

Instituto Tecnológico de Costa Rica Sede San Carlos

Escuela de Ciencias y Letras

Vicerrectoría de Investigación y Extensión

Informe Final de Investigación

**Desarrollo de una nueva metodología de
transformación genética no tradicional, como
estrategia potencial para inducir resistencia a
infecciones fúngicas en vainilla
(*Vanilla planifolia*)**

Código:

5402-2160-2701

Investigadores Responsables

M.Sc. Omar Gätjens Boniche

M.Sc. Wayner Montero Carmona

San Carlos, Enero 2012

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	ii
Abstract	iii
Introducción	1
Objetivos	2
Materiales y Métodos	3
Resultados y Discusión	8
Agradecimientos	21
Bibliografía	22
DOCUMENTO II	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO	24

Desarrollo de una nueva metodología de transformación genética no tradicional, como estrategia potencial para inducir resistencia a infecciones fúngicas en vainilla (*Vanilla planifolia*).

Resumen: Este estudio consistió en la evaluación de las condiciones experimentales para la transformación genética de *Vanilla planifolia* por medio de un sistema de biobalística de baja presión. Los meristemos radicales de aproximadamente 0.5 cm, provenientes de microestacas desarrolladas en un medio líquido MS básico en agitación, se colocaron en un medio osmótico 16 hr antes y 24 hr después del bombardeo, posteriormente se subcultivaron en medio MS suplementado con 1 y 3 mg/L de benciladenina. Se incluyeron controles de bombardeo sin plásmido y controles de explantes, con y sin estrés osmótico. 48 hr después del bombardeo se realizó la prueba de expresión transitoria con el X-Gluc y se observó una tinción azulada en la epidermis de las terminales radicales bombardeadas con el plásmido así como también en los controles. A las 2 semanas también se presentó tinción en las regiones externa e interna de las estructuras iniciales que conducen a la formación de los PLBs en todos los tratamientos evaluados y los controles. La presencia de la tinción azul correspondiente a la degradación del sustrato X-Gluc en los controles, evidencia la expresión de enzimas endógenas en los tejidos de la planta que podrían interferir con la interpretación de los resultados de expresión transitoria. Este sería el primer reporte de actividad β -glucoronidasa endógena en materiales in vitro de vainilla. De acuerdo a la evidencia obtenida, el estrés inducido por el choque osmótico en las terminales radicales de vainilla, puede provocar contaminación por un aumento en el crecimiento de potenciales microorganismos endógenos y por ende, la pérdida de material vegetal. Aunque es factible utilizar meristemos radicales de vainilla para la transformación genética de esta especie, se propone que una estructura más apropiada para este fin podría ser el estadio inicial observado cuando se forma el PLB a partir de los meristemos radicales.

Palabras clave: *Vanilla planifolia*, terminales radicales, transformación genética, β -glucoronidasa, PLBs.

Desarrollo de una nueva metodología de transformación genética no tradicional, como estrategia potencial para inducir resistencia a infecciones fúngicas en vainilla (*Vanilla planifolia*).

Abstract: This study consisted in the evaluation of the experimental conditions for genetic transformation of *Vanilla planifolia* by a biolistic system under low pressure. Root tips of 0.5 cm of length, from seedlings developed in basic MS liquid medium under agitation, were placed in an osmotic medium, 16 hr before and 24 hr after bombarding, subsequently they were placed in MS culture medium supplemented with 1 and 3 mg/L benzyladenine. The assay included bombarding controls without plasmid and controls of explants with and without osmotic stress. After 48 hr of bombarding, root tips were exposed to X-Gluc and a blue staining was observed in the epidermis of the root tips, as well as in the controls. After 2 weeks, the blue staining was also present in the external and internal areas of the initial structures that become PLBs, in all the treatments evaluated and controls. The presence of the staining corresponding to X-Gluc substrate degradation in the controls evidences the expression of endogenous enzymes in plant tissue, which could interfere with interpretation of transient expression results. This would be the first report of endogenous β -glucuronidase activity in *in vitro* vanilla materials. According to the obtained evidence, it is also important to take into consideration that stress induced by osmotic shock in the terminal tips of vanilla plants, could cause contamination by an increase in the growth of potential endogenous microorganisms and, consequently the loss of plant material. Although it is possible to utilize vanilla root meristems for genetic transformation of this species, it is postulated that a more appropriated structure for transformation could be the initial stage on the process of PLB formation from root meristems.

Key words: *Vanilla planifolia*, root tips, genetic transformation, β -glucuronidase, PLBs.

Introducción

Aproximadamente el 10% de las especies de orquídeas del mundo son plantas cultivadas por el interés comercial de su flor. Por el contrario, la vainilla es la única orquídea que se cultiva por el interés comercial de su fruto, órgano de donde se extrae la vainillina, una sustancia empleada comercialmente como saborizante natural (Pupulín y Quesada 1999). Actualmente el cultivo de la vainilla se ha convertido en una opción muy rentable para los productores costarricenses ya que existe un gran interés comercial y la demanda sin satisfacer de este producto es alta (Monturiol 2007). Se considera que las variedades comerciales de vainilla disponibles en el mercado son buenas productoras, pero debido a que tienen tejidos ricos en nutrientes, son muy susceptibles a las infecciones causadas por hongos y bacterias. La polinización manual de la vainilla es muy efectiva, pero si el número de flores fertilizadas va más allá de la capacidad de la planta, ésta se debilita y es fácilmente víctima de infecciones (Miranda 2003). Por otra parte los nuevos cultivares e híbridos de vainilla desarrollados en los últimos años son muy susceptibles a las infecciones causadas por el hongo *Fusarium*. Esta situación ha propiciado la búsqueda de sustancias alternativas para sustituir la vainilla obtenida de forma natural; tal es el caso del empleo de sustancias sintéticas como cumarina o vainillina artificial, sin embargo estas no son aptas para la industria alimentaria, dado que no presentan el aroma y cualidades de la vainilla natural (Rivera 1996). Por lo señalado, es de vital importancia considerar alternativas viables que permitan mantener en buenas condiciones los cultivos de vainilla (Navarro 2000). Para tratar de lograr lo anterior, se ha optado por el empleo del cultivo de tejidos, lo que permitiría en principio, la producción de materiales sanos, sobresalientes en una o varias características, y al mismo tiempo se favorecería la conservación del material genético de las respectivas variedades (Kalimuthu *et al.* 2006; Raddampalli *et al.* 2007).

El mejoramiento genético convencional de la vainilla se ha visto limitado debido a que la producción de híbridos no ha permitido obtener la resistencia esperada (Dequaire 1976). De igual forma, los métodos de control químico y biológico no han resultado eficientes para disminuir la presencia del hongo *Fusarium* (Navarro y Perea 1996).

Malabadi y Nataraja (2007) realizaron pruebas de transformación genética con PLBs ("Protocorm Like Bodies") de cultivos *in vitro* de *V. planifolia*, utilizando *Agrobacterium tumefaciens* como vehículo de transformación. Estos autores informaron que el plásmido utilizado se integró eficientemente en los explantes de vainilla, obteniéndose posteriormente plantas transformadas genéticamente.

La transformación genética, mediante el bombardeo de micropartículas en combinación con las técnicas de cultivo de tejidos, constituyen una alternativa prometedora para la incorporación de genes de resistencia a *Fusarium*, debido al hecho de que el mejoramiento genético convencional es muy limitado y la propagación sexual es difícil en condiciones naturales (Parra 1987).

Este trabajo de investigación se realizó con el objetivo de determinar las variables experimentales más importantes que permitirán establecer una metodología para la transformación genética de *V. planifolia* para inducir resistencia a hongos patógenos.

Objetivos específicos:

- Desarrollar y optimizar el Sistema de Aceleración de Liposomas Cristalizados (SALIC), como una nueva metodología para la transformación genética de células eucarióticas.
- Transformar genéticamente material vegetal a partir de cultivos *in vitro* de vainilla, por medio de la utilización de la técnica tradicional de biobalística y por medio del Sistema de Aceleración de Liposomas Cristalizados, para inducir resistencia a hongos patógenos.
- Comparar la efectividad del Sistema de Aceleración de Liposomas Cristalizados con respecto a la metodología de biobalística, por medio de la cuantificación de los eventos de expresión transitoria (expresión histológica del gen reportero para la β -glucuronidasa), generados en los cultivos de vainilla bombardeados.
- Establecer y optimizar las metodologías de micropropagación clonal de las plantas de vainilla.

Materiales y Métodos

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Ciencias y Letras y en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales de la Escuela de Agronomía, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos. Las actividades de este estudio consistieron en tres fases: la obtención de las raíces de vainilla *in vitro*, la transformación genética por medio del bombardeo de micropartículas y la regeneración de las terminales radicales a brotes.

Se utilizó el plásmido pHAGG, construido por el Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Irapuato, México y proporcionado gentilmente por el M.Sc. J. L. Ortiz de la Unidad de Biotecnología del CATIE.

El vector pHAGG está constituido por los genes que codifican para la quitinasa (TACH) y la glucanasa de la clase I de tabaco, utilizados para inducir resistencia a *Fusarium*. Además contiene el gen reportero *uid A* y el gen selector para la higromicina (*hph*). Los genes están clonados bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) y el terminador nopalina sintasa (nos).

Se utilizó un sistema de aceleración de partículas de biobalística a baja presión por medio del sistema de aceleración PIG (“Particle Inflow Gun”), fabricado originalmente en México y modificado totalmente en el panel de control y en el circuito eléctrico que controla el funcionamiento de todo el aparato. Estas modificaciones se realizaron en el Laboratorio de Física de la Escuela de Ciencias y Letras, Sede San Carlos del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Para el bombardeo se utilizaron partículas de tungsteno M-10 (BIO-RAD, Hercules, CA, USA).

Para la producción de raíces de *V. planifolia* se tomaron plantas provenientes de cultivo *in vitro* (de un medio sólido), se cortaron microestacas conteniendo un nudo y se

colocaron 20 de las mismas en cada frasco erlenmeyer de 250 ml para un total de 36, conteniendo cada uno 50 mL de medio de cultivo MS líquido y 30 g/L de sacarosa. Los erlenmeyers se colocaron en agitación (80 rpm) y en la oscuridad, a una temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ y se mantuvieron bajo estas condiciones por un mes.

16 horas antes de realizar el bombardeo, se cortaron las terminales de las raíces provenientes de frascos en medio de cultivo líquido en agitación, con una longitud de 0.5 a 1.0 cm y se colocaron en la parte central de una placa de Petri conteniendo medio osmótico sólido. Al momento de realizar el bombardeo se colocó sobre la placa de Petri una tapa perforada de 10 cm de diámetro de acero inoxidable que presentaba un orificio central de aproximadamente 5 cm de diámetro y orificios laterales de 1 cm de diámetro, para disminuir la dispersión de los explantes. El medio osmótico sólido contiene las sales MS, y está suplementado con 18 g/L de manitol y 18 g/L de sorbitol (Ortiz 2001).

Las terminales radicales se distribuyeron en los tratamientos correspondientes a las presiones de 80, 100 y 110 psi y a las distancias correspondientes de 5.5 cm y 8.0 cm. Las raíces se bombardearon con el plásmido y fueron colocadas posteriormente en el medio de cultivo suplementado con el regulador de crecimiento Benciladenina (BA) a las concentraciones de 1 y 3 mg/L. Adicionalmente se incluyeron tres controles diferentes a partir de las terminales radicales obtenidas del medio de cultivo MS líquido: un grupo se trasladó directamente al medio de cultivo suplementado con el regulador de crecimiento BA a las concentraciones de 1 y 3 mg/L (control sin medio osmótico); un segundo grupo se trasladó al medio osmótico y posteriormente las terminales radicales fueron transferidas al medio de cultivo suplementado con el regulador de crecimiento BA a las concentraciones de 1 y 3 mg/L (control con medio osmótico) y finalmente un tercer grupo que se trasladó al medio regulador osmótico, que posteriormente fueron bombardeadas sin el plásmido y finalmente colocadas en el medio de cultivo suplementado con el regulador de crecimiento BA a las concentraciones de 1 y 3 mg/L (control del bombardeo).

Los microproyectiles (de $0.7\ \mu\text{m}$) se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito por Becker *et al.* (2000). Se empleó un vacío de 25 psi. Se bombardearon un total

de 18 placas, doce de las mismas bombardeadas con el plásmido para los 6 tratamientos por duplicado, distribuidos en las tres presiones (80, 100 y 110 psi) y las dos distancias de disparo (5.5 y 8.0 cm). Las seis placas restantes correspondieron a las placas del control de bombardeo sin el plásmido para cada uno de los tratamientos de distancia-presión.

Una vez que las terminales radicales se bombardearon, permanecieron en el medio osmótico por 24 horas más, al igual que las terminales radicales del control del medio osmótico sin bombardear. Finalmente los explantes fueron colocados en el medio de cultivo para inducir la formación de PLBs. Este medio contiene las sales MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con 100 mg/L de myo-inositol, 0.5 mg/L de ácido nicotínico, 0.5 mg/L de piridoxina-HCl, 0.1 mg/L de tiamina-HCl, 1 g/L de caseína hidrolizada, 30 g/L de sacarosa, con 1 y 3 mg/L de BA, ajustado a un pH 5.7 y solidificado con 6 g/L de agar (tomado y modificado a partir de Philip y Nainar 1988). Los cultivos crecieron con un fotoperíodo de 16 horas luz. Como fuente de luz se emplearon lámparas de luz fluorescente con intensidades lumínicas de 2000 lux. Los meristemos radicales en sus respectivos medios de cultivo, crecieron a 25 ± 1 °C y a una humedad relativa del 90% en el cuarto de crecimiento. Cada placa que se bombardeó con el plásmido contenía 40 terminales radicales, así como también en el caso de los tratamientos, con y sin medio osmótico.

Durante la etapa de formación de los PLBs, posterior a la realización del bombardeo, se colocaron los meristemos radicales de forma invertida (geotropismo negativo), tal como se menciona en Philip y Nainar (1988). La unidad experimental para los tratamientos que crecieron en el medio sólido consistió de frascos de vidrio pequeños, con 5 terminales de raíz por frasco y con 5 repeticiones. El porcentaje de formación de los PLBs se determinó cuantificando la presencia de esta estructura como producto del cambio producido en el meristemo de la raíz, con respecto al total de meristemos de raíces sembradas. Para cuantificar la formación de PLBs a partir de las terminales radicales y consecutivamente a brotes, se hizo una comparación del desarrollo de los explantes provenientes de todos los tratamientos con respecto a la concentración del regulador de crecimiento BA, a saber 1 y 3 mg/L. Para ello se establecieron dos períodos de medición del porcentaje de formación de estas estructuras, a los 5 y 30 días de iniciados los cultivos.

La formación de PLBs a partir de los meristemos radicales fue analizada por medio de ANOVA, utilizando el programa Statistical Analysis System (SAS).

El análisis de la expresión transitoria se llevó a cabo a las 48 horas y a las 2 semanas de realizado el bombardeo. Para tal efecto se realizó un análisis de expresión transitoria utilizando el equipo de reactivos para detección de la actividad de la enzima β -glucuronidasa, siguiendo las instrucciones del fabricante (β -Glucuronidase Reporter Gene Staining Kit, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). La prueba se realizó tomando una muestra de 20 terminales radicales por tubo, para cada uno de los tratamientos bombardeados con el plásmido y un total de 5 terminales radicales, para los controles.

La supervivencia de los explantes, la cual está en función de la presencia de contaminación por hongos o bacterias presentes en el exudado y por oxidación (presencia de tejido necrótico) se determinó a las 2 semanas de realizado el bombardeo, tanto en los tratamientos como en los controles.

Para realizar las pruebas con el nuevo Sistema de Aceleración de Liposomas Cristalizados (SALIC), los liposomas fueron preparados con lecitina natural comprada en el comercio local de Ciudad Quesada. El primer paso fue pesar aproximadamente 6 mg del lípido (lecitina) y colocarlo en un tubo limpio y estéril (puede ser un tubo de vidrio pirex que tenga un volumen adecuado). Luego se disolvieron los 6 mg del lípido en 250 μ l de cloroformo, agitando gentilmente. Posteriormente se evaporó el cloroformo bajo una corriente de nitrógeno de flujo bajo (en un kitasato) de manera que permitió la formación de una película lipídica en la base del tubo (ver Figura1). Este procedimiento de secado se realizó en una corriente de nitrógeno para evitar la oxidación de los liposomas. Después se agregaron 5 μ l del vector de transformación genética (1 μ g/ μ l de plásmido) en 60 μ l de una disolución estéril con sales MS básicas, utilizada en del medio de cultivo de la especie vegetal a transformar. Seguidamente se agregaron los 60 μ l de la solución MS con el plásmido al tubo con el lípido que se secó previamente en presencia de nitrógeno gaseoso. Se agitó en mezclador vortex por 5 minutos de forma que se despegó la mayor cantidad de lípido del fondo del tubo, procurando no levantar mucho la solución. Luego se sonicaron

durante aproximadamente 30 minutos en un sonicador de punta (Misonix; Nueva York, EEUU). En este punto, la solución debe tener una apariencia lechosa a simple vista. En caso de que se sobrecalentara la solución, esta se enfrió con hielo. Se homogenizó el tamaño y formación de bicapas lipídicas de los liposomas preparados en el “Ministruder” (Avanti Polar Lipids INC.; Alabama, EEUU). Posteriormente se filtró la solución resultante en un tubo estéril de 1.5 ml dentro de una cámara de flujo laminar. Se utilizó un filtro- jeringa de 0,22 μm . Este paso se realizó para eliminar microorganismos contaminantes. Se valoró si el filtrado contiene la concentración de liposomas deseado y si los mismos después de filtrados tenían el tamaño adecuado para realizar la transformación. Una vez filtrada la solución, se tapó el tubo y se guardó a 4 $^{\circ}\text{C}$ en oscuridad hasta el momento de su utilización. Se utilizaron 5 μl de la solución preparada para cada disparo. Los disparos se realizaron a una temperatura baja (10 $^{\circ}\text{C}$ aproximadamente), lo cual se logró acoplado al sistema de aceleración de partículas de baja presión PIG (“Particle Inflow Gun”), un dispositivo construido en aluminio conteniendo un sistema de enfriamiento y diseñado especialmente para este fin (ver Anexo). Estas modificaciones se realizaron también en el Laboratorio de Física de la Escuela de Ciencias y Letras, Sede San Carlos del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Se evaluaron 3 distancias de disparo (3, 9 y 15 cm) así como dos diferentes presiones de disparo (80 y 110 psi) al vacío. Posteriormente, se repitió el protocolo descrito para análisis de la expresión transitoria a las 48 horas.

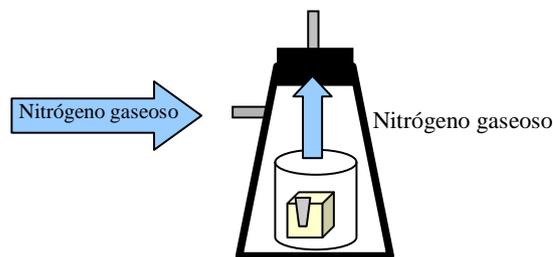


Figura 1: Dispositivo para secar lípidos diluidos en cloroformo en una corriente de nitrógeno gaseoso.

Resultados y Discusión

La producción de raíces *in vitro* de *V. planifolia* se llevó a cabo utilizando el protocolo de vainilla establecido por Philip y Nainar (1988) con modificaciones y optimizado mediante el empleo de un medio líquido en agitación para acelerar la rizogénesis. Kuan y Ospina (1990) indican que cuando se trabaja en un medio líquido en agitación hay una mayor homogenización de las sustancias que componen el medio de cultivo, permitiendo una absorción más rápida de los nutrientes por parte del explante.

A los 22 días de colocadas las microestacas en el medio para inducción de raíces, se obtuvo un promedio de 13 raíces por frasco (a partir de 20 microestacas por frasco). Transcurrido un período de 37 días a partir de la siembra de las microestacas, se obtuvo un promedio de 20 raíces por frasco para un total de 750 raíces, en las cuales se diferenciaron claramente la caliptra, la zona de elongación y la zona de absorción.

Al realizar el bombardeo con las partículas de tungsteno, se observó una gran dispersión de las terminales radicales de vainilla sobre la superficie de la placa de Petri, del mismo modo que dentro de la cámara de bombardeo (Figura 2), lo cual podría atribuirse al impacto a corta distancia de la onda de choque generada por el gas helio y a la forma tubular característica de los explantes que pudo provocar que rodaran con mayor facilidad. Estas circunstancias probablemente provocaron una mayor contaminación y pérdida del material vegetal. Esta situación obligó a buscar medidas correctivas, como lo fue la incorporación de una tapa perforada de acero inoxidable sobre las placas de Petri, que permitió una menor dispersión de las terminales radicales bombardeadas y como consecuencia, una menor contaminación de estas.

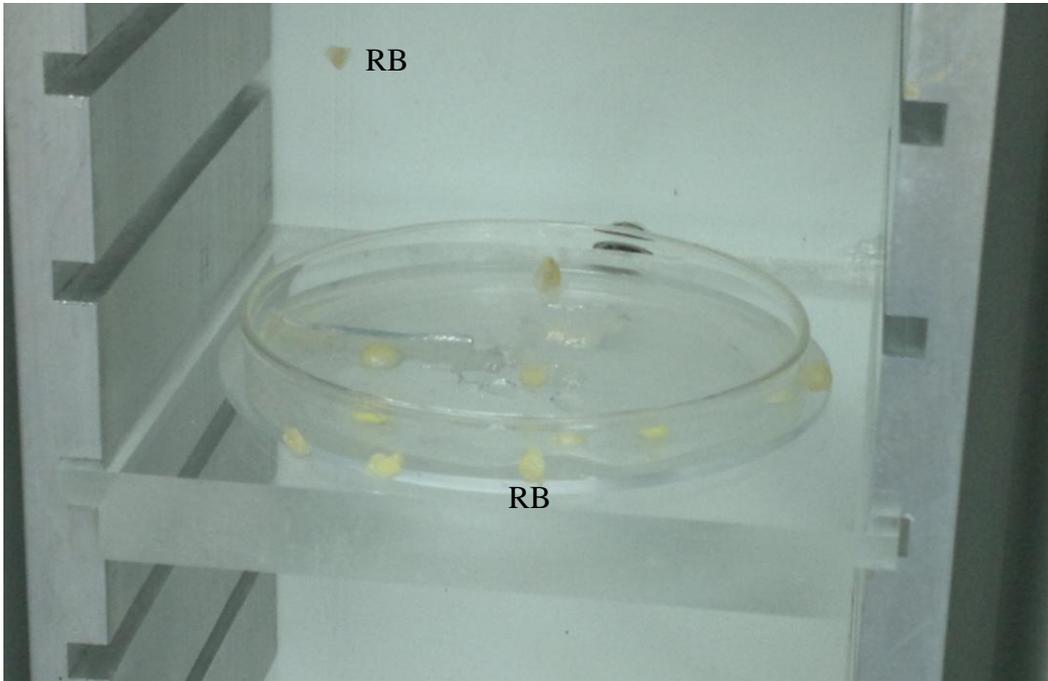


Figura 2: Dispersión de las terminales radicales de vainilla producto del bombardeo (RB: Raíces Bombardeadas).

Al valorar el porcentaje de formación de los PLBs a partir de meristemos radicales, se observó que tanto los controles como las terminales radicales bombardeadas con el plásmido, no presentaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) al utilizar el medio de cultivo con las dosis de 1 y 3 mg/L de BA a los 5 días (Figuras 3A y 3B, Figuras 4A y 4B, Figuras 5A y 5B) y 30 días (Figuras 3C y 3D, Figuras 4C y 4D, Figuras 5C y 5D) de la siembra. Estos porcentajes fueron del 70%. Después de crecer durante un mes en los medios de cultivo, se observó un engrosamiento de las terminales radicales y una prolongación en la parte superior de las mismas, lo cual podría indicar una respuesta inicial en la formación de los PLBs (Figuras 3C y 3D, Figuras 4C y 4D, Figuras 5C y 5D).

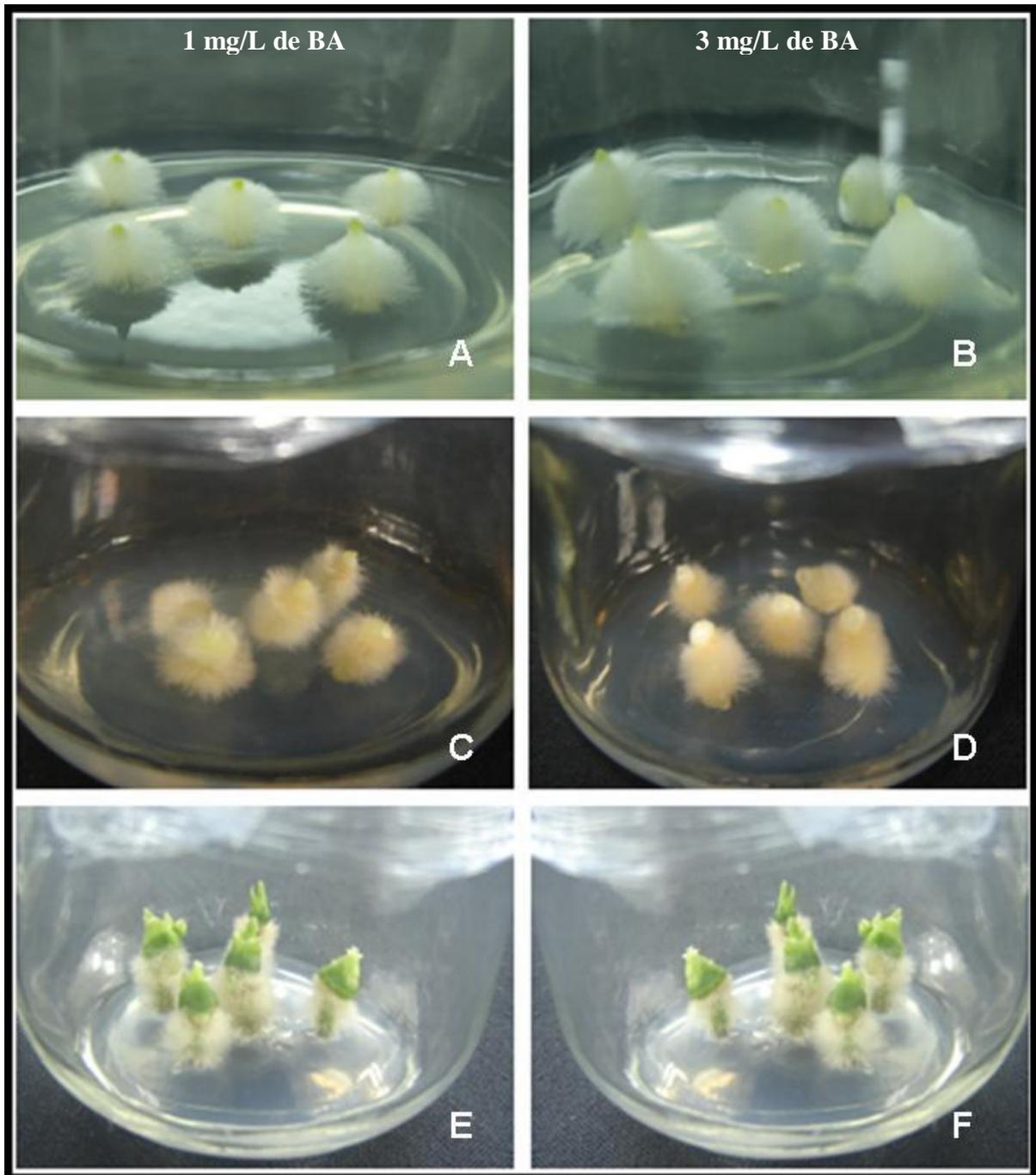


Figura 3. Terminales radicales de *V. planifolia* subcultivadas en el medio MS sólido suplementado con 1 y 3 mg/L de BA correspondientes al control sin medio osmótico. Terminales radicales a los 5 días de la siembra en medio suplementado con 1 mg/L (A) y 3 mg/L (B) de BA; a los 30 días en medio suplementado con 1 mg/L (C) y 3 mg/L (D) de BA y a los 90 días en medio suplementado con 1 mg/L (E) y 3 mg/L (F) de BA.

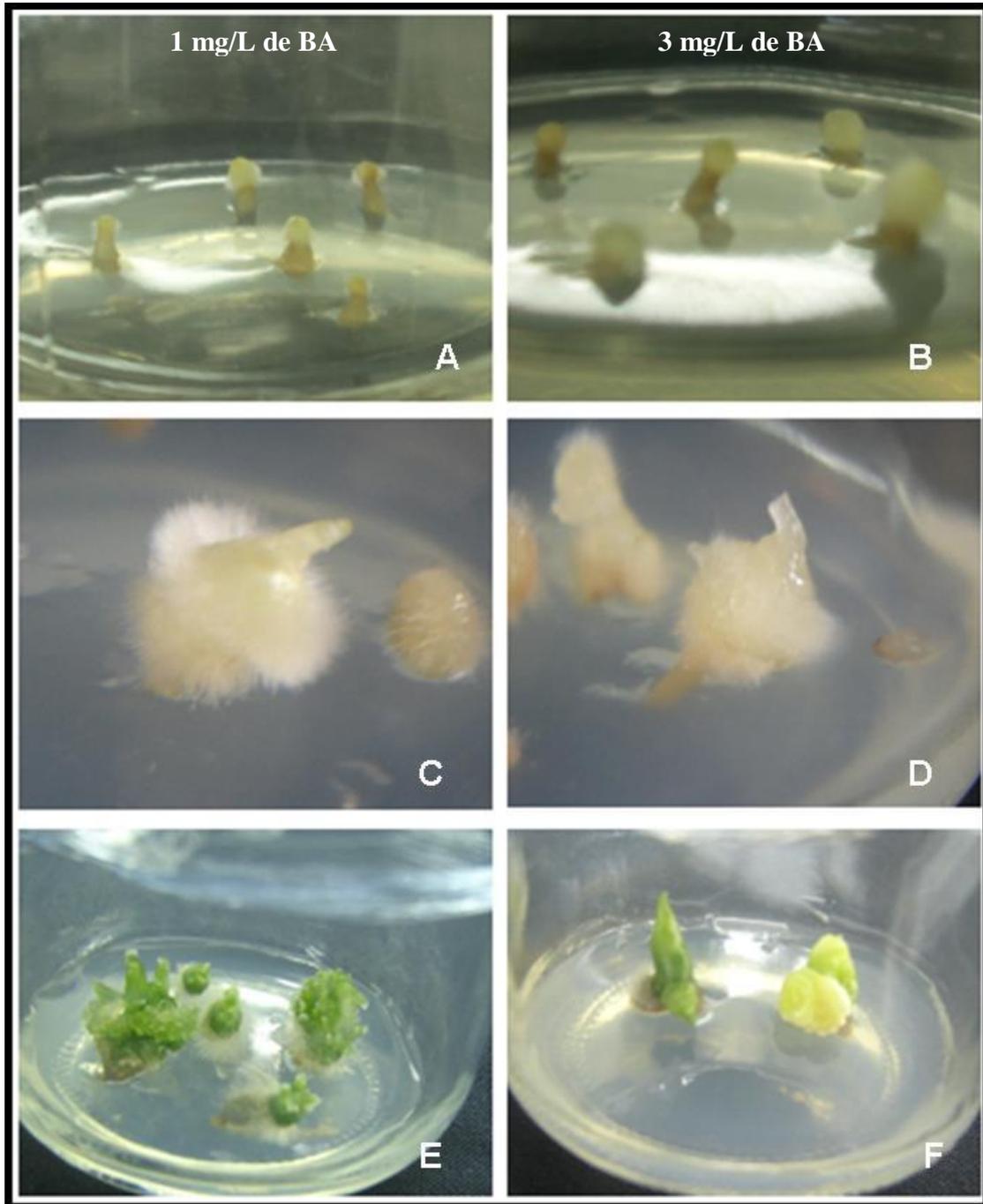


Figura 4. Terminales radicales de *V. planifolia* transferidas al medio osmótico y sembradas en el medio MS suplementado con 1 y 3 mg/L de BA correspondiente al control con medio osmótico. Terminales radicales a los 5 días de la siembra en medio suplementado con 1 mg/L (A) y 3 mg/L (B) de BA; a los 30 días en medio suplementado con 1 mg/L (C) y 3 mg/L (D) de BA y a los 90 días en medio suplementado con 1 mg/L (E) y 3 mg/L (F) de BA.

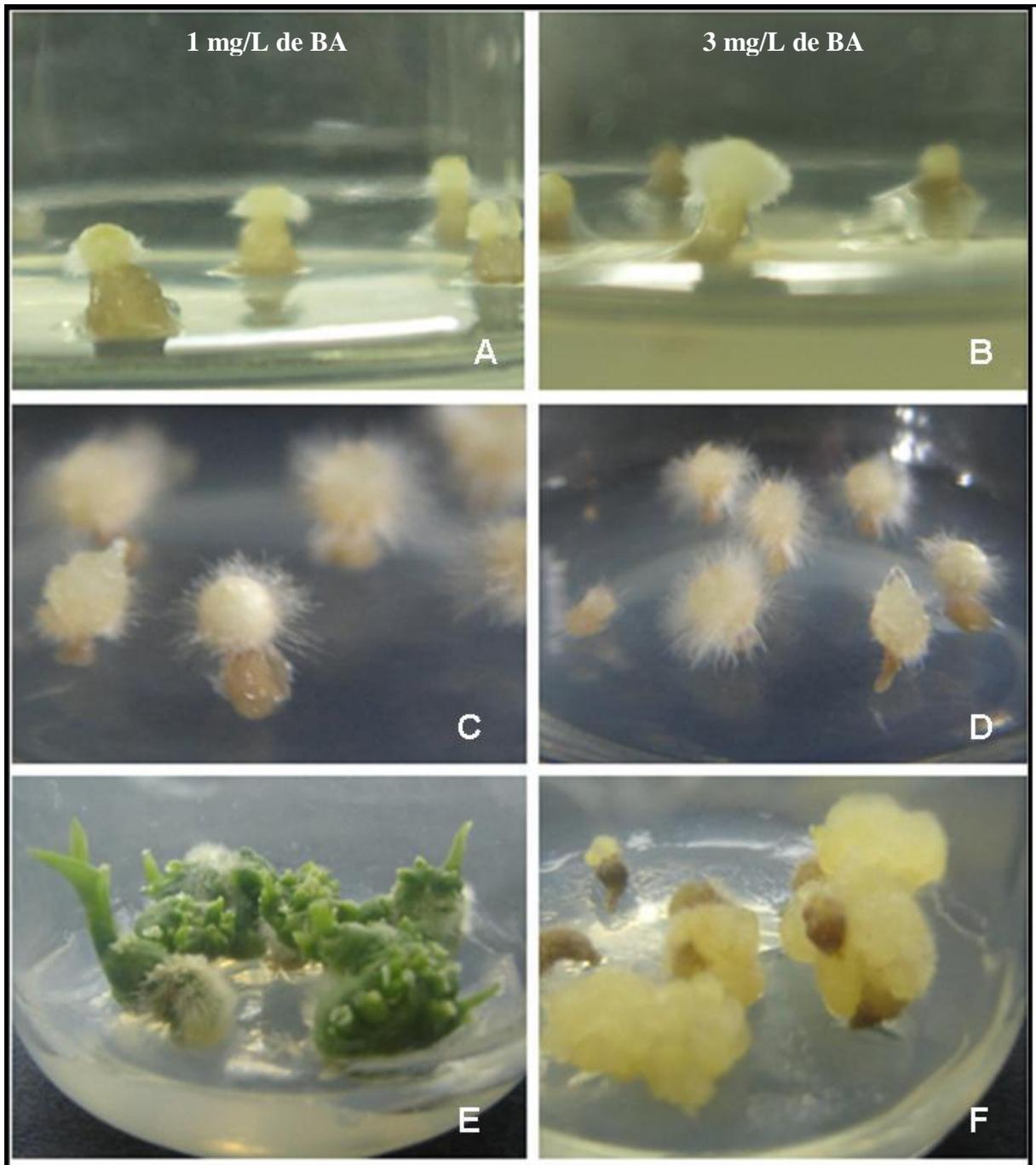


Figura 5. Terminales radicales de *V. planifolia* transferidas al medio osmótico, posteriormente bombardeadas con el plásmido y finalmente colocadas en medio MS suplementado con 1 y 3 mg/L de BA. Terminales radicales a los 5 días de la siembra en medio suplementado con 1 mg/L (A) y 3 mg/L (B) de BA; a los 30 días en medio suplementado con 1 mg/L (C) y 3 mg/L (D) de BA y a los 90 días en medio suplementado con 1 mg/L (E) y 3 mg/L (F) de BA.

Estas estructuras resultantes concuerdan con las desarrolladas en un estudio reportado por Philip y Nainar (1987), quienes al trabajar con terminales radicales de vainilla obtuvieron un engrosamiento de los explantes en un medio MS sólido a las tres semanas del cultivo. Por otro lado, Pierik (1990) destaca el papel que desempeña la auxina actuando conjuntamente con la citocinina en la reducción del tiempo de transformación de las terminales radicales a brotes, sugiriendo que el metabolismo de ambas hormonas está relacionado directamente con la regulación del proceso de crecimiento y maduración de los mismos. En otro estudio realizado por Geetha y Sudheer (2000), en el cual se subcultivaron microestacas de vainilla en diferentes tiempos durante un periodo de cuatro meses, se observó la proliferación de brotes verdes y grandes en un medio de cultivo suplementado con una baja concentración de citocinina (0.5 mg/L de BA). En nuestro experimento los explantes de vainilla pasaron por una serie de subcultivos que incluyen la inducción de raíces en el medio líquido, el subcultivo posterior de los meristemos radicales formados en el medio osmótico y finalmente la siembra de los mismos en el medio MS sólido suplementado con BA. De acuerdo a lo indicado anteriormente, es posible que la presencia de auxina endógena, la adición del BA al medio de cultivo, el efecto del medio regulador osmótico y el número de los subcultivos, pudieron haber acelerado el proceso de formación de PLBs a partir de las terminales radicales.

A los 90 días, las estructuras formadas a partir de las raíces del control sin medio osmótico y suplementadas con 1 y 3 mg/L de BA, aparentemente presentaron el mismo grado de desarrollo entre sí (Figuras 3E y 3F), mientras que las estructuras pertenecientes al control del medio osmótico, y las bombardeadas con el plásmido, presentaron diferencias morfológicas apreciables, a las mismas concentraciones indicadas anteriormente (Figuras 4E y 4F, Figuras 5E y 5F). Podría ser que una dosis baja de BA (1 mg/L), sea suficiente para que las terminales radicales de *V. planifolia* induzcan la formación de estructuras tipo PLB que conducen a su vez a la formación de brotes diferenciados y de color verde. Adicionalmente, diferentes estudios en vainilla han determinado que la dosis de 1 mg/L de BA es apta para la proliferación de los explantes en el medio de cultivo, un ejemplo se presenta en una investigación realizada por Kalimuthu *et al.* (2006), que al estudiar el efecto de diferentes dosis de BAP, entre ellas 1 y 3 mg/L, determinaron que la

concentración de 1 mg/L permitió el mayor porcentaje de brotes de vainilla con mayor elongación.

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación, es factible utilizar meristemos radicales de vainilla para la transformación genética de esta especie, debido principalmente a su potencial para generar estructuras con alta capacidad de proliferación como los PLBs. No obstante, debido a las características observables en la estructura originada a partir del meristemo radical que conduce a la formación del PLB (estructura intermedia), esta podría ser un explante más apropiado para intentar realizar la transformación genética de *V. planifolia*. Las características que hacen a dicha estructura más apta para la transformación, incluyen su alta capacidad de generación de brotes de forma directa y el bajo grado de diferenciación celular de los tejidos (Figuras 3C y 3D, Figuras 4C y 4D, Figuras 5C y 5D).

A las 48 horas de realizado el bombardeo, las terminales radicales bombardeadas con el plásmido y las terminales radicales de los tres controles se colocaron en la solución reveladora de X-Gluc y después de 24 horas de incubación con el sustrato enzimático se observó que tanto los explantes correspondientes a los tres controles como las terminales radicales bombardeadas con el plásmido presentaron un patrón de coloración celeste azulada en la parte superior de la epidermis (Figura 6).

Por otra parte a las 48 hr se identificó también un posible evento de expresión transitoria en una terminal radical de *V. planifolia* expuesta al tratamiento correspondiente a la presión de 80 psi/8.0 cm (Figura 6A). Cuando se repitió la prueba de tinción histoquímica con el agente revelador X-Gluc a las 2 semanas de realizados los disparos, tanto para los explantes no bombardeados en medio osmótico como para el material bombardeado con el plásmido (en todas las condiciones experimentales), se observó una coloración celeste azulada evidente en la parte superior de la estructura formada y en la parte central de la región interna de la misma estructura (Figuras 6D y 6E).

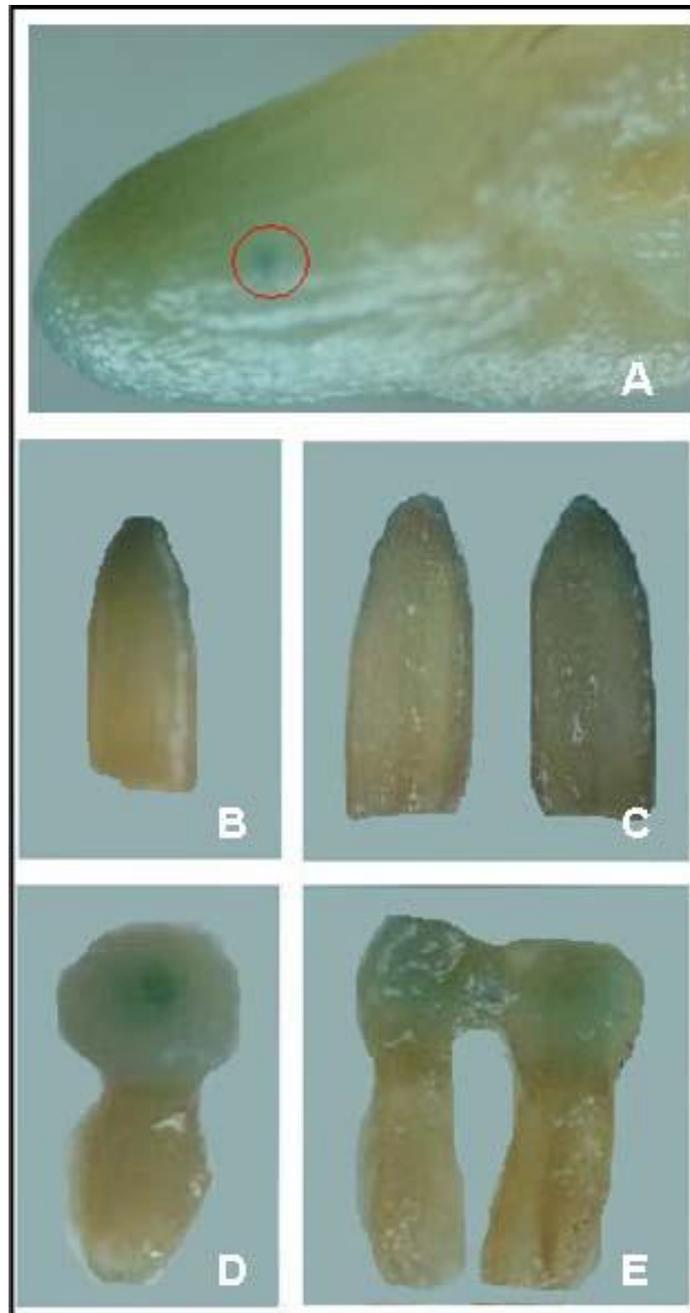


Figura 6. Punto de expresión transitoria de la enzima β -glucuronidasa en una terminal radical de *V. planifolia* a las 48 h de bombardeo, a una presión de 80 psi y una distancia de 8 cm (A). Coloración presente en la epidermis correspondiente a la región apical en una raíz de vainilla (B) y corte longitudinal de una terminal radical cuyo tejido interno no presentó tinción (C) a las 48 horas del bombardeo. Tinción en la región en desarrollo de la terminal radical de vainilla (D) y en el corte longitudinal de una terminal radical en la región interna en desarrollo (E) a las 2 semanas del bombardeo.

La coloración observada podría deberse a una tinción inespecífica, causada posiblemente por la actividad β -glucoronidasa endógena. Al respecto, en una serie de trabajos de transformación genética llevados a cabo en diversos cultivos, se detectó la actividad de la misma, tal es el caso de Serres *et al.* (1997), que identificaron una enzima β -glucoronidasa endógena en las hojas y raíces no transformadas de papa. Del mismo modo, Wozniak y Owens (1994), identificaron una enzima endógena en callos y peciolo de remolacha (*Beta vulgaris* L.). Así mismo, De Turck *et al.* (2002), identificaron una enzima endógena en un ensayo de transformación genética también en cultivos de papa.

Por otro lado, el papel del regulador de crecimiento BA adicionado al medio de cultivo, junto con la auxina endógena en los explantes, posiblemente fueron responsables de inducir una mayor actividad en la región meristemática de las terminales radicales, e igualmente podrían estar relacionados con la actividad de una enzima β -glucoronidasa endógena del tejido, evidencia que presentó un estudio realizado por Krasnyanski *et al.* (2001), quien determinó que hay una relación directa entre la actividad celular y la respuesta inespecífica de una enzima β -glucoronidasa en arándanos (*Vaccinium macrocarpon* Ait) y tomate (*Lycopersicon esculentum*). Sudan *et al.* (2006), detectaron una tinción celeste en las raíces de mostaza (*Brassica juncea*) y fibras de algodón (*Gossypium hirsutum*) durante la fase de crecimiento del tejido. De la misma manera, Stangeland y Salehian (2002) detectaron una enzima β -glucoronidasa endógena en los tejidos de la planta *Arabidopsis thaliana* durante su crecimiento activo.

Según Sasaki *et al.* (2000), la presencia de factores estresantes desencadenan la activación de una enzima β -glucoronidasa en hojas, flores y raíces de diferentes especies, tales como *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), alfalfa (*Medicago sativa*), guisante (*Pisum sativa*) y en escutelaria china (*Scutellaria baicalensis* Georgi). Estos resultados podrían explicar en principio la coloración celeste azulada identificada en los explantes bajo estudio, lo anterior debido a que los materiales vegetales se sometieron a condiciones de estrés, como lo fueron, el subcultivo de las microestacas de vainilla del medio sólido al medio líquido para la producción de las raíces, posteriormente el subcultivo de las terminales radicales al

medio osmótico, el bombardeo con las micropartículas y por último la siembra de los explantes en el medio de cultivo sólido suplementado con BA. Esta sería la primera vez que se reporta la presencia de actividad β -glucoronidasa endógena en materiales *in vitro* de vainilla.

La supervivencia de las terminales radicales a las 2 semanas posteriores al bombardeo se vio afectada por la presencia de hongos, oxidación y una exudación blanquizca en la base de los explantes. En el caso de los controles evaluados, el resultado para el control sin medio osmótico fue de un 100% de supervivencia. El control del medio osmótico presentó un 60% de supervivencia y en este tratamiento las terminales radicales se vieron afectadas por la presencia de oxidación y contaminación por exudación. El control de bombardeo presentó 0% de supervivencia, el cual fue afectado por contaminación por hongos y bacterias presentes en el exudado y oxidación del tejido vegetal (resultados no mostrados). En el caso de los tratamientos bombardeados con el plásmido, a las 2 semanas de evaluación, la presencia de los hongos provocó la pérdida total de las terminales radicales en los tratamientos correspondientes a la presión de 80 psi, tanto a la distancia de 5.5 cm como a la distancia de 8.0 cm (resultados no mostrados). A la presión de 100 psi, a las distancias de 5.5 cm y 8.0 cm se obtuvo un 40% y un 38% de supervivencia, respectivamente, mientras que en los tratamientos correspondientes a la presión de 110 psi, a las distancias de 5.5 cm y 8.0 cm se obtuvo un 45% y un 43% de supervivencia, respectivamente (Figura 7).

Existe una relación directa entre el orden de los disparos y el porcentaje de contaminación por hongos, ya que las primeras placas bombardeadas correspondieron a los controles del bombardeo, seguidas por las placas bombardeadas con el plásmido a la presión de 80 psi a las distancias de 5.5 cm y 8.0 cm. Seguidamente se bombardearon las placas correspondientes a la presión de 100 psi a las distancias de 5.5 cm y 8.0 cm obteniendo un 39% y un 31% de contaminación por hongos, respectivamente y por último las placas correspondientes a la presión de 110 psi a las distancias de 5.5 cm y 8.0 cm obteniéndose un 25% y un 23% de contaminación por hongos, respectivamente (Figura 7).

En este sentido, la contaminación con hongos podría originarse probablemente en las mangueras que conducen al cañón de disparo del equipo de biobalística.

También se observó oxidación en las terminales radicales de vainilla una vez que estas fueron subcultivadas en medio osmótico (Figura 7). Es posible que los componentes de este medio (manitol y sorbitol), así como el estrés del bombardeo, alteraran el metabolismo celular de los explantes. Aunado a esto Lee *et al.* (1982), señalan que el ácido cumárico y la vainillina, estimulan la oxidación del ácido indolacético (AIA), en condiciones de estrés. Por otro lado, esta oxidación se acentuó cuando los explantes fueron expuestos a la solución reveladora del X-Gluc dos semanas posterior al bombardeo. Por otra parte, Krasnyanski *et al.* (2001), afirman que la presencia de las sustancias fenólicas podrían inhibir la actividad de la enzima β -glucoronidasa, tal como lo comprobaron en un estudio de transformación genética utilizando hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). De acuerdo a lo anterior y dado los porcentajes de oxidación observados, esta circunstancia pudo haber afectado los resultados de la tinción histoquímica con el X-Gluc para las terminales bombardeadas con el plásmido.

En la Figura 7 se observa que los resultados obtenidos para la presencia de exudación en las terminales radicales de los tratamientos bombardeados con el plásmido, muestran porcentajes similares entre sí, esto debido probablemente al efecto provocado por el medio regulador osmótico sobre los explantes ocasionándoles un choque osmótico y como resultado la presencia de un exudado blancuzco en la base de los mismos. Las terminales radicales correspondientes al control sin medio osmótico no presentaron exudación, a diferencia de las terminales radicales del control con medio osmótico y las bombardeadas con el plásmido, en las cuales los explantes presentaron la exudación blancuzca, posiblemente de origen bacteriano. Cabe destacar que en estudios previos realizados en este laboratorio, se observó un exudado bacteriano en microestacas de vainilla cultivadas *in vitro*, muy similar al exudado presente en las terminales radicales. El análisis microbiológico realizado a partir de estos exudados (realizado en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica), identificó la presencia de

una bacteria endofítica, perteneciente al género *Pantoea* (comunicación personal del Ing. Tomás Palma).

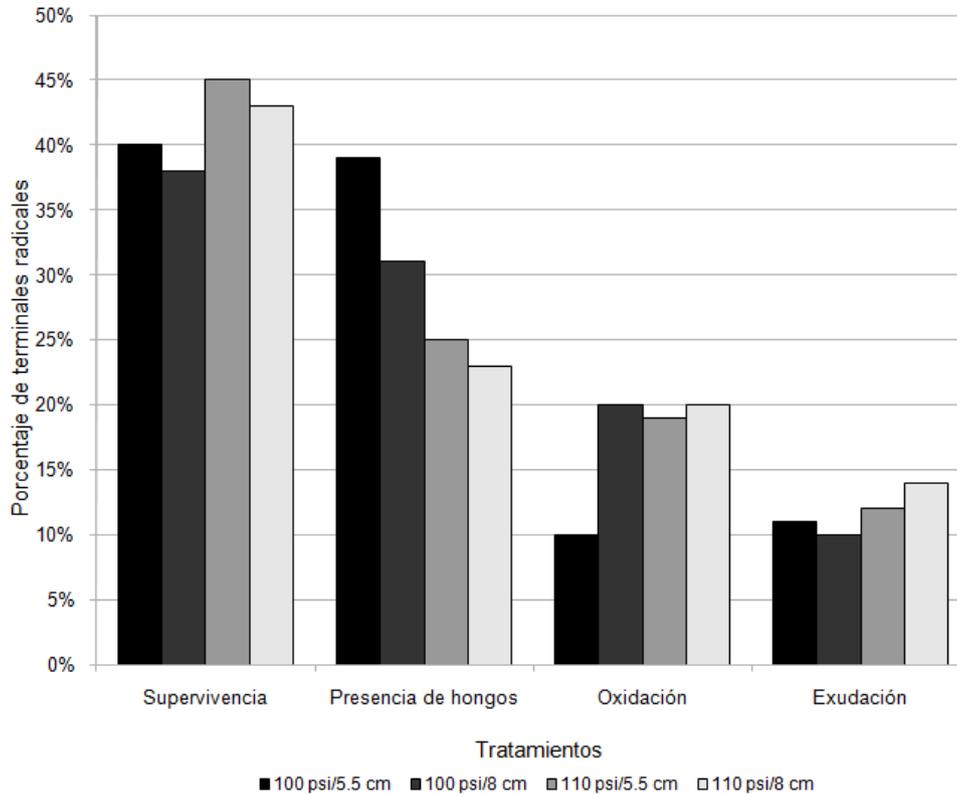


Figura 7. Porcentajes de supervivencia, presencia de hongos, oxidación y exudación en las terminales radicales de *V. planifolia*, 2 semanas después del bombardeo.

Para las pruebas de transformación realizadas mediante el procedimiento SALIC se realizaron bombardeos mediante dos diferentes presiones (80 y 110 psi) y a tres distancias (3, 9 y 15 cm). Estas condiciones se evaluaron tanto con tungsteno como con los liposomas con el fin de comparar los sistemas de transformación. De esta manera, se logró apreciar una mejoría en la supervivencia presentada por los explantes bombardeados con liposomas cristalizados (hasta 64%) en comparación a los resultados obtenidos por el tungsteno (hasta 27%). El porcentaje mayor de contaminación observado en los explantes bombardeados con tungsteno se relacionó a la presencia de exudados, probablemente bacterianos, causados por el estrés osmótico al cual fueron sometidos los explantes para el proceso de bombardeo. En el caso de los liposomas cristalizados el principal contaminante detectado

fue la aparición de hongos los cuales se atribuyeron al proceso de manipulación inherente a la colocación del sistema de enfriamiento desarrollado para mantener los liposomas cristalizados (Figura 8). Es importante recalcar que con forme la distancia de disparo fue mayor, el porcentaje de contaminación causada en el bombardeo con tungsteno fue mayor (resultados no mostrados). Caso contrario a los resultados obtenidos en los bombardeos con liposomas cristalizados, en donde a mayor cercanía del dispositivo de enfriamiento mayor fue el grado de contaminación por hongo apreciado (resultados no mostrados).

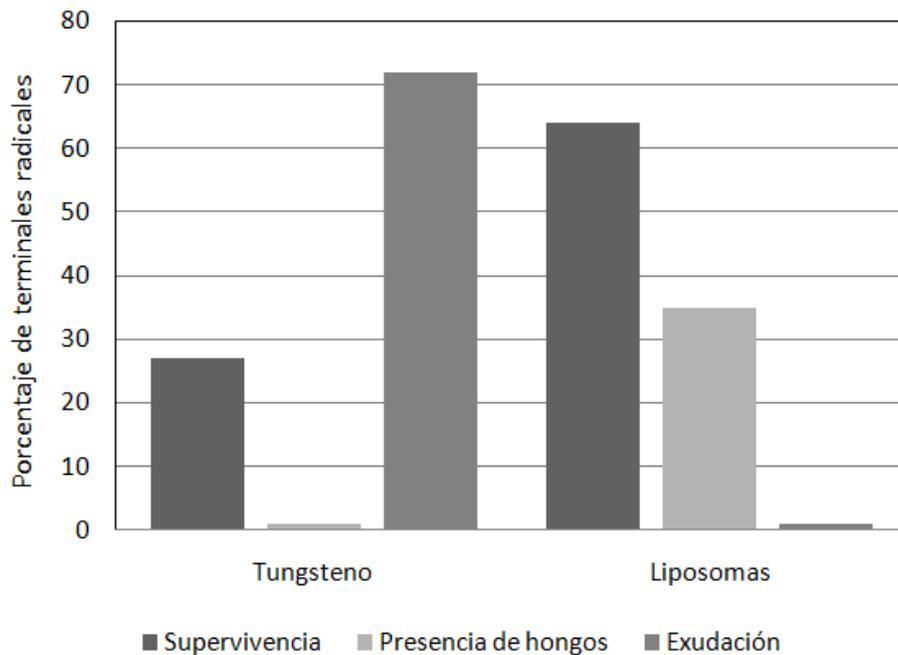


Figura 8. Porcentajes de supervivencia, presencia de hongos y exudación en las terminales radicales de *V. planifolia*, 2 semanas después del bombardeo con los dos protocolos a evaluar.

El daño mecánico y el estrés causado por el bombardeo con las partículas de tungsteno pudieron facilitar la expresión de exudados en los materiales bombardeados lo que permitiría explicar la pérdida de dichos explantes a causa de la contaminación probablemente producida por bacterias endógenas al material utilizado. Para el caso de los liposomas cristalizados, la cercanía al sistema de enfriamiento y la manipulación necesaria cuando se prepara el sistema para el bombardeo podrían haber facilitado la aparición de hongos.

Posterior a las 48 horas del bombardeo, se realizó el análisis de la expresión transitoria. En ninguno de los explantes bombardeados (tanto con tungsteno como con liposomas cristalizados) se presentó muestra de cambios significativos en la coloración producto de la expresión transitoria del gen marcador GUS. No obstante se observó en algunos de los explantes tinción inespecífica azulada en todos los tratamientos incluyendo al tratamiento control, de forma similar a la observada en las pruebas de transformación realizadas con meristemas radicales de vainilla. La falta de tinción azul debido a la expresión transitoria del gen marcador en los tejidos bombardeados, se atribuye probablemente a que el vector de transformación utilizado no contenía el gen marcador GUS. Esto debido a que no se contaba con un mapa detallado del vector de transformación genética.

Aún con el inconveniente de la ausencia de actividad β -glucoronidasa en el vector utilizado, este estudio permitió establecer un protocolo para el bombardeo mediante liposomas cristalizados como vectores de transformación genética los cuales podrían mejorar la eficiencia del proceso de transgénesis.

Agradecimientos

Los investigadores agradecen a Juan Luis Ortiz (CATIE) por su apoyo en la realización de este trabajo. Este trabajo de investigación fue financiado por la Vicerectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica por medio del proyecto No 5402-2160-2701.

Bibliografía

1. BECKER DK., BUGDALE B., SMITH MK., HARDING RM., DALE JL. 2000. Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa spp.* AAA group) cv “Gran Nain” via microprojectile bombardment. *Plant Cell Report* 19:229-234.
2. DEQUAIRE J. 1976. L’amelioration du Vaniller a Madagascar. *Journal Agriculture Tropicale et Botanique Appliquee* 23:12-13.
3. DE TURCK S., GIORDANENGO P., CHERQUI A., DUCROCQ-ASSAF C., SANGWAN-NORREEL B. 2002. Transgenic potato plants expressing the *nptII-gus* marker genes affect survival and development of the Colorado potato beetle. *Plant Science* 162:373–380.
4. GEETHA S., SUDHEER SA. 2000. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Current Science*. 79(6):886-888.
5. KALIMUTHU K., SENTHILKUMAR R., MURUGALATHA N. 2006. Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andr. a tropical orchid. *Research communication*. 91(10):1401-1403.
6. KRASNYANSKI SF., SANDHU J., DOMIE LL., BUETOW DE., KORBAN SS. 2001. Effect of an enhanced CAMV 35s promoter and a fruit-specific promoter on *uid A* expression in transgenic tomato plants sergei f. krasnyanski. *Vitro Cell* 37:427-433.
7. KUAN C., OSPINA I. 1990. Introducción a la técnica de cultivo de tejidos. Departamento Técnico Agropecuario. Instituto Nacional de Aprendizaje. San José, Costa Rica. 86 p.
8. LEE T., STARRATT A., EVNIKAR JJ. 1982. Regulation of enzymic oxidation of indole-3 acetic acid by phenols: structure-activity relationships. *Phytochemistry* 21:517-523.
9. MALABADI R.B., NATARAJA K. 2007. Genetic transformation of *Vanilla planifolia* by *Agrobacterium-tumefaciens* using shoot tip sections. *Research Journal of Botany* 2(2):86-94
10. MIRANDA ZH. 2003. Evolución de la eficacia biológica (*in vitro*), de una cepa de hongo antagonista *Trichoderma harzianum*, en el control de la fusariosis, (*Fusarium spp.*) de la vainilla. Alianza tecnológica para la agricultura nacional. San José, Costa Rica 36 p.
11. MONTURIOL S. 2007. Campus Vainilla, Parcelaros de la Cruz apuestan a su cultivo. Oficina de Comunicación Universidad Nacional Heredia, Costa Rica. 7 p.
12. MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised médium for rapid growth and biossay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. Dinamarca. 15:437-497.
13. NAVARRO J.G. 2000. Plan Colombia ABC de una tragedia. Cap IV-1. Ediciones Zitra. 1 p.
14. NAVARRO W., PEREA M. 1996. Técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. 2 ed. Editorial de la Universidad Nacional (EUNA). Heredia, Costa Rica. 105 p.

15. ORTIZ VJ. 2001. Desarrollo de una metodología para la transformación genética de banano (cv Gan Enano) y plátano (cv Curraré) de consumo local para introducir resistencia a la Sigatoca negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Tesis M.Sc. Turrialba, CR. Centro agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 60 p.
16. RADDAMPALLI V.S., LANKSHMANAN V. AND NEELWARNE B. 2007. Genetic Fidelity of long' term micropropagated shoot cultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) as assessed by molecular markers. *Biotechnology Journal* 2: 1-7.
17. PARRA Q. 1987. Cultivo *in vitro* y anatomía de óvulos de vainilla (*Vainilla planifolia* Andrews). Tesis. M.Sc. Fruticultura. Colegio de Post graduados. Chapando. México. 104 p.
18. PHILIP V.J., NAINAR AZ. 1987. *In vitro* transformation of root meristems to shoot and plantlets in *Vanilla planifolia*. *Ann. Bot.* 61:193-199.
19. PHILIP V.J., NAINAR AZ. 1988. Structural changes during the *in vitro* germination of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 61(2):139-146.
20. PIERIK RL. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid: Mundi-Prensa. 301 p.
21. PUPULÍN FA., QUESADA G. 1999. Un nuevo siglo de orquídeas. Resumen del plan de asesoría y manejo para la conservación de orquídeas de Costa Rica. San José, Costa Rica. 72 p.
22. RIVERA G. 1996. Enfermedades comunes de la vainilla (*Vanilla planifolia*). Universidad Nacional. Año 15. No. 58. (Boletín Agrario) 1 p.
23. SASAKI S., TAURA F., SHOYAMA F., MORIMOTO S. 2000. Molecular characterization of a novel β -Glucuronidase from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biology Chemistry* 275 (35): 466-472.
24. SERRES R., MCCOWN B., ZELDIN E. 1997. Detectable, β -glucuronidase activity in transgenic cranberry is affected by endogenous inhibitors and plant development. *Plant Cell Reports* 16 (9):641-646.
25. SUDAN CH., Prakash S., Bhomka P., Jain S., Bhalla-Sarin N. 2006. Ubiquitous presence of β -glucuronidase (GUS) in plants and its regulation in some model plants. Springer Berlin/ Heidelberg. *Planta* 224 (4):853-864
26. STANGELAND B., SALEHIAN Z. 2002. An Improved Clearing Method for GUS Assay in *Arabidopsis* Endosperm and Seeds. *Plant Molecular Biology Reporter*. 20:107–114.
27. WOZNIAK CH., OWENS LD. 1994. Native β -glucuronidase activity in sugarbeet (*Beta vulgaris*). *Physiologia Plantarum* 90 (4):763–771.

ANEXO

Optimización del Sistema de Aceleración de Liposomas Cristalizados (SALIC)

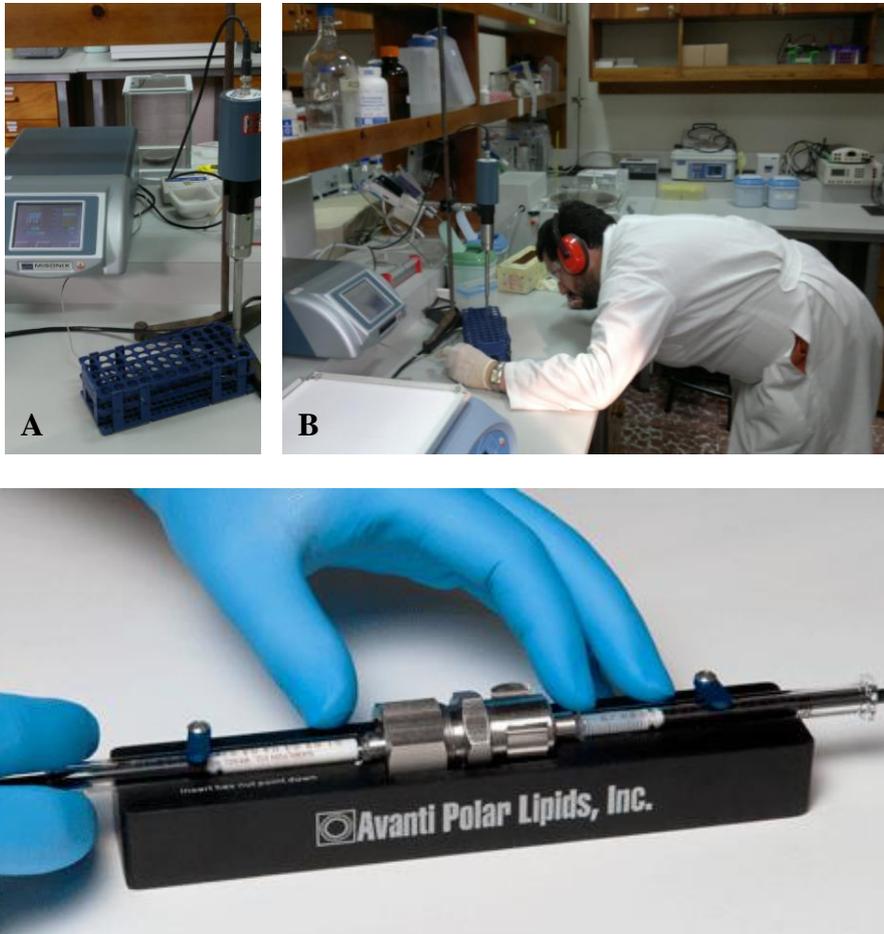


Figura 1A. Preparación de los liposomas a partir de lecitina natural (A: Sonicador de punta; B: Uso del Sonicador; C: Miniextruder).

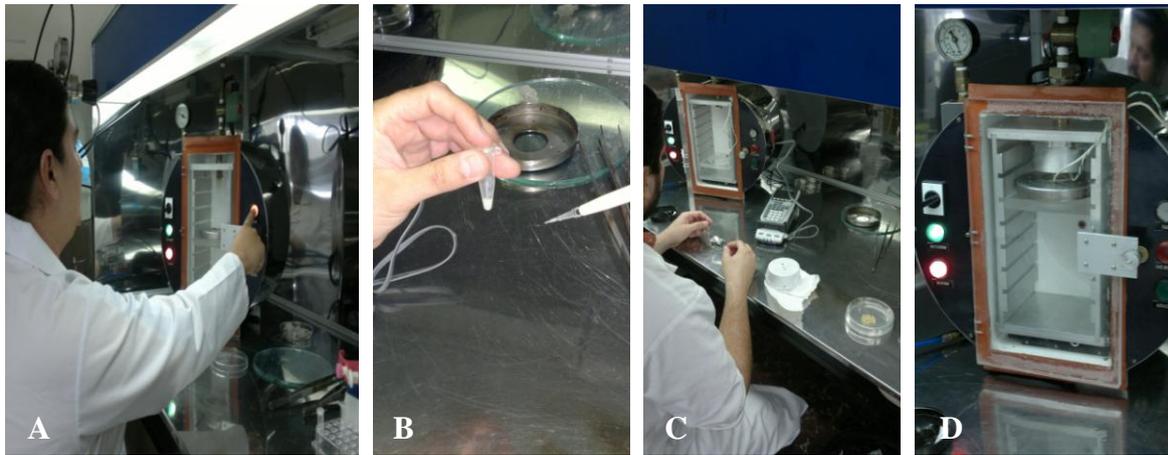


Figura 2A. Bombardeo de explantes (A: Bombardeo tradicional; B: Muestra de Liposomas Cristalizados; C: Preparación del Sistema de Enfriamiento; D: Sistema de Bombardeo SALIC).

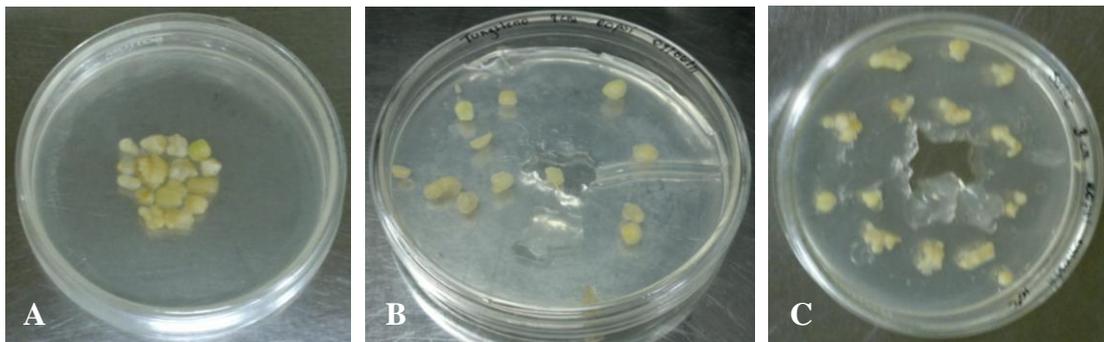


Figura 3A. Comparación del estado de los explantes posterior al Bombardeo (A: Explantes antes del bombardeo; B: Explantes bombardeados tradicionalmente; C: Explantes bombardeados mediante SALIC).