

EVALUACIÓN DEL PROMOTOR DE LA LEGÚMINA 11S DEL ENDOSPERMA DEL CAFÉ EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TABACO

Ricardo Acuña, Diana Molina y Claudia Velázquez

RESUMEN

La principal proteína del endosperma del café pertenece a la familia de las leguminas 11S y el promotor del gen que la codifica controla su expresión específicamente en el endosperma de la semilla. Con el propósito de evaluar si este promotor controla de la misma forma la expresión de un gen heterólogo en plantas de tabaco se amplificaron, por PCR, dos fragmentos del promotor entre las posiciones -418 y -901, respectivamente, y el sitio de inicio de la transcripción (+1) del gen de la legumina 11S del café. Cada fragmento se clonó en vectores de transformación colocándolos en posición 5' del gen de la β -glucuronidasa. Los vectores se introdujeron, individualmente, en cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, las cuales, posteriormente, se usaron para transformar hojas de *Nicotiana benthamiana*. Se regeneraron plantas transgénicas de tabaco que se llevaron por autofecundación hasta la producción de semilla y se analizó la actividad del gen *uidA* en hojas y semillas. Los fragmentos de 450 y 930 (pb) del promotor de la legumina del café controlaron específicamente la expresión del gen en el endosperma de plantas transgénicas de tabaco, siendo mejor la actividad con el fragmento de mayor tamaño. No se observó actividad del gen en las hojas de estas plantas. Ensayos histoquímicos confirmaron estos resultados lo que permitiría usar dichos fragmentos para controlar la expresión de genes heterólogos, involucrados en la resistencia a la broca, en el endosperma de la semilla de café que es el tejido atacado por esta plaga.

Palabras clave: café, leguminas 11S, transformación.

SUMMARY

The major storage protein of the coffee bean is a legumin-like 11S protein and the promoter of the gene which code it regulates its expression specifically into the endosperm of the seed. In order to evaluate if the coffee promoter also controls the expression of heterologous genes into the endosperm of tobacco seeds, we amplified two fragments corresponding to the region -901 and -418 to +1 upstream of the coffee legumin gene, respectively. Each fragment was cloned in forward orientation into the promoterless *GUS* cassette *p1391z*. The vectors constructions were individually transferred to the disarmed *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 by electroporation. Tobacco (*Nicotiana benthamiana*) was transformed with each one of the LBA4404 derivatives by the leaf disc transformation method. Transgenic plants were self-pollinated and the seeds and the leaves were analyzed for *GUS* activity. Both promoter fragments drive significant *GUS* expression in the seeds of transgenic tobacco; the level of activity was higher with the larger fragment-construction than the shorter one. Histochemical assays confirmed the biochemical activity. These promoter fragments will be used to drive the expression of heterologous genes, involved in resistance to coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*), into the endosperm of coffee bean which is the tissue attacked by the insect.

Key words: coffee, legumin-like 11S, transformation.

INTRODUCCIÓN

La biotecnología vegetal ofrece los medios para dirigir la expresión genética de manera tal que se produzcan las características deseables en especies vegetales transgénicas. Esto se hace por medio de la reprogramación de la maquinaria responsable de la expresión de los genes en las plantas para ajustarla a necesidades específicas. La intervención puede hacerse ya sea para intensificar como para disminuir la actividad de un gen y tales manipulaciones deben ser muy precisas de manera que cumplan los requisitos biológicos y de bioseguridad (Panda & Khush, 1995).

Los segmentos de ADN que preceden la región codificadora de un gen contienen unas secuencias de nucleótidos denominadas *promotores* o *elementos reguladores* que son responsables del control, tanto espacial como temporal, de la expresión genética. Estos elementos son empleados con el propósito de manipular dicha expresión en una planta transgénica. (Roeder, 1996; Kornberg, R. 1996)

Recientemente se identificó y se aisló la región promotora correspondiente al gen de la principal proteína de reserva del endosperma del café (Acuña *et. al.* 1999). Esta región es la que regula en forma muy precisa el estado de desarrollo y la cantidad de proteína que se debe sintetizar en el endosperma del café. La caracterización de la regulación de esta región promotora, mediante la transformación genética de plantas modelo como el tabaco, permitirá conocer las secuencias de DNA específicas que determinan dicha regulación en el café.

MATERIALES Y MÉTODOS

Vectores de transformación

La construcción de los vectores de transformación con los diferentes fragmentos del promotor de la legumina 11S del café se hizo utilizando el plásmido *pCAMBIA/1391z*. La región del T-DNA de este plásmido incluye el gen reportero *uidA* que codifica la proteína b-

glucoronidasa (GUS) y el gen marcador higromicina fosfotransferasa (*hpt*). El gen reportero *uidA* permite realizar el análisis de la expresión genética en plantas transformadas dependiendo del promotor que se inserte en el sitio de policonaje del plásmido (Figura 1). El gen de selección (*hpt*) está bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S) y permite la selección con higromicina de las células transformadas. En el sitio de policonaje *HindIII/NcoI* se ligó, un fragmento de 901 pb (*p1391z/RAZ-930*) y otro de 418 pb (*p1391z/RAZ-450*), respectivamente, correspondientes a la región 5' no-transcrita del gen de la legumina 11S del café (Figura 6). Estos fragmentos fueron obtenidos por PCR usando como iniciadores de la reacción secuencias específicas de la región 5' no transcrita del gen a las cuales se adicionó los sitios de restricción *Hind III* y *NcoI*. Cada uno de los vectores construidos fueron insertados por electroporación en *E.Coli* (cepa DH10B), amplificados por cultivo de la bacteria a 37°C en medio LB suplementado con kanamicina (100 µg/ml) y recuperados por extracción del DNA plasmídico usando el kit de purificación de Qiagen. La autenticidad de las secuencias amplificadas de cada uno de los fragmentos fueron verificadas por secuenciación.

En paralelo con estos experimentos se utilizó como control positivo el plásmido *pCAMBIA/1301* cuya región del T-DNA es idéntica a la del plásmido *p1391z* sino que en éste el gen reportero *uidA* se encuentra regulado por el promotor constitutivo 35S. Como control negativo se utilizó el vector *pCAMBIA/1391z* original, que tiene en la región del T-DNA el gen reportero *uidA* pero sin el control de promotores. Los plásmidos fueron proporcionados por el Centro de Aplicación de Biología Molecular para Agricultura Internacional (CAMBIA, Canberra, Australia).

Transformación de *Agrobacterium* con los vectores de transformación

Cada uno de los vectores de transformación, *p1301*, *p1391z*, *p1391z/RAZ 901* y *p1391z/RAZ 418* se introdujeron por electroporación

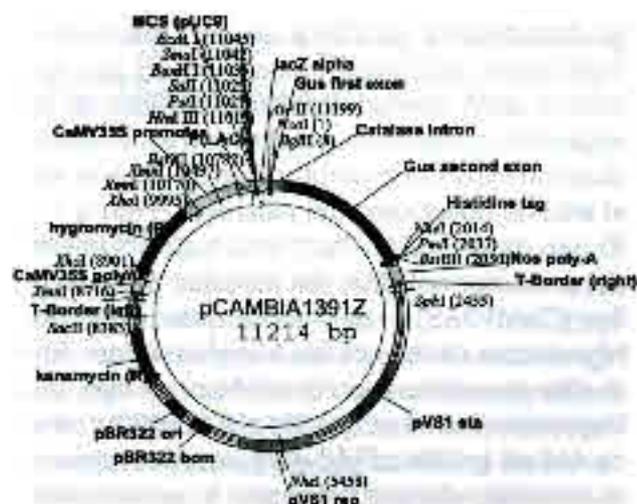


Figura 1. Mapa del plasmido *pCambia/1391z* utilizado para insertar los diferentes fragmentos del promotor del gen de la legumina 11S del café y posteriormente introducido a plantas de tabaco por transformación genética medida por *Agrobacterium tumefaciens*. El sitio de policlonaje HindIII/Nco I fue escogido para insertar los respectivos fragmentos. Ver detalles en el texto.

en la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 de acuerdo al siguiente protocolo. Se tomaron 20 μ L de células electrocompetentes de *A. tumefaciens* LBA 4404 y se mezclaron en una celda de electroporación con 50 ng de plasmido. Una vez descargado el impulso eléctrico (2.5 kV., 25 μ F, 200 Ω) se adicionó 1 ml de medio nutritivo SOC (Gibco, USA) y se incubaron a 28°C durante 1 hora. Luego las células se dispersaron sobre un medio de cultivo LB con Kanamicina (100 μ g/ml) y se incubaron a la misma temperatura durante dos días. Con un palillo estéril se seleccionó una colonia y se inoculó en 75 ml de medio YM con kanamicina (100 μ g/mL). El cultivo se incubó en agitación (100 rpm) a 28°C durante toda la noche. Al día siguiente se tomaron 5 ml de la suspensión bacteriana y se transfirieron a 150 ml de medio YM (Gibco, USA) con Kanamicina. El cultivo se incubó a 28°C en

agitación (100 rpm) durante toda la noche. Finalmente se hizo un stock de glicerol de cada cepa recombinante y se guardaron a -70°C.

Transformación genética de tabaco

Material vegetal: Se germinaron en el invernadero semillas de *Nicotiana benthamiana* y se recolectaron hojas jóvenes pero bien desarrolladas las cuales se desinfectaron en una solución de clorox al 0.5% durante 15 minutos y luego se enjuagaron 3 veces en agua destilada estéril. La hoja completa se colocó en una caja de petri con un medio de cultivo de regeneración (Nb Reg) compuesto por las sales minerales de MS (Murashige & Skoog, 1962); vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), sacarosa 3% y 3 mg/L Benzil Aminopurina (BAP). El pH del medio se ajustó a 5.8. Las cajas de petri se incubaron a 26°C con un fotoperiodo de 14 horas de luz. Después de 6-8 semanas las plántulas regeneradas se transfirieron a cajas Magenta con medio de cultivo para elongación (Nb Elong) de igual constitución al anterior pero exento de la citoquinina BAP. Al cabo de 4 semanas las plántulas alcanzaron una altura de aproximada de 7 cm y se seccionaron en microestacas para su propagación in vitro.

Cocultivo de explantes foliares con *Agrobacterium tumefaciens*:

Se recolectaron hojas del mismo tamaño provenientes de cultivo in vitro y se cortaron en segmentos de aproximadamente 2-3 mm de ancho sobre una caja de petri con papel de filtro húmedo. Los segmentos de hoja se sumergieron en una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* (cultivada durante toda la noche en presencia de acetosiringona; OD₆₀₀ final debe estar en 0.5) por 5 segundos. Luego los segmentos se secaron sobre papel de filtro estéril (10 segmentos/caja) y se colocaron en medio de cultivo suplementado con 200 μ M de Acetosiringona. Se colocaron 50 explantes por cada construcción en 5 cajas de petri con 10 explantes por caja. Después de 2 días de co-cultivo, los explantes se subcultivaron a medio de regeneración suplementado con carbencilina (500 mg/L) y kanamicina (300 mg/L)

Regeneración de plántulas transformadas: A las 4-6 semanas, las plántulas regeneradas se transfirieron a medio fresco de elongación suplementado con carbenicilina (500 mg/L) y kanamicina (100 mg/L). Los brotes individuales (1-2 cm longitud) se transfirieron a medio de cultivo sin hormonas (500 mg/L de carbenicilina y 100 mg/L kanamicina) hasta obtener plántulas enraizadas que se trasplantaron a suelo estéril. Las plántulas se cubrieron individualmente con una bolsa plástica y se dejaron en el cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas y una temperatura de 26°C. Después de una semana, las plántulas se llevaron al invernadero donde, por auto fecundación, se obtuvieron semillas. De cada una de las plantas transgénicas se recolectaron semillas y se almacenaron en cajas de petri pre-esterilizadas en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente.

Análisis molecular de las plantas transgénicas de tabaco

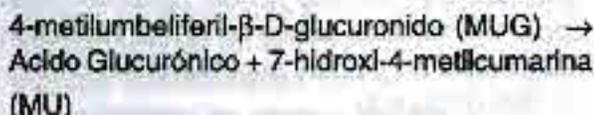
En promedio se regeneraron veinte plantas transgénicas (T0) por cada vector utilizado para la transformación. Se extrajo el DNA genómico de las hojas para su análisis (Southern, 1975). Se seleccionaron solamente las plantas en las cuales el T-DNA estaba presente con una sola copia en el genoma (datos no mostrados).

Evaluación de la actividad del promotor en plantas transgénicas de tabaco

Análisis Histoquímico: Este análisis se realizó siguiendo la metodología descrita por Jefferson *et al.* (1987). Se recolectaron hojas y semillas de cada una de las plantas transgénicas y se incubaron en el buffer X-Glu, en la oscuridad, durante 24 horas a 37°C. La mezcla del buffer X-Glu contenía tres componentes. El sustrato (1-5 mM X-Glu), el buffer (0.1M fosfato de sodio, pH 7.0) y el catalizador de la oxidación (0.5 mM de ferricianuro de potasio y 0.5 mM de ferrocianuro de potasio, pH 7.0) suplementado con 10 mM de EDTA, pH 7.0. La β -glucuronidasa cataliza una reac-

ción en presencia del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronido (X-Glu). El producto de la reacción sufre una dimerización formando un precipitado de color azul en el sitio de actividad del gen *uidA*, que se pudo observar con la ayuda de un estereomicroscopio. En los tejidos verdes se pudo hacer más visible el color azul mediante extracción de la clorofila dejando el tejido en etanol al 70% por una semana.

Análisis de fluorimetría: La actividad de GUS en solución se mide con el sustrato fluorométrico 4-metilumbeliferil- β -D-glu-curonido (MUG) de acuerdo con la siguiente reacción:



El MU es fluorescente cuando el grupo hidroxilo es ionizado, la reacción es detenida por adición de carbonato de sodio. El espectro de excitación y emisión de este compuesto presenta su máxima longitud de onda en 365 y 460 nm, respectivamente (Jefferson *et al.*, 1987). Se hizo una extracción de las proteínas solubles a partir de hojas y semillas de las plantas transgénicas de tabaco autofecundadas (T0) en buffer fosfato (50 mM fosfato de sodio (pH 7), 10 mM Na_2EDTA , 40 mM 2- β -mercaptoetanol) sin detergente. Se recolectaron 5 μg de proteína soluble y se incubaron con 1 mM MUG (4-metil-umbeliferil glucuronido) en un volumen final de 500 μl de mezcla de reacción. La fluorescencia se determinó en intervalos de 10 min. usando un espectrofluorímetro (SLM Aminco) previamente calibrado con soluciones estándares de 4-metilumbeliferona. La actividad de la β -glucuronidasa se midió en nmoles/mg de proteína/min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad del gen *uidA* en plantas transformadas de tabaco

Con el propósito de determinar la capacidad de cada uno de los fragmentos del promotor del gen de la legumina 11S del café de regu-

lar la expresión del gen *uidA*, en el tejido endospermico de las semillas del tabaco, cada fragmento se introdujo en plantas de tabaco mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens*. Simultáneamente se usó el vector *p1301* como control positivo que incluye el promotor constitutivo 35S y el vector *p1391z* como control negativo donde no se incluye ningún promotor para regular la expresión del gen *uidA*. Como era de esperarse no se observó actividad GUS en hojas ni semillas de plantas transgénicas transformadas con el vector *p1391z* (Figura 2). En las plantas transformadas con el vector *p1301* la actividad de GUS fue similar tanto en hojas como en semillas confirmando la expresión constitutiva en plantas superiores del promotor 35S (Figura 2).

El análisis histoquímico de estas mismas plantas confirmó los datos obtenidos de la expresión de GUS por análisis fluorimétrico (Figura 3-5).

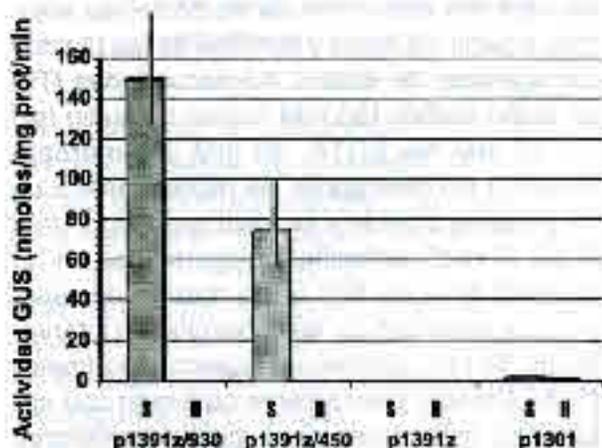


Figura 2. Actividad de GUS en plantas transgénicas de tabaco. El nivel de actividad se midió en hojas (H) y semillas (S) de plantas de tabaco transformadas con los fragmentos del promotor de la legumina 11S del café descritos en el texto. La actividad de GUS se expresa en nmoles/min/mg de proteína.



Figura 3. Análisis histoquímico de la expresión de GUS en hojas (Izq.) y semillas (Der.) de plantas transgénicas de tabaco transformadas con el vector *p1301* el cual contiene el promotor constitutivo 35S.



Figura 4. Análisis histoquímico de la expresión de GUS en hojas (Izq.) y semillas (Der.) de plantas transgénicas de tabaco transformadas con el vector *p1391Z/RAZ/930* conteniendo 900 pb del fragmento del promotor de la legumina 11S del café del café



Figura 5. Análisis Histoquímico de la expresión de GUS en hojas (Izq.) y semillas (Der.) de plantas transformadas con el vector *p1391Z*, el cual no tiene ningún promotor regulando la expresión del gen *uidA*.

Cuando se midió la actividad de GUS en semillas de plantas de tabaco transformadas con el vector p1391z/RAZ901 y p1391Z/RAZ418, los niveles detectados fueron 150 y 70 veces, respectivamente, más altos que el promedio de actividad detectado en las semillas de plantas transformadas con el control positivo (vector p1301). Estos resultados indican que, en los dos fragmentos evaluados, las secuencias de DNA del promotor de la legumina 11S del café funcionan como promotores específicos de semilla en plantas transgénicas de tabaco.

El nivel de actividad del fragmento de 418 pb es aproximadamente la mitad al del fragmento de 901 pb indicando que la delección de los nucleótidos comprendidos entre la posición -901 y -418 condujeron a una reducción de la actividad de GUS en un factor de 2 (Figura 3). Esta disminución pudo ser causada por la pérdida de una secuencia rica en

nucleótidos AT (posición -552 y -542) en las plantas transformadas con el fragmento de -418 pb. Esta secuencia se identificó en la base de datos "PLACE" (Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements, www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/tastra.html), como un elemento intensificador del endosperma de especies leguminosas (Figura 6).

Estos resultados también indican que el fragmento de DNA genómico de 901 pb retiene todos los elementos reguladores necesarios para una expresión fuerte y tejido-específica del promotor del gen de la legumina 11S del café en plantas transgénicas de tabaco. Es importante anotar que se observaron variaciones en la actividad de GUS entre plantas transformadas con el mismo vector, como también en plantas transformadas con el vector p1301 lo cual se puede explicar como el llamado "efecto de posición" (Peach & Velten, 1991).

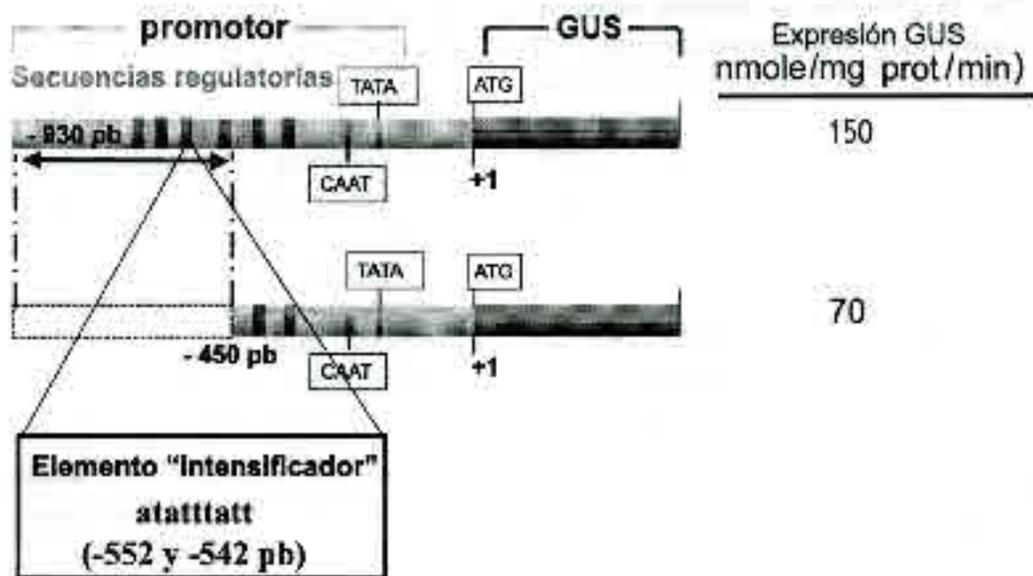


Figura 6 . Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen de la legumina 11S del café. Los números negativos en el margen izquierdo indican la región 5' no transcrita del gen de la legumina del café. Los números positivos indican la región que codifica la proteína de almacenamiento del endosperma del café. Las flechas debajo de las secuencias indican la posición y orientación de los iniciadores de la reacción de PCR utilizados para amplificar los fragmentos del promotor. La secuencia encerrada en el recuadro corresponde al intensificador de la expresión.

CONCLUSIONES

1. Las secuencias nucleotídicas de 418 y 901 pares de bases adyacentes al gen de la arabicina del café regulan, en forma tejida específica, la expresión del gen *uidA* en las semillas de plantas transgénicas de *Nicotiana benthamiana*.
2. Existe una secuencia de nucleótidos entre la posición - 552 y - 542 del promotor de la arabicina reconocida como "elemento intensificador" involucrada en la fuerte expresión del gen *uidA*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA, R., Bassuner, R., Beilinson, V. Cortina, H. Cadena-Gómez, G., Montes V., & Nielsen, N. 1999. Coffee seeds contain 11S storage proteins. *Physiol. Plantarum* 105: 122-131.
- GAMBORG O., Miller R., Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- JEFFERSON R., Kavanagh, T., Bevan, M. 1987. GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 3901-3907.
- KORNBERG, R. 1996. RNA polymerase II transcription control. *TIBS* 21:325-326.
- MURASHIGE T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- PANDA N., & Khush, G.S. 1995. Host plant resistance to insects. Wallingford (Inglaterra). CAB International. pp 431
- PEACH C., Velten T. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. 1991. *Plant Mol Biol* 17:49-60.
- ROEDER, R. 1996. The role of initiation factors in transcription by RNA pol II. *TIBS* 21:327-335.
- SOUTHERN, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517