

Factores que afectan la expresión transitoria del gen *GUS* en yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

Factors affecting the transient expression of gene *GUS* in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)

Edilene Ramírez*, Boris Szurek**, Camilo Ernesto Lopez Carrascal***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77063

RESUMEN

La expresión transitoria es una metodología ampliamente utilizada para el estudio de genes. Sin embargo, hasta la fecha no existe un reporte en donde se utilice esta técnica en hojas de yuca de plantas adultas. Por esta razón este trabajo se centró en la determinación de algunos parámetros críticos para la expresión transitoria del gen *GUS* en yuca como son: la metodología para introducir la bacteria, la cepa de *Agrobacterium*, el tiempo post-inoculación, la introducción del gen *VirG* y la expresión del gen *GUS* en algunas variedades de yuca. Los resultados indicaron niveles más altos de expresión del gen *GUS* entre 5-7 días post-inoculación (dpi), agroinfiltrando con la cepa GV3101 y un incremento en la virulencia de esta cepa mediante la introducción del gen *VirG*. Por último se observaron diferentes niveles de expresión del gen *GUS* entre las variedades de yuca evaluadas, lo que indica que el factor genético es clave en la eficiencia de la agroinfiltración en este cultivo.

Palabras clave: *Agrobacterium tumefaciens*, Beta-glucuronidasa, *VirG*, agroinfiltración, yuca.

ABSTRACT

Transient expression is a common technique used for the co-expression of proteins for a wide range of experiments in molecular biology. This technique has been frequently used for gene study in plant pathogen interaction and has proved to be versatile and effective. However, there are still few reports and sparse data for transient expression in cassava leaves from adult/mature plants. For this reason, in this study we evaluated some regards of transient expression for the gene *GUS* in cassava: bacteria introduction methods, type of *Agrobacterium* strains, time post-inoculation, introduction of gene *VirG* and *GUS* and their expression into different cassava varieties. The results show that *GUS* expression is more efficient between 5-7 days post-inoculation with the GV3101 strain, moreover the virulence of this strain increases with the *VirG* gene. Finally, we observed a range of *GUS* expression pattern between different cassava varieties, altogether showing that the genetic factor is important for an accurate and effective agroinfiltration in cassava.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, beta-glucuronidase, *VirG*, agroinfiltration, cassava.

Recibido: mayo 24 de 2018 **Aprobado:** noviembre 29 de 2018

* M.SC., Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Grupo Manihot Biotec Calle 30 N 45-03, Bogota, Colombia. eramirezv@unal.edu.co

** Ph.D., Résistance des Plantes aux Bioagresseurs (RPB). Institut de Recherche pour le Développement. 911, Av. Agropolis BP 64501. Montpellier, Francia. boris.szurek@ird.fr

*** Ph.D., Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Grupo Manihot Biotec Calle 30 N 45-03, Bogota, Colombia. Correspondencia: celopezc@unal.edu.co

INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia Euphorbiaceae, la cual se cultiva en regiones tropicales y subtropicales por el alto contenido de almidón en sus raíces (Ospina & Ceballos, 2012). Este almidón es usado como fuente de carbohidratos para la dieta humana, para la producción de bioetanol y en industrias como la textil, de alimentos y de combustible (FAO, 2017). La yuca se ha convertido en un cultivo básico para aproximadamente 800 millones de personas en países en vía de desarrollo (Rosenthal & Ort, 2011; FAO, 2017). Su importancia ha impulsado diferentes investigaciones encaminadas a dar luces sobre las bases moleculares que conduzcan al mejoramiento de este cultivo, reducir el ataque de patógenos ó mejorar las condiciones de su producción. De manera general, una de las técnicas que ha sido empleada para el estudio de la función de genes ha sido la expresión transitoria (Jelly *et al.*, 2014).

La expresión transitoria en plantas es una técnica utilizada para el estudio de localización subcelular de proteínas (Aung *et al.*, 2017; Cheng *et al.*, 2017), la función de promotores, silenciamiento de genes (Matsuo & Matsumura, 2017), la interacción proteína-proteína y la transducción de señales (Jelly *et al.*, 2014; Yasuda *et al.*, 2017). Comparada con la expresión estable, la expresión transitoria es un sistema rápido, sencillo y eficiente donde se puede obtener altos niveles de expresión de una proteína (Nanjareddy *et al.*, 2016).

Existen varios métodos para evaluar la expresión transitoria de un gen en una planta, como la transfección de cloroplastos (Luong *et al.*, 1995; Nanjareddy *et al.*, 2016), el bombardeo de partículas (Takemoto & Jones, 2014) y la expresión transitoria mediada por *Agrobacterium* (agroinfiltración) (Takemoto & Jones, 2014). Entre estos tres métodos la agroinfiltración es más sencilla por cuanto no requiere la preparación de protoplastos, como tampoco el uso de equipos costosos (pistola de biobalística ó electroporador). Además, permite realizar ensayos funcionales de genes con altos rendimientos y tiempos cortos comparada con la expresión estable (Kapila *et al.*, 1997).

La agroinfiltración consiste en el proceso de forzar el ingreso de una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* al interior de un tejido de la planta empleando una jeringa (Solliman *et al.*, 2017). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en diferentes estudios en un amplio número de especies de plantas, incluyendo papa (*Solanum tuberosum*) (Du *et al.*, 2014), Iridaceae (*Dierama erectum*) (Koetle *et al.*, 2017), lechuga

(*Lactuca sativa*) (Wroblewski *et al.*, 2005), uva (*Vitis vinifera*) (Jelly *et al.*, 2014), tomate (*Solanum lycopersicum*) (Chetty *et al.*, 2013), soya (*Glycine max*) (Li *et al.*, 2017), *Arabidopsis thaliana* (Lee & Yang, 2013), Fresa (*Fragaria × ananassa* Duch) (Cui *et al.*, 2017), entre otros. Estos estudios han demostrado que la expresión transitoria en plantas difiere entre monocotiledóneas y dicotiledóneas y que es afectada por el tejido de la planta, el plásmido y la compatibilidad hospederopatógeno (Shah *et al.*, 2013; Wroblewski *et al.*, 2005)

En yuca se han realizado algunos estudios para evaluar la expresión transitoria del gen *GUS* en embriones somáticos, empleando electroporación (Luong *et al.*, 1995) en protoplastos mediada por PEG (polietilenglicol) (Wu *et al.*, 2017) en hojas de plantas adultas mediante bombardeo de micropartículas (Franche *et al.*, 1991) y en hojas de plantas de yuca endurecidas (Díaz *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito un protocolo de agroinfiltración para plantas adultas. Este trabajo se centra en la optimización de algunos parámetros con el objetivo de mejorar la expresión del gen *GUS*, tales como el tiempo post - inoculación, el efecto de diferentes cepas de *Agrobacterium*, la introducción de un gen de virulencia y el efecto en diferentes variedades de yuca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal.

Se emplearon plantas cultivadas “*in vitro*” de la variedad MCOL1505 y plantas adultas de las variedades TMS60444, MCOL1505, MCOI2215, SG107-35, MTA1 y TMS30572. Tanto las plantas adultas como las plantas cultivadas “*in vitro*” fueron obtenidas de la colección de germoplasma del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Plantas cultivadas *in vitro* de un mes o con mínimo cuatro entrenudos se transfirieron a suelo y se mantuvieron en el invernadero de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. La temperatura del invernadero durante el día osciló entre 28-35 °C y durante la noche entre 22-27 °C. La humedad se mantuvo alrededor de 70% y con un fotoperíodo de 12 h luz/ 12h oscuridad. Las plantas permanecieron en bandejas con agua para permitir la continua disponibilidad de humedad.

Cepas de *Agrobacterium tumefaciens*.

Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas fueron GV3101, AGL1, EHA105 y C58C1 (Tabla 1). Para cada una de estas cepas se prepararon células competentes empleando la metodología descrita por Zottini *et*

Tabla 1. Detalles de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* empleadas

Cepa de <i>Agrobacterium</i>	Plásmido Ti	Opina	Gen Marcador
AGL1	pTiBo542DT-ADN	Succinamopina	Rifampicina, Carbenicilina
EHA105	pEHA105 (pTiBo542DT-ADN)	succinamopina	Rifampicina
GV3101	Curada	Nopalina	Rifampicina
C58C1	Curada	Nopalina	Rifampicina

al., (2008). Las cepas fueron electroporadas con el plásmido pCambia1305.2 (Canberra, Australia), el cual contiene el gen *gusPlus* en el ADN-T interrumpido por un intrón de catalasa, con el objeto de evaluar la expresión del gen producido por la planta. La selección se realizó en medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, agar 15 g/L) utilizando los antibióticos para cada cepa (tabla 1) y kanamicina (50 µg/mL) para la selección del plásmido.

Cultivo de *Agrobacterium*.

De cada una de las cepas de *Agrobacterium* se tomó una colonia, se inoculó en medio LB con rifampicina a 100 µg/mL, kanamicina a 50 µg/mL y se incubó a 28 °C y 250 rpm en oscuridad hasta que alcanzó una DO_{600nm} : 0,8 ó 1,0. El cultivo de *Agrobacterium* fue colectado y centrifugado a 3000 rpm por 10 min, el sobrenadante fue descartado y se realizó un lavado con la solución de infiltración a una concentración 0,5 X (MES 5 mM, $MgCl_2$ 5 mM, acetosiringona 75 µM, pH 5.6). El cultivo fue centrifugado nuevamente y resuspendido en solución de agroinfiltración 1X (MES 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM, acetosiringona 150 µM, pH 5.6), hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,8 ó 1,0 (dependiendo del experimento) y se incubó a 18 °C por 3 horas.

Metodologías para introducir *Agrobacterium* en hojas de yuca.

Para los ensayos de agroinfiltración se utilizaron plantas cultivadas *in vitro* y posteriormente endurecidas, se seleccionaron hojas jóvenes y verdes. Las infiltraciones se realizaron a temperatura ambiente (20 °C), por triplicado y las plantas se mantuvieron en estas condiciones hasta la realización de la tinción GUS.

Vacío (VA).

En esta técnica las plantas endurecidas fueron sumergidas en 100 mL del cultivo de *Agrobacterium* descrito anteriormente y se les aplicó vacío. El vacío fue mantenido a un mínimo de 20 mmHg por 1 min y fue liberado lentamente. Este proceso se repitió tres veces con cada muestra. El excedente de la solución fue elimina-

do de las hojas usando papel filtro (Cui *et al.*, 2017; Kapila *et al.*, 1997).

Herida más vacío (HE+VA).

Previo a la aplicación de vacío en las hojas de las plantas, se realizaron varias punciones pequeñas cerca al nervio central por el haz de la hoja, empleando una aguja. Posteriormente se realizó el procedimiento de vacío descrito en Díaz *et al.* (2014).

Herida más aplicación del inóculo (HE+IN).

En esta metodología se realizaron heridas cerca al nervio central de la hoja usando una aguja y el inóculo de la bacteria fue esparcido sobre la hoja mediante un copo estéril.

Infiltración (IF).

La infiltración se realizó con una jeringa de 1 mL sin aguja, permitiendo la entrada de la solución por el lado abaxial de la hoja (Schöb *et al.*, 1997). Las hojas se mantuvieron en la planta durante y después de la agroinfiltración y se colectaron justo antes de realizar la tinción para visualizar la actividad de la enzima β -glucuronidasa (producto del gen *GUS*). En dependencia del estadio de la planta, la expresión del gen *GUS* fue evaluada en las hojas inoculadas, dos días post inoculación (dpi) para plantas endurecidas y de 5 a 7 dpi para plantas adultas.

Evaluación de la expresión del gen *GUS*.

Las hojas de las plantas inoculadas se separaron y se sumergieron en el buffer X-Gluc (NaH_2PO_4 0.02 M, Na_2HPO_4 0.03 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0.25 mM, $K_4Fe(CN)_6$ 0.25 mM, tritón X-100 0.5 % (v/v), DMSO 10 % (p/v) y X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucuronido) 1 mg/mL (Sigma, St. Louis, MO, USA). Las muestras fueron ubicadas en una cámara de vacío durante 15 y 30 min (dependiendo del ensayo) a una presión de 20 mmHg y se incubaron a 37 °C durante 16 h sin agitación (Jefferson *et al.*, 1987). Como control positivo se evaluó la expresión del gen *GUS* en plantas de *Nicotiana tabacum* y como control negativo la expresión del vector vacío en la misma planta.

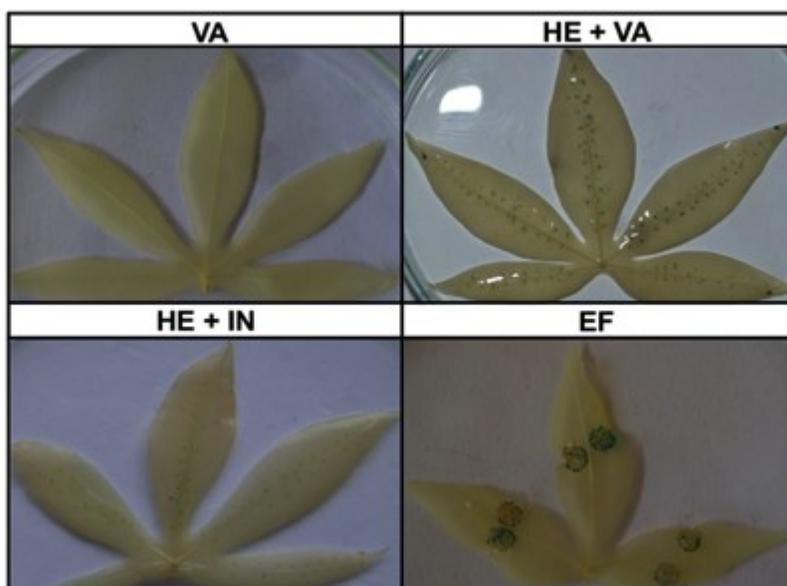


Figura 1. Evaluación de la coloración GUS en hojas de yuca inoculadas con *A. tumefaciens* usando diferentes metodologías. Plantas de yuca endurecidas de la variedad TMS60444 fueron inoculadas mediante VA: vacío, HE+VA: herida más vacío, HE+IN: herida más aplicación del inóculo e IF: infiltración. Se empleó *A. tumefaciens* cepa GV3101 a una DO_{600nm} :0,3. La coloración GUS fue realizada dos días después de la inoculación.

Conjugación triparental para introducir un gen de virulencia en la cepa de *Agrobacterium* GV3101.

Para realizar la conjugación triparental se empleó *Escherichia coli* HB101 como cepa donadora y movilizadora y la cepa GV3101 de *Agrobacterium* como cepa receptora. La cepa donadora fue transformada con el plásmido pTiBo542 que contenía el gen *VirG*, la cepa movilizadora con el plásmido movilizador en trans pRK2013 y la receptora contenía previamente el plásmido pCambia1302.5 con el gen *GUS*. Tanto la cepa donadora como la cepa movilizadora fueron incubadas a 37 °C por 16 horas y la cepa receptora a 28 °C por 48 horas. Pasado este tiempo las tres cepas fueron mezcladas en proporción 5:1:1 receptor:donador:movilizador, esta mezcla fue sembrada en LB e incubada toda la noche a 28 °C. Transcurrido el tiempo la mezcla fue resuspendida en LB con rifampicina, lavada y sembrada en medio sólido con Rf-Kan-Spec-Gen para obtener colonias aisladas.

RESULTADOS

Evaluación de diferentes metodologías para introducir *Agrobacterium tumefaciens* en hojas de yuca.

Para determinar la capacidad de *Agrobacterium* de introducir el ADN-T en las células de yuca, estas fueron

tratadas con una suspensión de la bacteria ya sea por vacío (VA), herida más vacío (HE+VA), herida más aplicación del inóculo (HE+IN) e infiltración (IF). La actividad del gen que codifica para la β -glucuronidasa solo se evidenció en dos de las cuatro metodologías utilizadas, HE+VA e IF mientras que en los tratamientos con VA y HE+IN no se observó la coloración azul característica del gen *GUS* (figura 1). En el tratamiento HE+VA se evidenció una coloración azul cobalto, solamente alrededor de los puntos donde se generaron las heridas y a pesar de aplicar vacío no se observó la difusión del X-gluc más allá del punto de origen de la herida. En el caso de IF, se observaron manchas azules de mayor intensidad y una mayor área teñida alrededor del punto de inserción del X-gluc. Los resultados demostraron el ingreso de la bacteria en la hoja en aquellas metodologías en donde se generó una fuerte presión mecánica. La infiltración fue la técnica que permitió el ingreso de una mayor cantidad de bacteria y por esta razón se seleccionó para los experimentos subsiguientes.

Efecto de la cepa de *Agrobacterium* y del tiempo post inoculación.

Una vez seleccionada la metodología de inoculación, se decidió evaluar el efecto de otras cepas ya que es un factor determinante para la expresión transitoria de un gen (Chetty *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017). Dos días des-

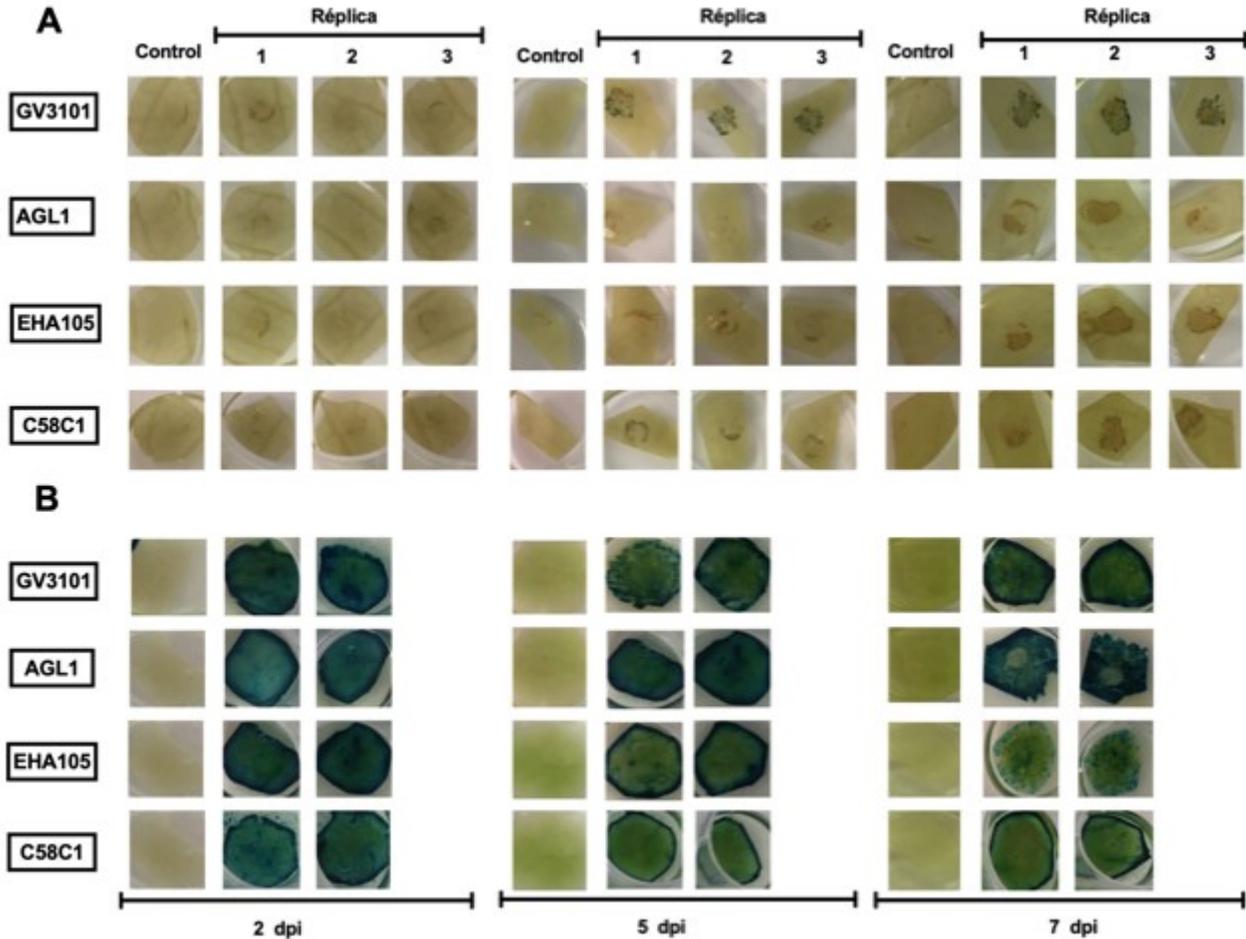


Figura 2. Determinación del tiempo y de la cepa de *A. tumefaciens* óptimos para la detección de la expresión del gen *GUS* en hojas de yuca. **A.** Plantas de yuca adultas de la variedad MCOL1505 fueron inoculadas con cuatro cepas de *Agrobacterium* GV3101, AGL1, EHA105 y C58C1 a una DO_{600nm} :1,0. La coloración *GUS* fue realizada 2, 5 y 7 días después de la inoculación. **B.** Plantas de *Nicotiana tabacum* infectadas con los mismos tratamientos los cuales fueron utilizados como controles positivos del experimento.

pués de la inoculación con las cepas AGL1, EHA105, GV3101 y C58C1, las hojas no mostraron la coloración azul (figura 2A). Tras la inoculación con las cepas AGL1, EHA105 y C58C1 se observaron manchas café típicas de una respuesta necrótica por parte de la planta desde los 2 hasta 7 dpi. Sin embargo al realizar la evaluación de la actividad del gen *GUS* a los 5 y 7 dpi se observó una coloración azul cobalto en las hojas inoculadas con la cepa GV3101. En el caso de las plantas de tabaco empleadas como control se presentó una clara actividad de la enzima β -glucoronidasa en las hojas infiltradas con las cuatro cepas a los 2 dpi (figura 2B). Esta actividad disminuyó a los 5 y 7 dpi. Estos resultados indican que las cepas AGL1, EHA105 y CS8C no son adecuadas para los ensayos de expresión transitoria en yuca bajo las condiciones evaluadas.

Efecto de la introducción del gen *VirG* en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

Debido a que la reacción enzimática del gen *GUS* no mejoró con el uso de otras cepas de *Agrobacterium*, se decidió incrementar la virulencia de la cepa GV3101 mediante la introducción del plásmido pTiBo542 el cual contiene el gen *virG*. Este plásmido, y en particular el gen *virG*, se caracteriza por conferir un fenotipo de supervirulencia (Chen *et al.*, 1991). Las hojas infiltradas con la cepa que contiene solamente el vector con el gen *VirG*, mostraron manchas café más intensas comparadas con aquellas hojas infiltradas con la cepa que contiene solamente el vector vacío (figura 3). Además, se evidenció un incremento en la cantidad de puntos azules en hojas inoculadas con la cepa GV3101 trans-

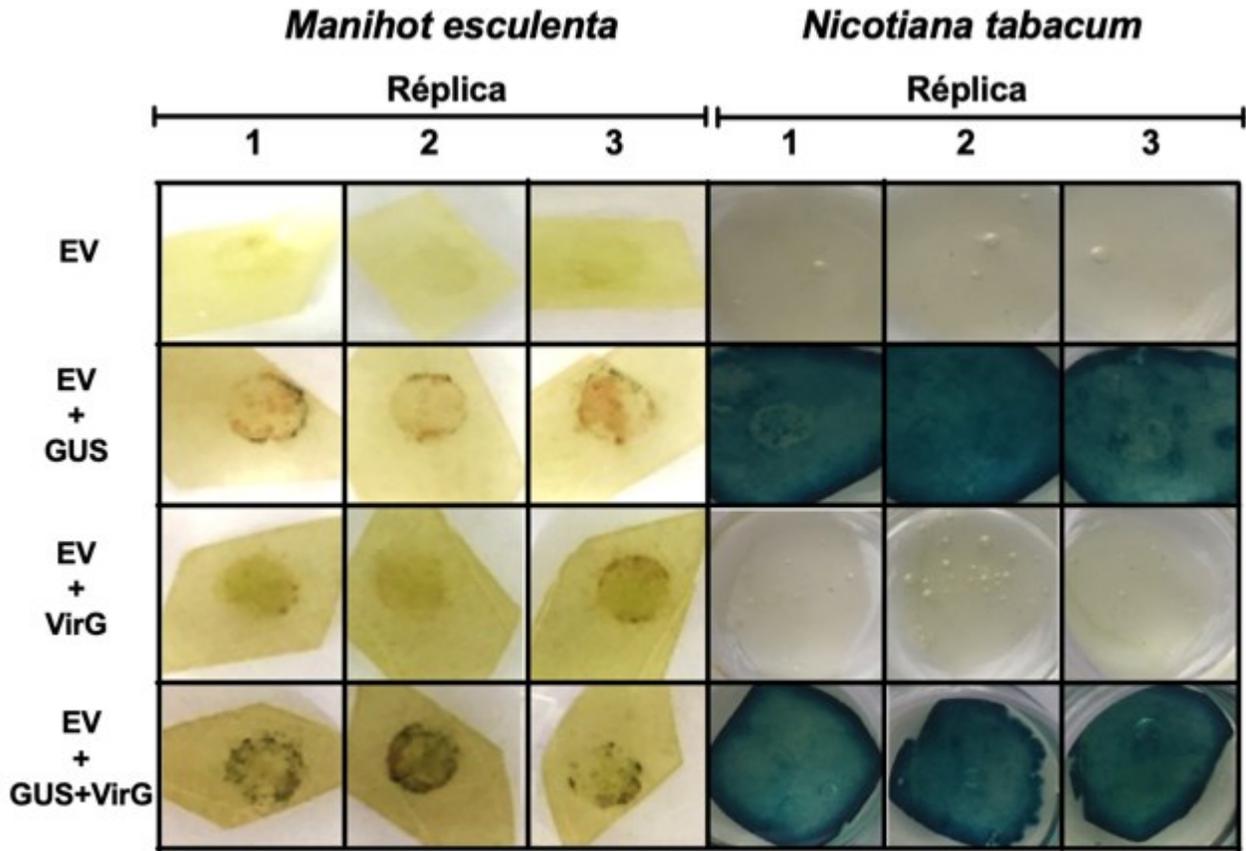


Figura 3. Efecto de la introducción del gen *VirG* en la expresión del gen *GUS*. Plantas de yuca adultas de la variedad MCOL1505 fueron inoculadas con la cepa de *Agrobacterium* GV3101 transformada con las construcciones pCAM-BIA1302.5:*GUS* y pTiBo542:*VirG* a una de DO_{600nm} :1,0. La coloración *GUS* fue realizada a los 7 dpi. Plantas de *Nicotiana* fueron utilizadas como controles positivos del experimento.

formada con los plásmidos que poseen el gen *GUS* y el gen *VirG*, respecto a las hojas inoculadas con la cepa GV3101 conteniendo el plásmido con el gen *GUS*. El incremento en la coloración azul y en la necrosis no fueron observados en las plantas de *Nicotiana tabacum* utilizadas como control. Las evidencias anteriores indican un incremento en la proporción de células de yuca que expresan el transgen *GUS*, como consecuencia de la introducción del gen *VirG* en la cepa GV3101.

Efecto de la introducción del gen *VirG* en la cepa GV3101 en diferentes variedades de yuca.

El gen *VirG* efectivamente incrementó la virulencia de la cepa GV3101, es por esta razón que se decidió emplearla sobre diferentes variedades de yuca. Tras la inoculación de las cinco variedades de yuca se evidenció una mayor cantidad de puntos azules en aquellas hojas donde se empleó la cepa GV3101 transformada simul-

táneamente con los plásmidos que poseen el gen *GUS* y el gen *VirG* que la cepa GV3101 conteniendo únicamente el plásmido con el gen *GUS* (figura 4). Así mismo se observó mayor intensidad en la coloración azul en las variedades MCOL1505, SG107-35 y MTA18. Para las variedades TMS60444 y TMS30572 la cantidad de puntos azules en la zona de inoculación fueron pocos y enmascarados por manchas cafés oscuras. Finalmente las plantas de tabaco utilizadas como control presentaron actividad *GUS* con la cepa normal y la cepa complementada con el gen *VirG*.

DISCUSIÓN

Aunque la transformación estable permite el estudio de la función de un gen *in planta*, esta técnica requiere más trabajo y está acompañada de un proceso largo de regeneración de todo el individuo y su eficacia es dependiente de la especie vegetal. Por el contrario la transformación transitoria, es una técnica fácil y rápida

		Sin gen <i>VirG</i>			Con gen <i>VirG</i>		
		Réplica			Réplica		
		1	2	3	1	2	3
MCOL1505	EV						
	GUS						
TMS60444	EV						
	GUS						
SG107-35	EV						
	GUS						
TMS30572	EV						
	GUS						
MTAI-8	EV						
	GUS						
<i>Nicotiana tabacum</i>	EV						
	GUS						

Figura 4. Actividad GUS en cinco variedades de yuca inoculadas con la cepa GV3101 transformada con el gen *VirG*. Plantas de yuca adultas de las variedades MCOL1505, TMS60444, SG107-35, TMS30572 y MTAI-8 fueron inoculadas con la cepa de *Agrobacterium* GV3101 transformada con las construcciones pCAMBIA1302.5:*GUS* y pTiBo542:*VirG* a una de DO_{600nm} :1,0. La coloración GUS fue realizada a los 7 dpi. En la parte inferior se observan plantas de *Nicotiana tabacum* utilizadas como controles positivos del experimento.

la cual no interfiere con la estabilidad del genoma de la planta (Lu *et al.*, 2013) y permite igualmente el estudio de la función de un gen (Cui *et al.*, 2017). En yuca hasta el momento no se ha reportado algún estudio en donde se emplee la expresión transitoria para la determinación de la función de un gen en plantas adultas. Este trabajo representa una primera contribución al estudio funcional de genes empleando esta aproximación.

En este trabajo se desarrolló una metodología para evaluar la expresión transitoria mediada por *Agrobacterium* en hojas de yuca de plantas adultas. El primer paso fue seleccionar una técnica para introducir la bacteria dentro del tejido vegetal, una vez allí la bacteria podrá transferir el ADN-T conteniendo el gen reportero. Los resultados aquí obtenidos permitieron evidenciar que para el caso de yuca se deben realizar heridas para que la solución que contiene *Agrobacterium* logre ingresar. Los mejores resultados se obtuvieron a través de la infiltración de hojas (figura 1). Estos resultados son opuestos a algunos otros trabajos donde reportan muy buena eficiencia en la transformación con la aplicación de vacío (Cui *et al.*, 2017; Leuzinger *et al.*, 2013). Sin embargo, para nuestro caso esta eficiencia pudo disminuir como consecuencia de exponer al vacío la suspensión de *Agrobacterium* por un tiempo prolongado, ya que esto genera disminución en la temperatura, factor relevante en la expresión transitoria (Wroblewski *et al.*, 2005). Un factor importante que se observó al realizar la infiltración en yuca es que la cantidad de solución que logra ingresar no sobrepasa el área de la jeringa, mientras que para el caso de *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis* y *Nicotiana* la infiltración permite el ingreso de grandes cantidades de la solución (Jelly *et al.*, 2014; Schöb *et al.*, 1997). Esta limitación puede ser considerada teniendo en cuenta el carácter altamente coriáceo que caracteriza las hojas de yuca (Ospina & Ceballos, 2012).

Muchos parámetros han sido investigados que afectan la eficiencia de la transformación. Dentro de los parámetros evaluados en este trabajo se encuentran el tipo y fondo genético de la planta, la cepa de *Agrobacterium* y el tiempo post-inoculación. En primer lugar se observaron grandes diferencias respecto al tipo de planta utilizado. Al emplear plantas cultivadas *in vitro* y luego endurecidas se obtuvo una eficiencia de transformación más alta (figura 1) respecto a las plantas adultas (figura 2-4). Resultados similares han sido encontrados en *Vitis vinifera* (Jelly *et al.*, 2014) y en *Fragaria x ananassa* Duch (Cui *et al.*, 2017). Es posible que al ser las plantas cultivadas *in vitro* mucho más jóvenes, suaves y menos gruesas, sea más fácil la entrada de la solución que con-

tiene la bacteria y en consecuencia la transferencia del ADN-T. Otro aspecto a considerar es que en plantas cultivadas *in vitro* se requiere menos tiempo para evaluar la expresión de un gen, respecto a las plantas adultas.

Dentro de las cepas de *Agrobacterium* que fueron evaluadas se encuentra la cepa AGL1, la cual se conoce como una cepa hipervirulenta y que ha sido ampliamente empleada para la transformación estable de callo embriogénico en yuca (Beltran *et al.*, 2010). En contraste, la cepa EHA105 es usada rutinariamente para la transformación en otras especies de interés agronómico incluido *Musa* spp. (Escuela *et al.*, 2011), *Vitis vinifera* L. (Torregrosa *et al.*, 2002), *Zingiber officinale* Rosc. (Suma *et al.*, 2008) y *Brassica napus* L. (Radchuk *et al.*, 2000). Por otro lado, la cepa C58C1 ha permitido obtener altos niveles de actividad de la enzima GUS en *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis* entre 4-5 dpi (Wroblewski *et al.*, 2005). En la literatura se encuentra que el orden de eficiencia para liberar el ADN-T en plantas es el siguiente: AGL1 EHA105 GV3101 C58C1 (Chen *et al.*, 2010). Sin embargo, para el caso de yuca la eficiencia fue más alta con la cepa GV3101 que con AGL1 y EHA105, indicando que puede existir un efecto de compatibilidad entre la cepa de *Agrobacterium* y el hospedero.

Una modificación que logró incrementar ligeramente la virulencia de la cepa GV3101 fue la introducción del gen de virulencia *VirG*. Este gen codifica para una proteína la cual se une corriente arriba a las regiones promotoras del grupo de genes *vir* para activar su transcripción. Esta unión incrementa la eficiencia para liberar el ADN-T dentro de la planta (Buchanan *et al.*, 2015). El gen *VirG* presente en el plásmido pTiBo542 posee diferencias en el promotor, en la secuencia codificante y en la región 3'UTR respecto a la versión original presente en la mayoría de las cepas, lo que le confiere un fenotipo superactivador a la cepa que lo contenga (Chen *et al.*, 1991).

El hecho de observar claras diferencias en los niveles de expresión del gen reportero entre variedades (figura 4), demuestra que el factor genético es clave en la eficiencia de la agroinfiltración, tal como se ha demostrado en algunos ecotipos de *Arabidopsis* (Wroblewski *et al.*, 2005) y en otras especies vegetales (Bhaskar *et al.*, 2009; Sheludko *et al.*, 2007; Zottini *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

Este trabajo permitió identificar que la mejor metodología para inducir la expresión transitoria del gen *GUS* en hojas de yuca es mediante agroinfiltración y que la ce-

pa más adecuada de *Agrobacterium* es GV3101. Se logró evidenciar un sutil incremento en la expresión transitoria cuando se introdujo el gen *VirG* en la cepa de *Agrobacterium*. Adicionalmente existe una fuerte dependencia de la variedad de yuca para que el proceso de agroinfiltración sea eficiente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, al programa de becas de doctorado de Colciencias y al programa ECOS-NORD C15A01 por su contribución financiera. Este proyecto fue parcialmente financiado por Colciencias (Contrato 0315-2013).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aung, K., Xin, X., Mecey, C. & He, S. Y. (2017). Subcellular Localization of *Pseudomonas syringae* pv. tomato Effector Proteins in Plants, en Nilles, M. L. y Condry, D. L. J. (eds.) *Type 3 Secretion Systems: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York, pp. 141-153. doi: 10.1007/978-1-4939-6649-3_12.
- Beltran, J., Prías, M., Al-Babili, S., Ladino, Y., López, D., Beyer, P., Chavarriga, P. & Tohme, J. (2010). Expression pattern conferred by a glutamic acid-rich protein gene promoter in *W* eld-grown transgenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz), *Planta*, 231, pp. 1413-1424. doi: 10.1007/s00425-010-1144-7.
- Bhaskar, P. B., Venkateshwaran, M., Wu, L., Ané, J. M. & Jiang, J. (2009). *Agrobacterium*-mediated transient gene expression and silencing: A rapid tool for functional gene assay in potato, *PLoS ONE*, 4(6), pp. 1-8. doi: 10.1371/journal.pone.0005812.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L. (2015). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Journal of Chemical Information and Modeling*. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Chen, C.-Y., Wang, L. & Winans, S. C. (1991). Characterization of the supervirulent *virG* gene of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiBo542, *MGC Molecular & General Genetics*, 230(1-2), pp. 302-309. doi: 10.1007/BF00290681.
- Chen, X., Equi, R., Baxter, H., Berk, K., Han, J., Agarwal, S. & Zale, J. (2010). A high-throughput transient gene expression system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.) seedlings, *Biotechnology for Biofuels*, 3 (1), p. 9. doi: 10.1186/1754-6834-3-9.
- Cheng, Q., Mao, W., Xie, W., Liu, Q., Cao, J., Yuan, M., Zhang, Q., Li, X. & Wang, S. (2017). Characterization of a disease susceptibility locus for exploring an efficient way to improve rice resistance against bacterial blight, *Science China Life Sciences*, 60(3), pp. 298-306. doi: 10.1007/s11427-016-0299-x.
- Chetty, V. J., Ceballos, N., Garcia, D., Narváez-Vásquez, J., Lopez, W. & Orozco-Cárdenas, M. L. (2013). Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom, *Plant Cell Reports*, 32(2), pp. 239-247. doi: 10.1007/s00299-012-1358-1.
- Cui, M.-Y., Wei, W., Gao, K., Xie, Y.-G., Guo, Y. & Feng, J.-Y. (2017). A rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for strawberry leaves and the study of disease resistance proteins, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. Springer Netherlands, 0(0), p. 0. doi: 10.1007/s11240-017-1279-3.
- Díaz, P.-T., Bernal, A. & López, C. (2014). Transient GUS gene expression in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using *Agrobacterium tumefaciens* leaf infiltration, *Revista MVZ Cordoba*, 19(3), pp. 4338-4349.
- Du, J., Rietman, H. & Vleeshouwers, V. G. A. A. (2014). Agroinfiltration and PVX Agroinfection in Potato and *Nicotiana benthamiana*, *Journal of Visualized Experiments*, 83, pp. 2-7. doi: 10.3791/50971.
- Escuela, C. ., Tripathi, L. & Fawole. (2011). EFFECTS OF VARIOUS VIRULENT STRAINS OF *Agrobacterium tumefaciens* ON GENETIC TRANSFORMATION OF BANANA (*Musa* sp.) CULTIVAR WILLIAMS, *African Journal of Horticultural Science*, 5, pp. 84-91.
- FAO (2017). Food Outlook, en *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, pp. 48-53. doi: ISSN 1560-8182.
- Franche, C., Bogusz, D., Schöpke, C., Fauquet, C. & Beachy, R. N. (1991). Transient gene expression in cassava using high-velocity microprojectiles, *Plant Molecular Biology*, 17(3), pp. 493-498. doi: 10.1007/BF00040643.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants., *The EMBO journal*, 6(13), pp. 3901-7. doi: 10.1073/pnas.1411926112.
- Jelly, N. S., Valat, L., Walter, B. & Maillot, P. (2014).

- Transient expression assays in grapevine: A step towards genetic improvement, *Plant Biotechnology Journal*, 12(9), pp. 1231-1245. doi: 10.1111/pbi.12294.
- Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M. & Angenon, G. (1997). An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves, *Plant Science*, 122(1), p. 1. Kapila, J. et al., 1997. An Agrobacterium-mediate. doi: 10.1016/S0168-9452(96)04541-4.
- Koetle, M. J., Baskaran, P., Finnie, J. F., Soos, V., Balázs, E. & Van Staden, J. (2017). Optimization of transient GUS expression of Agrobacterium-mediated transformation in *Dierama erectum* Hilliard using sonication and Agrobacterium, *South African Journal of Botany*. SAAB, 111, pp. 307-312. doi: 10.1016/j.sajb.2017.03.025.
- Lee, M. W. & Yang, Y. (2013). Transient Expression Assay by Agroinfiltration of Leaves, en *Methods in Molecular Biology*, pp. 225-229.
- Leuzinger, K., Dent, M., Hurtado, J., Stahnke, J., Lai, H., Zhou, X. & Chen, Q. (2013). Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins., *Journal of visualized experiments: JoVE*, (77), pp. 1-9. doi: 10.3791/50521.
- Li, S., Cong, Y., Liu, Y., Wang, T., Shuai, Q., Chen, N. & Gai, J. (2017). Optimization of Agrobacterium - Mediated Transformation in Soybean, *Frontiers in plant science*, 8(246), pp. 1-15. doi: 10.3389/fpls.2017.00246.
- Lu, Y., Chen, X., Wu, Y., Wang, Y., He, Y. & Wu, Y. (2013). Directly Transforming PCR-Amplified DNA Fragments into Plant Cells Is a Versatile System That Facilitates the Transient Expression Assay, *PLoS ONE*, 8(2). doi: 10.1371/journal.pone.0057171.
- Luong, H. ., Shewry, P. & Lazzeri, P. (1995). Transient gene expression in cassava somatic embryos by tissue electroporation, *Plant science*, 107, pp. 105-115.
- Matsuo, K. & Matsumura, T. (2017). Repression of the DCL2 and DCL4 genes in *Nicotiana benthamiana* plants for the transient expression of recombinant proteins, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Elsevier Ltd, 124(2), pp. 215-220. doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.02.019.
- Nanjareddy, K., Arthikala, M.-K., Blanco, L., Arellano, E. S. & Lara, M. (2016). Protoplast isolation, transient transformation of leaf mesophyll protoplasts and improved Agrobacterium-mediated leaf disc infiltration of *Phaseolus vulgaris*: tools for rapid gene expression analysis, *BMC Biotechnology*. BMC Biotechnology, 16(1), p. 53. doi: 10.1186/s12896-016-0283-8.
- Ospina, B. & Ceballos, H. (2012). La_Yuca_en_el_Tercer_Milenio.pdf.
- Radchuk, V. V., Klocke, E., Radchuk, R. I., Neumann, M. & YaB, B. (2000). Production of transgenic rape plants (*Brassica napus* L.) using Agrobacterium tumefaciens. *Genetika*, 36(7), p. 932–941. Disponible en: <http://europepmc.org/abstract/MED/10994497>.
- Rosenthal, D. M. & Ort, D. R. (2011). Examining Cassava's Potential to Enhance Food Security Under Climate Change, *Tropical Plant Biology*. doi: 10.1007/s12042-011-9086-1.
- Schöb, H., Kunz, C. & Meins Jr., F. (1997). Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing, *Molecular and General Genetics MGG*, 256(5), pp. 581-585. doi: 10.1007/s004380050604.
- Shah, K. H., Almaghrabi, B. & Bohlmann, H. (2013). Comparison of Expression Vectors for Transient Expression of Recombinant Proteins in Plants, *Plant Molecular Biology Reporter*, 31(6), pp. 1529-1538. doi: 10.1007/s11105-013-0614-z.
- Sheludko, Y. V., Sindarovska, Y. R., Gerasymenko, I. M., Bannikova, M. A. & Kuchuk, N. V. (2007). Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale Agrobacterium-mediated transient expression, *Biotechnology and Bioengineering*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 96(3), pp. 608-614. doi: 10.1002/bit.21075.
- Solliman, M. E. M., Mohasseb, H. A., Al-khateeb, A. A., Al-khayri, J. M. & Al-khateeb, S. A. (2017). Transient GUS Gene Expression in Date Palm Fruit Using Agroinjection Transformation Technique, en *Methods in Molecular Biology*, pp. 295-305. doi: 10.1007/978-1-4939-7156-5.
- Suma, B., Keshavachandran, R. & Nybe, E. V (2008). Agrobacterium tumefaciens mediated transformation and regeneration of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.), *Journal of Tropical Agriculture* 46, 46(1-2), pp. 38-44.
- Takemoto, D. & Jones, D. A. (2014). Particle Bombard-

- ment-Mediated Transient Expression to Identify Localization Signals in Plant Disease Resistance Proteins and Target Sites for the Proteolytic Activity of Pathogen Effectors, en Birch, P., Jones, J. T., y Bos, J. I. B. (eds.) *Plant-Pathogen Interactions: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 91-101. doi: 10.1007/978-1-62703-986-4_7.
- Torregrosa, L., Iocco, P. & Thomas, M. R. (2002). Agrobacterium -mediated transformation of *Vitis vinifera* L., *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(January), pp. 183-190.
- Wroblewski, T., Tomczak, A. & Michelmore, R. (2005). Optimization of Agrobacterium -mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis, *Plant Biotechnology Journal*, 3, pp. 259-273. doi: 10.1111/j.1467-7652.2005.00123.x.
- Wu, J., Liu, Q., Geng, X., Li, K., Luo, L. & Liu, J. (2017). Highly efficient mesophyll protoplast isolation and PEG-mediated transient gene expression for rapid and large-scale gene characterization in cassava (*Manihot esculenta* Crantz), *BMC Biotechnology*. *BMC Biotechnology*, 17(29), pp. 1-8. doi: 10.1186/s12896-017-0349-2.
- Yasuda, S., Aoyama, S., Hasegawa, Y., Sato, T. & Yamaguchi, J. (2017). Arabidopsis CBL-Interacting Protein Kinases Regulate Carbon/Nitrogen-Nutrient Response by Phosphorylating Ubiquitin Ligase ATL31, *Molecular Plant*. Elsevier Ltd, 10(4), pp. 605-618. doi: 10.1016/j.molp.2017.01.005.
- Zottini, M., Barizza, E., Costa, A., Formentin, E., Ruberti, C., Carimi, F. & Lo Schiavo, F. (2008). Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells, *Plant Cell Reports*, 27(5), pp. 845-853. doi: 10.1007/s00299-008-0510-4.