector pCAMBIA 1305.2, observándose un alto número de puntos azules en los tejidos bombardeados, indicativo de la eficiencia de las condiciones optimizadas en el presente trabajo.

Palabras clave: β -Glucuronidasa, expresión transitoria, Helios[®] Gene Gun System, Geminivirus

Abstract

Transient expression studies of heterologous genes with biotechnological interest are a prerequisite to its stable expression in transgenic plants. The aim of this research was to optimized the biobalistic conditions for testing transient expression of heterologous genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*–Xanthi) using the low pressure Helios[®] Gene Gun System (Biorad[®]). As heterologous gene construction was used CaMV 35S promoter fused to the *uidA* (GUS) gene cloned into the vector pBI121. The optimized conditions were: shot pressure, number of shots and shooting distance of leaf fragments or full sheets of tobacco. GUS expression was evaluated by average number of the blue dots observed on plant tissues already bombarded. Only blue dots were observed when whole leaves tobacco were used. A great deal of blue spots was observed using the following conditions: a pressure of 160 psi, 4 shots and 0 cm on whole sheets. In order to confirm the conditions earlier obtained, the pCAMBIA 1305.2 vector was employed in this experiment. Higher numbers of blue points were observed in tissues previously bombarded; those were as an indicative of the efficiency experimental conditions earlier optimized.

Key words: β - Glucuronidase, transient expression, Helios[®] Gene Gun System, Geminivirus.

Introducción

La transferencia de DNA hacia células o tejidos vegetales se realiza a través de diferentes mecanismos, siendo uno de los más comunes la utilización de vectores biológicos como *Agrobacterium tumefaciens* (Hodson, 2005). Sin embargo, el rango natural de hospederos de esta bacteria constituye un factor limitante, ya que no todas las especies vegetales son susceptibles de ser infectadas. En consecuencia, se han desarrollado métodos de transferencia directa de DNA como la biobalística que permite transferir DNA desnudo sin mediación de vectores biológicos a diferentes células y tejidos blanco (Voinnet *et al.*, 2003).

La técnica de biobalística se basa en el bombardeo de micro-partículas de oro o tungsteno que son impulsadas a gran velocidad por liberación de He o N₂ a gran presión y en condiciones previamente establecidas como presión de disparo, distancia de disparo, cantidad de DNA, entre otras. La biobalística es aplicable en bacterias, protozoarios, algas, hongos, plantas (monocotiledóneas, dicotiledóneas), células y tejidos animales (insectos, peces, aves y mamíferos) (Sanford, 1988; Hodson, 2005). Adicionalmente, esta técnica es considerada entre las estrategias que permiten transformar organelos celulares como mitocondrias y cloroplastos de modo reproducible (Shark *et al.*, 1991; Liu Clarke y Daniell, 2011).

La pistola de genes de baja presión Helios® Gene Gun System (BioRad®) es una herramienta en biobalística útil para la transformación in vivo e in vitro de células. Esta pistola ofrece una gran ventaja al ser portátil, ya que es posible utilizarla en laboratorio o en campo, es altamente reproducible y requiere poca cantidad de DNA, en contraste con otros equipos como PDS-1000/He donde el tejido blanco a transformar está limitado por el tamaño de la cámara y el tejido diana debe ser sometido a un vacío durante los bombardeos (Manual BioRad®).

Entre las aplicaciones del método de biobalística se encuentran la expresión transitoria de genes heterólogos de interés biotecnológico, estudios de vías metabólicas, transferencia de RNA viral y expresión esta-

ble en plantas transgénicas (Meissner *et al.*, 2001; Sudowe y Reske-Kunz, 2013). Existen pocos reportes donde se utilice la pistola de genes de baja presión (Helios® Gene Gun, BioRad®) para realizar ensayos de expresión transitoria de genes heterólogos, por tanto disponer de las condiciones óptimas de inoculación en plantas de tabaco es un paso clave en ensayos de este tipo (Boletín 2453 BioRad®; Kuriakose *et al.*, 2011). El objetivo del presente trabajo fue evaluar las condiciones óptimas de biobalística para realizar ensayos de expresión transitoria de genes heterólogos en *Nicotiana tabacum* variedad Xanthi (tabaco) utilizando la pistola de genes de baja presión Helios® Gene Gun System (BioRad®). Para la optimización de las condiciones de inoculación se tuvieron en cuenta los parámetros: presión de disparo (psi), número de disparos y distancia de disparo, debido a que estos tienen alta influencia e importancia en el éxito de transferencia de DNA mediante la técnica de biobalística (Chávez-Camacho *et al.*, 2002). Los ensayos se realizaron con micro-partículas de oro, ya que éstas presentan inercia química, ausencia de reactividad con el DNA y otros componentes de la mezcla de reacción y baja toxicidad para las células vegetales (Valerio y García, 2008).

Materiales y métodos

Multiplicación y preparación del material vegetal. Los ensayos fueron realizados empleando tejido foliar de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) provenientes de semillas germinadas in vitro en medio MS (Murashige & Skoog, 1962), siguiendo el protocolo descrito por Badillo *et al.* (2009). Las condiciones de incubación en el cuarto de crecimiento fueron: temperatura de 24°C, humedad relativa de 70% y fotoperiodo de 16/8 (horas luz/horas oscuridad). Para los ensayos de biobalística se seleccionaron plántulas de tabaco de 45 días posteriores a su germinación. Se utilizaron dos tipos de material vegetal: (1) discos de hojas obtenidos por cortes de fragmentos de tejido foliar de plantas de tabaco cultivadas in vitro con un área aproximada de 1 cm² que fueron colocados formando un círculo de 5 cm de

diámetro sobre medio sólido MS con manitol 0.4 M y sorbitol 0.4 M en caja de Petri; y (2) hojas completas cerca al ápice caulinar bombardeadas directamente en plantas de tabaco cultivadas in vitro.

Plásmidos. En los ensayos de optimización de la técnica de biobalística de baja presión se utilizó el plásmido pBI121 (Invitrogen®). Este plásmido porta el gen *uidA* que codifica para la enzima β -Glucuronidasa (GUS) bajo el control del promotor del gen 35S del *Virus del mosaico de la coliflor* (CaMV) (Jefferson *et al.*, 1986). Para confirmar las condiciones de optimización del protocolo de biobalística, previamente establecidas con el plásmido pBI121, se utilizó el plásmido pCAMBIA1305.2 (Canberra, Australia), que porta el promotor 35S de CaMV fusionado al gen GUSPlus, gen reportero aislado de *Staphylococcus* sp. y que ha sido modificado en la optimización de uso de codones para su expresión en plantas (Broothaerts *et al.*, 2005). La multiplicación de los plásmidos pBI121 y pCAMBIA 1305.2 se realizó en *Escherichia coli* (DH5 α rec-), para lo cual se hizo una transformación por choque térmico (Ausubel *et al.*, 1999) y para la purificación de ambos plásmidos se utilizó el Plasmid Midi Kit (Qiagen®).

Parámetros de inoculación de biobalística. Los parámetros evaluados en discos de hoja fueron: presión de helio (100, 140, 150, 160, 180, 200, 220, 250, 300, 400 y 500 psi); distancia de disparo (10 y 15 cm) y número de disparos (2, 3 y 4). Los parámetros evaluados en hojas completas fueron: presión de helio (100, 140, 160, 180 y 200 psi); número de disparos (2, 3 y 4) y presencia/ausencia de difusor (accesorio que porta el equipo de biobalística de baja presión Helios® Gene Gun System, BioRad®).

Los parámetros que se conservaron constantes fueron la concentración de DNA plasmídico (1 μ g/cartucho), concentración de PVP (0.05 mg/ml), cantidad de oro (0.125 mg/por cartucho) y diámetro de la partícula de oro (0.6 μ m), los cuales se seleccionaron de ensayos reportados por López-López *et al.* (2013), siguiendo las recomendaciones del fabricante del equipo de Biobalística (BioRad®).

Preparación de micropartículas y cartuchos con DNA plasmídico: El DNA plasmídico de alta pureza fue extraído de cultivos bacterianos de *E.coli* (DH5 α rec-) previamente transformadas con el plásmido pBI121 o pCAMBIA 1305.2. La preparación de las micropartículas de oro y de los cartuchos se realizó siguiendo tanto las recomendaciones e indicaciones del fabricante del equipo Helios® Gene Gun System (BioRad®) así como las modificaciones publicadas por López-López *et al.* (2013).

Ensayos de biobalística. Para estos ensayos se usó un equipo de baja presión, Helios® Gene Gun System (BioRad®), que emplea helio a presión para acelerar partículas metálicas (oro) recubiertas con los ácidos nucleicos. El bombardeo de las partículas recubiertas con el DNA de los plásmidos que portan el gen reportero *uidA* se realizó sobre discos de hojas ($\varnothing = 1 \text{ cm}^2$) colocados sobre medio MS en cajas de Petri, así como también se bombardearon in vivo hojas completas de plantas de tabaco cultivadas in vitro. Tanto los discos de hojas como las hojas completas de las plantas de tabaco bombardeadas fueron colocadas por 18 h en un cuarto de crecimiento con condiciones de temperatura y fotoperiodo controladas (25°C con un fotoperiodo 12/12 (horas luz/horas oscuridad) (Vaca-Vaca, 2003).

Tinción histoquímica para evaluar la actividad de la enzima GUS (β -glucuronidasa). Para evidenciar la expresión del gen reportero *uidA* en las hojas de tabaco bombardeados por biobalística se llevó a cabo un ensayo histoquímico siguiendo la metodología propuesta por Jefferson *et al.* (1987). Para ello, se incubaron a 37 °C durante 22h fragmentos de hojas en ausencia de luz en un buffer que contenía X-gluc (Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucurónico) (Fermentas®) como sustrato para la enzima β -glucuronidasa. Para eliminar los pigmentos de vegetales presentes en el material vegetal se evaluaron dos tipos de soluciones de lavado, una solución que contenía metanol:acetona (3:1) y una solución de etanol 70% v/v. Una vez el material vegetal fue completamente decolorado fue preservado a 4 °C en una solución de glicerol 50% v/v en placas de

cultivo celular fondo plano con tapa de baja vaporización (FALCON®) hasta su observación en un estereomicroscopio (Carl Zeiss).

Cuantificación de la expresión del gen reportero *uidA* (GUS). Para evaluar la expresión del gen reportero *uidA* se siguió la metodología propuesta por Ruiz-Medrano *et al.* (1999), consistente en contar el número de puntos azules presentes en los tejidos previamente bombardeados con los plásmidos que portan las construcciones con los genes heterólogos.

Análisis estadístico. Para discos de hoja se utilizó un diseño completamente al azar donde los tratamientos a evaluar fueron: presión de helio (100, 140, 150, 160, 180, 200, 220, 250, 300, 400 y 500 psi; distancia de disparo (10 y 15 cm) y número de disparos (2, 3 y 4). Se realizaron tres repeticiones por ensayo. Cada unidad experimental consistió en una caja de Petri con medio MS con fragmentos de hojas de tabaco (disco de hoja) y la variable de respuesta fue el número de puntos azules observados en los discos de hoja bombardeados con pBI121. Para hojas completas: (1) en el primer ensayo, inicialmente se utilizó un diseño totalmente al azar, donde los tratamientos a evaluar fueron: presión de helio (140, 160, 180 y 200 psi), número de disparos (2, 3 y 4) y solución para eliminar pigmentos (metanol:acetona, 3:1 y etanol 70% v/v). Se realizó una repetición por ensayo. Cada unidad experimental consistió en una hoja completa de tabaco cultivado in vitro y la variable de respuesta fue el número de puntos azules observados en las hojas bombardeadas con pBI121. (2) en el segundo ensayo se utilizó un diseño completamente al azar donde el tratamiento a evaluar fue la presión de helio (100, 140, 160 y 180 psi). Se realizaron tres repeticiones por ensayo y cada unidad experimental consistió en una hoja completa de tabaco cultivada in vitro y la variable de respuesta fue el número de puntos azules observados en las hojas bombardeadas con pBI121. (3) el tercer ensayo consistió en un diseño completamente al azar donde el tratamiento a evaluar fue la presencia/ausencia de difusor (accesorio que porta el equipo de biobalística de baja presión, Helios® Gene Gun System (BioRad®)).

Se realizaron tres repeticiones por ensayo y cada unidad experimental consistió en una hoja completa de tabaco cultivado in vitro y la variable de respuesta fue el número de puntos azules observados en las hojas bombardeadas con pCAMBIA 1305.2. Para todos los ensayos se calcularon los promedios del número de puntos azules obtenidos y la desviación estándar, siguiendo la metodología propuesta por Ruiz-Medrano *et al.* (1999) y Vaca-Vaca (2003).

Resultados y discusión

Presión, número y distancia de disparo en discos de hoja de tabaco. Los parámetros presión de disparo (psi) y distancia de disparo se evaluaron inicialmente sobre discos de hojas de tabaco, un material vegetal generalmente utilizado en ensayos de expresión transitoria (Denchev *et al.*, 1997; Ruiz-Medrano *et al.*, 1999; Vaca-Vaca, 2003; Kim *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2013). A presiones altas de bombardeo (250, 300, 400 y 500 psi) se observó que el impacto de las micropartículas de oro sobre el tejido vegetal fue muy fuerte, hasta el punto que ocasionó dispersión de los fragmentos de hoja por fuera de la caja Petri, impidiendo su evaluación por riesgo de contaminación. Con bajas presiones (100, 140, 150, 160, 180, 200 y 220 psi) a una distancia de 10 y 15 cm y dos, tres o cuatro disparos no se evidenció expresión del gen reportero *uidA* en el tejido vegetal bombardeado, es decir, no se presentaron puntos azules (n.p.). En la literatura se reportan resultados de expresión transitoria en fragmentos de tejido vegetal, pero únicamente utilizando la pistola de genes de alta presión PDS-1000 (Gallo-Meagher e Irvine, 1993; Boletín 1688 BioRad®) (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999); no obstante en las condiciones empleadas en el presente estudio, los discos de hoja de tabaco no constituyen el material vegetal óptimo para análisis de expresión transitoria utilizando la pistola de genes de baja presión Helios® Gene Gun System (BioRad®).

Presión, número y método de decoloración en hojas completas de tabaco. Los resultados de la evaluación preliminar de estas condiciones se incluyen en la Figura

1A, donde se observa que a una presión de 140 psi con dos, tres y cuatro disparos, el número de puntos azules encontrados por hoja fue 2, 4 y 19 respectivamente, cuando se utilizó etanol 70% (v/v), no obstante cuando se utilizó la mezcla metanol-acetona (3:1) el número de puntos disminuyó a 1, 2 y 9, respectivamente. Cuando se aplicó una presión de 160 psi con dos, tres y cuatro disparos se obtuvieron 3, 5 y 34 puntos azules, respectivamente, empleando etanol 70% (v/v); y cuando se empleó metanol-acetona (3:1) sólo se observaron dos puntos azules, independiente del número de disparos realizados (Figura 1B). Con

presiones de 180 y 200 psi sólo fue posible evaluar dos y tres disparos, ya que el tejido presentó daño mecánico, hecho que impidió realizar un nuevo disparo. A una presión de 180 psi con dos y tres disparos se hallaron 1 y 2 puntos azules, respectivamente, al utilizar metanol-acetona (3:1); y con el empleo de etanol 70% (v/v) se observaron dos puntos azules, independiente del número de disparos (Figura 1C). A una presión de 200 psi con dos disparos y empleando etanol 70% (v/v) se obtuvo sólo un punto azul y cuando se decoloró con la mezcla metanol-acetona (3:1) no se evidenciaron puntos azules (Figura 1D).

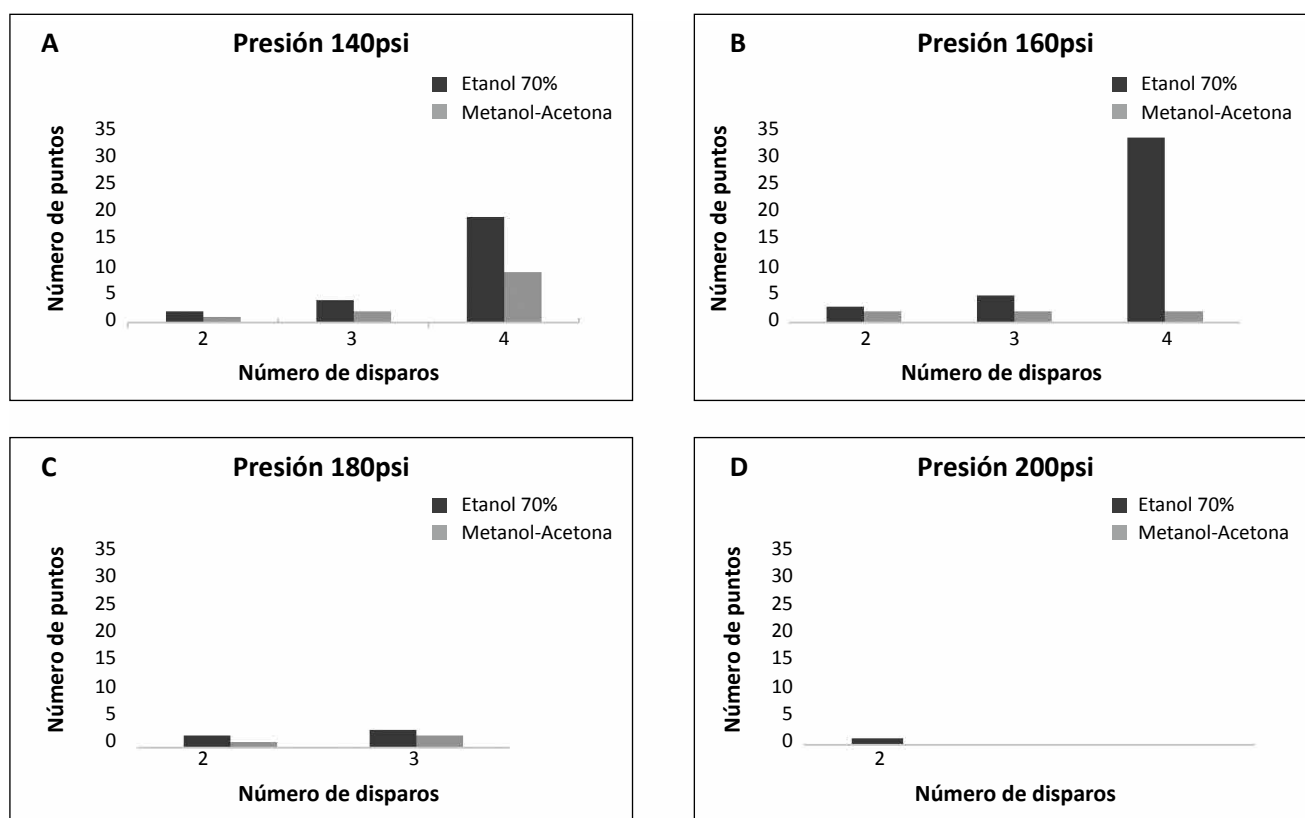


Figura 1. Número de puntos azules obtenidos en un ensayo preliminar de expresión transitoria en una hoja completa de *Nicotiana tabacum*. **A.** 140 psi, **B.** 160 psi, **C.** 180 psi y **D.** 200 psi. Se evaluaron los parámetros número de disparos (dos, tres y cuatro) y reactivo para eliminar clorofila [etanol 70% (v/v) o metanol-acetona (3:1)], empleando la pistola génica de baja presión Helios® Gene Gun System (BioRad®). Como gen heterólogo se utilizó el promotor 35S de CaMV fusionado al gen *uidA* clonado en el plásmido pBI121.

Por otra parte, cuando los disparos se incrementaron a presiones de 140 y 160 psi, el número de puntos azules observados fue mayor (Foto 1), debido a que se bombardeó

tejido foliar de *N. tabacum* con partículas de oro que contenían mayor cantidad de DNA plasmídico (López-López *et al.*, 2013). Los mejores resultados con las estrategias

metodológicas empleadas para eliminar los pigmentos vegetales en los tejidos bombardeados se obtuvieron al emplear lavados con etanol 70% (v/v) ya que el tejido vegetal reveló mayor grado de decoloración, hecho

que permitió evidenciar con mayor facilidad la expresión del gen reportero *uidA* (puntos azules), en comparación con los resultados obtenidos con la mezcla metanol-acetona (3:1) (n.p.).

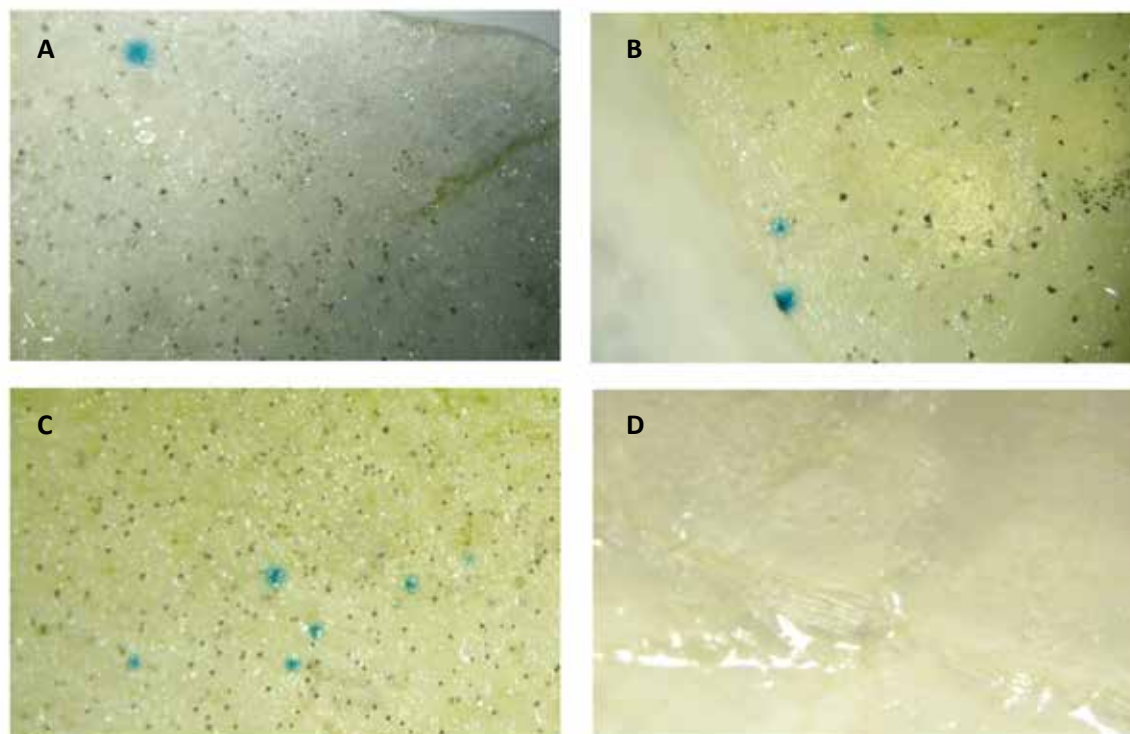


Foto 1. Evaluación del número de disparos en hojas de *Nicotiana tabacum*. **A.** Dos disparos. **B.** Tres disparos. **C.** Cuatro disparos. **D.** Tejido sin bombardear. Ensayo realizado a 140 psi sobre hojas completas de *N. tabacum* utilizando la pistola génica Helios® Gene Gun System (BioRad®) donde se analizó la expresión transitoria del promotor 35S de CaMV fusionado al gen *uidA* (pBI121). Se utilizó etanol 70% (v/v) para eliminar pigmentos de las hojas. Observación en estereoscopio Carl Zeiss a 5X

Presión de disparo en hojas completas de tabaco. En la Figura 2 y en la Foto 2 se observa que a una presión de helio de 160 psi se obtuvo un promedio de 16 puntos azules en hojas completas de tabaco, presión en la cual fue posible observar mayor expresión del gen reportero *uidA*, en comparación con presiones 100 y 140 psi, donde solamente se obtuvo un promedio de 4.6 y 8.6 puntos, respectivamente. El ensayo realizado a 180 psi no fue evaluado, debido al daño mecánico en la hoja. También se observa que en la medida que se incrementó la presión, se obtuvo un mayor número de puntos azules en los tejidos bombardeados, lo cual puede estar relacionado con el efecto directo que a una mayor presión

corresponde un mayor efecto de barrido de las micropartículas de oro adheridas al cartucho (López-López *et al.*, 2013); sin embargo, esto sólo es aplicable hasta una presión de 160 psi, porque presiones superiores ocasionaron daño mecánico del tejido vegetal.

Los resultados de este estudio contrastan con aquellos obtenidos en *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*, donde el mayor número de puntos azules se obtuvo a 75 y 200 psi, respectivamente (Boletín 2453 BioRad®). Esta diferencia en la presión de disparo óptima sobre hojas de *N. tabacum* se explica si se tiene en cuenta el método empleado para el crecimiento de las plantas; mientras en este trabajo de investigación se utilizaron plantas

de tabaco cultivadas in vitro, en el ensayo reportado en el Boletín 2453 BioRad[®] se emplearon plantas cultivadas en invernadero. Esta diferencia en el sistema de crecimiento ocasiona un espesor y rigidez variable en las hojas, lo que permite explicar la diferencia de presión óptima en cada experimento. Kuriakose *et al.* (2011) encontraron que la presión óptima de bombardeo en tejido foliar de plantas de rosales es 220 psi; presiones inferiores que 200 psi no mostraron expresión génica y presiones

superiores que 250 psi ocasionaron deterioro del tejido. Estos estudios permiten evidenciar que según el tipo de especie vegetal evaluada, los tejidos en las plantas difieren por sus características de espesor y de superficie, por lo que es importante optimizar las condiciones exigidas en cada especie. Así mismo, factores como la edad fenológica y el tamaño de la hoja pueden influir en la presión utilizada, explicando la diferencia de presiones óptimas en cada caso (Kuriakose *et al.*, 2011).

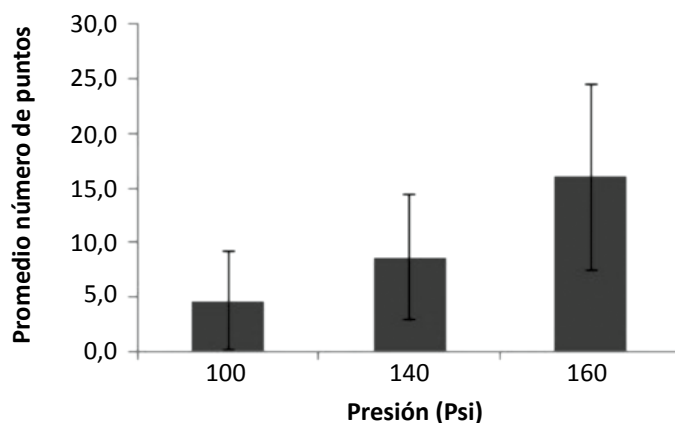


Figura 2. Promedio del número de puntos azules obtenidos en ensayos de expresión transitoria en hojas completas de *Nicotiana tabacum* cultivadas in vitro utilizando el promotor 35S de CaMV fusionado al gen *uidA* (pBI121) al evaluar tres presiones de disparo con la pistola génica Helios[®] Gene Gun System (BioRad[®]). Las barras de error representan la desviación estándar. Ensayo con tres repeticiones y una hoja completa como unidad experimental. Ensayo realizado con cuatro disparos y empleando etanol 70% (v/v) para decolorar.

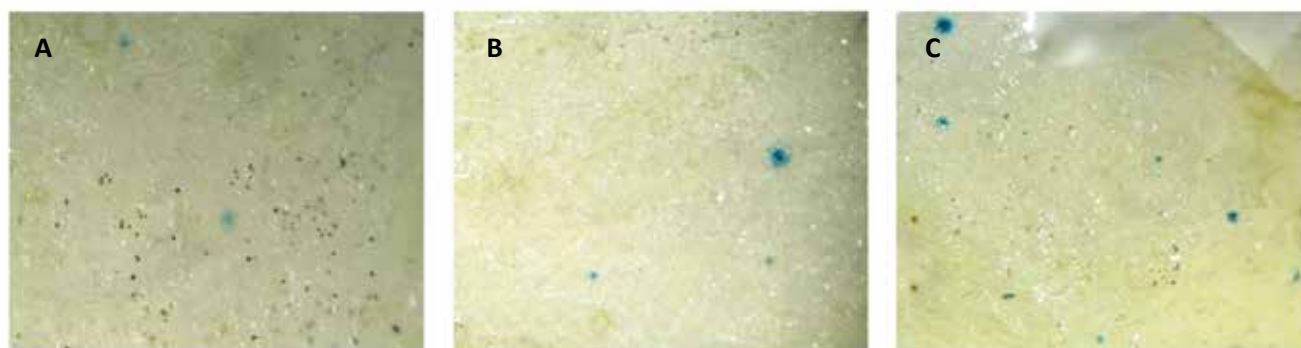


Foto 2. Evaluación de la presión de disparo (psi) de bombardeo en hojas de *Nicotiana tabacum*. **A.** 100 psi **B.** 140 psi. **C.** 160 psi en ensayos de expresión transitoria en hojas completas de *N. tabacum*, empleando el promotor 35S de *CaMV* fusionado al gen *uidA* (pBI121), con pistola génica Helios[®] Gene Gun System (BioRad[®]). Ensayo realizado con cuatro disparos y empleando etanol 70% (v/v) para decolorar. Observación en estereoscopio Carl Zeiss a 5X.

Condiciones óptimas de bombardeo en hojas de tabaco. Las condiciones de biobalística optimizadas previamente con el

vector pBI121: presión de helio de 160 psi, 4 disparos, etanol 70% (v/v) para decolorar y un bombardeo directo sobre hojas completas

de tabaco, fueron confirmadas empleando el vector pCAMBIA 1305.2, donde se observó un número alto de puntos azules en el tejido bombardeado (Foto 3). El alto promedio de puntos azules obtenidos con el vector pCAMBIA 1305.2 es explicable porque éste contiene un gen GUS mejorado, aislado de *Staphylococcus* sp., el cual ha sido modificado para optimizar la expresión en plantas, mientras que el gen GUS presente en el vector pBI121 es aislado de *Escherichia coli* (Jefferson *et al.*, 1986). Los beneficios de GUSPlus en comparación con el gen GUS

aislado de *E. coli* incluyen, coloración en menor tiempo al actuar con el sustrato X-Gluc, mayor estabilidad térmica y tolerancia a los fijadores (Vitha *et al.*, 1995). Los resultados de expresión transitoria obtenidos con el vector pCAMBIA 1305.2 permitieron conocer que las condiciones óptimas de la técnica de biobalística en hojas completas de *N. tabacum* son aplicables para otros plásmidos. Durante el ensayo de confirmación se evaluó una característica adicional que consistió en la presencia/ausencia de difusor en la pistola de genes Helios® Gene Gun System (BioRad®).

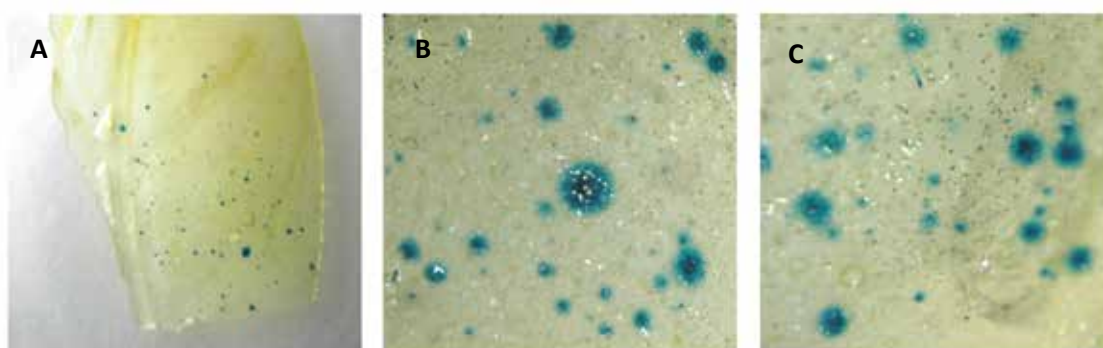


Foto 3. Confirmación de las condiciones de optimización de biobalística de baja presión para análisis de expresión transitoria en hojas completas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) utilizando el promotor 35S de CaMV fusionado al gen GUSPlus (pCAMBIA 1305.2). **A.** Resultados con presencia de difusor (observación a simple vista). **B.** Presencia de difusor. **C.** Ausencia de difusor. Ensayo realizado a una presión de helio de 160 psi, cuatro disparos y empleando etanol 70% (v/v) para decolorar. B y C son observaciones en estereomicroscopio Carl Zeiss a 5X

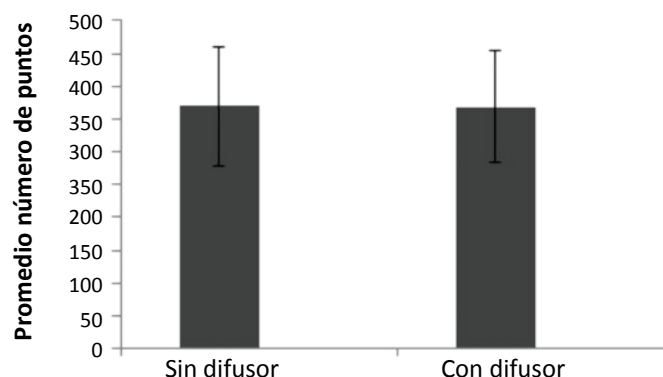


Figura 3. Promedio del número de puntos azules obtenidos en ensayos de expresión transitoria en hojas completas de *Nicotiana tabacum* utilizando el vector pCAMBIA 1305.2, al evaluar la presencia y ausencia del difusor en la pistola génica Helios® Gene Gun System (BioRad®). Las barras de error representan la desviación estándar. Ensayo con tres repeticiones y una hoja completa como unidad experimental. Ensayo realizado a una presión de helio de 160 psi, cuatro disparos y empleando etanol 70% (v/v) para decolorar.

En la Foto 3 y la Figura 3 se observa que no existen diferencias en el promedio del número de puntos azules obtenidos en el tejido foliar de *N. tabacum*. Estos resultados coinciden con estudios de expresión transitoria realizados en tejido foliar de *N. tabacum*, *Betula pendula* y *Arabidopsis thaliana* donde no se detectó incremento significativo de los niveles de expresión del gen reportero con el uso del difusor; no obstante se encontró que el uso de éste redujo el daño ocasionado en el tejido durante el bombardeo, lo cual permitió el manejo de mayores presiones durante el proceso de optimización (Boletín 2453 BioRad®).

Conclusiones

- En las condiciones del estudio, el empleo de discos de hojas de plantas de tabaco para realizar biobalística de baja presión utilizando la pistola de genes Helios® Gene Gun (Bio Rad®) no demostró ser un enfoque metodológico viable para medir la expresión transitoria de genes heterólogos.
- Las condiciones óptimas de biobalística de baja presión para evaluar la expresión transitoria del gen *uidA* (GUS y GUSplus) fusionado al promotor 35S de CaMV fueron estandarizadas sobre hojas completas de plantas de tabaco cultivadas in vitro, donde el mayor número de puntos azules (expresión de GUS) se obtiene aplicando cuatro disparos sobre las hojas, a una presión de 160 psi y utilizando etanol 70% (v/v) para eliminar los pigmentos.
- Los resultados obtenidos en esta investigación permiten plantear nuevos experimentos para evaluar la expresión transitoria de regiones regulatorias con valor biotecnológico fusionadas a genes reporteros, empleando la biobalística de baja presión Helios® Gene Gun System (BioRad®).

Agradecimientos

Este trabajo de investigación fue financiado con recursos de la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira (DIPAL) a través del proyecto

Evaluación Transitoria de Promotores Virales en Plantas de Tabaco, Código HERMES 18846, que resultó ganador dentro de la convocatoria del Programa Nacional de Proyectos para el Fortalecimiento de la Investigación, la Creación y la Innovación en Posgrados de la Universidad Nacional de Colombia, 2013-2015 Modalidad 3. Proyectos de Investigación, Creación o Innovación en Desarrollo.

Referencias

- Ausubel, F.; Brent, R.; y Kingston, R. 1999. Short protocols in Molecular Biology. Nueva York. 4ª. ed. v.1:1 - 30.
- Badillo, A.; Oliver, M.; Moreno, K.; Pacheco, V. y Cortés, H. 2009. Manual de laboratorio de cultivo de tejidos. Academia de Biotecnología. México.
- Optimization of biolistic transformation using the Helium-driven PDS-1000/He System. Bio-rad. Bol. 1688. p. 1 - 8.
- Boletín 2453 Bio-rad. 2008. Optimization of gene delivery into *Arabidopsis*, Tobacco and birch using the Helios Gen gun System. p. 1 - 6.
- Broothaerts, W.; Mitchell, H.; Weir, B.; Kaines, S.; Smith, L.; y Yang, W. 2005. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. Nature 433:629 - 633.
- Chávez-Camacho, M.; Valadez, M.; Carrillo, G.; y Lozoya, G. 2002. Expresión transitoria del gen de la *B*-Glucuronidasa y efecto del bombardeo en tejido de crisantemo (*Dendrathera grandiflorum*). Horticultura 8(1):107 - 121.
- Denchev, D.; Mcdaniel, J.; y Conger, B. 1997. Transgenic orchardgrass (*Dactylis glomerata*) plants by direct embryogenesis from microprojectile bombarded leaf cells. Plant Cell Rep. 16:813 - 819.
- Gallo-Meagher, M. e Irvine, J. 1993. Effects of tissue type and promoter strength on transient GUS expression in sugarcane following particle bombardment. Plant Cell Rep. 12:666 - 670.
- Gao, S.; Damaj, P.; Park, J.; Beyene, G.; y Buenrostro-Nava, M. 2013. Enhanced transgene expression in sugarcane by co expression encoded RNA silencing suppressors. Plos One 8(6):13.
- Hodson, E. 2005. Transformación genética de plantas para resistencia a virus. Acad. Col. Cien. 29(110):5 - 24.
- Jefferson, R. A.; Burgess, S. M.; y Hirsh, D. 1986. β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc. Nat. Acad. Sci. 83:8447 - 8451.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A.; y Bevan, M. W. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensi-

- tive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6(13):3901 - 3907.
- Kim, K.; Sunter, G.; Bisaro, M.; y Chung, S. 2007. Improved expression of recombinant GFP using a replicating vector based on *Beet curly top virus* in leaf-disks and infiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves. *Plant Mol. Biol.* 64:103 - 112.
- Kuriakose, B.; Du toit, E.; y Jordaan, A. 2011. Transient gene expression assays in rose tissues using a Bio-Rad Helios® hand-held Gene Gun. *J. Bot.* 78:307 - 311.
- Liu Clarke J. y Daniell H. 2011. Plastid biotechnology for crop production: present status and future perspectives. *Plant Mol. Biol.* 76:211 - 220.
- López-López, K.; Rodríguez-Mora, D.; y Vaca-Vaca, J. 2013. Optimización de las condiciones de inoculación por biobalística de un *Begomovirus* en tomate y tabaco. *Rev. Col. Biot.* 15(2):8 - 17.
- Meissner, P.; Kulangara, A.; Chatellard, P.; Friedrich, K.; y Wurm F. 2011. Transient gene expression: Recombinant protein production with suspension-adapted HEK293-EBNA Cells. *Biotech. Bioeng.* 75 (2):197 - 203.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Phys. Plant.* 15:473 - 497.
- Ruiz-Medrano, R.; Guevara-Gonzales, R.; Arguello-Astorga, G.; Monsalve-Fonnegra, Z.; Herrera-Estrella, L.; y Rivera-Bustamante, R. 1999. Identification of a sequence element involved in AC2-mediated transactivation of the *Pepper Huasteco Virus Coat Protein Gene*. *Virology* 253:162 - 169.
- Sanford, J. 1988. The biolistic process. *Trends Biotechnol.* 6:299 - 302.
- Shark, K.; Smith, F.; Harpending, P.; Rasmussen, J.; y Sanford, J. 1991. Biolistic transformation of a prokaryote, *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microb.* 57:480 - 485.
- Sudowe S. y Reske-Kunz A. B. 2013. Biolistic DNA Delivery, methods and protocols. Humana Press Springer. p. 411.
- Vaca-Vaca, J. 2003. Identificación y caracterización de elementos cis-regulatorios que contribuyen a la actividad del promotor del gen de la proteína de la cápside del *Virus huasteco* del Chile. Tesis Doctoral. Cinvestav-IPN. México. p. 243.
- Valerio, R. y García, E. 2008. Transformación genética de plátano (*Musa sp. cv. Hartón*) mediante biobalística aplicada a tejidos meristemáticos. *Interciencia* 33(3):225 - 231.
- Vitha, S.; Beneš, K.; Phillips, J.; y Gartland, K. 1995. Histochemical localization of β -Glucuronidase (GUS) reporter activity in plant tissues. *Meth. Mol. Biol.* 44:185 - 193.
- Voinnet, O.; Rivas, S.; Mestre, P.; y Baulcombe, D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal* 33(5):949 - 956.