



Artículo original

Generación de plantas transgénicas de papaya Maradol con resistencia potencial al virus de la mancha anular de papaya

Generation of Maradol papaya transgenic plants with potential resistance to papaya ringspot virus

Liz García-Zare¹, Pedro Valadez² y Salvador Guzmán³

1Escuela de Postgrado, Universidad Nacional de Trujillo; 2Laboratorio de Biotecnología, Universidad de Colima-México; 3 Laboratorio de Biotecnología, Universidad de Colima-México

RESUMEN

El cultivo de la papaya (*Carica papaya* L.) es uno de los frutales más importantes en las regiones tropicales y subtropicales del mundo sin embargo, es altamente susceptible al virus de la mancha anular de la papaya (PRSV), por ello que se planteó la obtención de plantas transgénicas de papaya resistentes a PRSV mediante ingeniería genética. Se empleó el gen *PI* del potyvirus PRSV proveniente de un aislamiento local e, incorporado en el vector de clonación pCR®2.1-TOPO (Invitrogen), a partir de esta construcción se realizaron las subclonaciones, en el plásmido CAT-GFP y, de éste al plásmido pCAMBIA 1301 para obtener el cassette de expresión con el promotor 2X 35S del virus del mosaico de la coliflor, el gen incorporado *PI* y el terminador pA 35S; finalmente dicho cassette fue incorporado a embriones somáticos y cigóticos de papaya por medio del sistema de biobalística y así obtener la resistencia al PRSV.

Palabras clave: *Carica papaya*, virus de la mancha anular de la papaya, ingeniería genética

ABSTRACT

The cultivation of papaya (*Carica papaya* L.) is one of the most important fruit in tropical and subtropical world, however, is highly susceptible to papaya ringspot virus (PRSV), so it proposed the production of plants transgenic of papaya with PRSV-resistant, through genetic engineering. We used the *PI* gene of PRSV potyviruses from a local isolation and incorporated into the cloning vector pCR®2.1-TOPO (Invitrogen), from this construction were made subcloned in the plasmid CAT-GFP and of these to the plasmid pCAMBIA 1301 for obtaining the expression cassette with the 2X 35S promoter mosaic virus cauliflower, *PI* gene and the terminator pA 35S; finally the cassette was incorporated into somatic and zygotic embryos of papaya through biobalistic system and get the resistance to PRSV.

Key words: *Carica papaya*, papaya ringspot virus, genetic engineering

INTRODUCCIÓN

La papaya, *Carica papaya* L., es una planta frutícola ampliamente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Chen *et al.*, 2001). A nivel mundial, Perú se encuentra en el top diez en su producción con 175 000 Ton (FAO, 2008); sin embargo, su rendimiento se ve afectado con pérdidas del 50 al 90% a nivel nacional dada su alta susceptibilidad al virus de la mancha anular de la papaya (PRSV) (Bau *et al.*, 2003), La

estrategia más aceptable ante el problema, es la obtención de plantas resistentes al VMAP, lo cual ha sido poco exitoso a través del mejoramiento convencional, que consiste en el cruzamiento de gametos. Como alternativa, surge el uso de la ingeniería genética para obtener plantas de transgénicas, proceso biotecnológico que en los últimos años ha sido utilizado con éxito en diversas plantas de importancia agrícola, a través del bombardeo de micropartículas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Iniciación y mantenimiento de embriones cigóticos:

Se emplearon frutos inmaduros de papaya var. Maradol de aproximadamente tres meses de crecimiento, se desinfectó a la semilla con cloralex al 20%, tween 20, etanol al 70% y agua desionizada estéril y, se extrajeron los embriones cigóticos, fueron cultivados en medio MS al el 50% de la concentración de sales y suplementado con 10 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para inducir la embriogénesis somática; luego incubadas en oscuridad a 28 °C(Cai *et al.*, 1999)

Construcción de vector de transformación:

Se empleo el gen truncado *PI*, secuencia amplificada por transcripción inversa reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a partir de purificaciones de ARN total hechas de tejido de plantas enfermas por PRSV. Luego fue ligada en el sitio de restricción *Nco* I y en *Xba* I e incorporada en el vector de clonación pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen) de 3.9 kb A partir de esta construcción se realizaron las subclonaciones en los vectores pCAT-GFP y pCAMBIA 1301, para la transformación vegetal de papaya “Maradol”. Este último plásmido se constituye por el exón que codifica para *GUS* y que es dirigido por el promotor 35S CaMV y terminador NOS polyA; además de los genes *npt* II (neomicina fosfotransferasa) y *hpt* (higromicina fosfotransferasa), que confieren resistencia a kanamicina e higromicina en la selección de bacterias y de tejido vegetal, respectivamente.

Sistema de Helios[™] Gene Gun para transformación vegetal:

El sistema de incorporación del DNA transgénico a los embriones somáticos fue por la técnica de biobalística, el DNA plasmídico fue purificado y adherido a micropartículas de oro y bombardeado a presiones de 50, 100, 150 y 200 psi.

Selección de embriones transformados:

Para seleccionar las estructuras somáticas transformadas se procedió a cultivarlas en medio con antibiótico para higromicina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los embriones somáticos frente al medio de selección, cambiaron a coloración amarilla (Fig.1), algunas de las estructuras, lo cual es indicador de que el DNA transgénico se incorporó al embrión, dichas estructuras fueron separados y multiplicadas en medio MS y regeneradas hasta planta completa, posteriormente aclimatadas en invernadero.



Fig. 1 Embrión somático en medio de selección con higromicina, mostrando estructuras transformadas

Tabla 1. Porcentaje de sobrevivencia de embriones somáticos de papaya Maradol, bombardeadas a diferentes presiones con DNA transgénico

Presiones	Embriones color amarillo	Total masas	% sobrevivencia
Testigo	0	27	0.0
50 psi	16	26	61.5
100 psi	17	21	81.0
150 psi	8	21	38.1
200 psi	17	29	58.6
Presiones	Embriones color amarillo	Total masas	% sobrevivencia
Testigo	0	27	0.0
50 psi	16	26	61.5
100 psi	17	21	81.0
150 psi	8	21	38.1
200 psi	17	29	58.6

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chen, G., Ye, C. M., Huang, J. C., Yu, M. y Li, B. J. 2001. Cloning of the papaya ringspot virus (PRSV) replicase gene and generation of PRSV-resistant papayas through the introduction of the PRSV replicase gene. *Plant Cell Rep.* 20: 272-277.
1. Food and Agriculture Organization (FAO). (2008). FAOSTAT database.
2. Bau, H. J., Cheng, Y. C., Yu, T. A., Yang, J. S. and Yeh, S. D. (2003). Broad-spectrum resistance to different geographic strains of Papaya ringspot virus in coat protein gene transgenic papaya. *Phytopathology* 93: 112-120.
3. Cai, W., Gonsalves, C., Tennant, P., Fermin, G., Souza, M., Sarindu, N., Jan, F. J., Zhu, H. Y. y Gonsalves, D. 1999. A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 35: 61-69.

Correspondencia: Liz García Zare
E-mail: