26162

INGENIERIA GENÈTICA PARA LA RESISTENCIA AL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (CMV) EN ESPECIES COMERCIALES DE *Musa spp* EN COLOMBIA

Lilian Duplat [1]
Mauricio Rodríguez [2]
Leonardo Mariño [3] Ramirez
Helena Reichell [4]
Kummet, J., [5]
Lazlo S. [6]
Swennen, R. [7]
Narváez, J. [8] Vasquez
Laignelet, A.[9] Sierra

PROBLEMA

El virus del mosaico del pepino (CMV) infecta las plantaciones de plátano y banano colombianas afectando la productividad del cultivo, el CMV infecta a mas de 470 especies vegetales (frijoles, maíz, tabaco, tomates, etc.) y es transmitido por mas de 69 especies de áfidos de forma no persistente. La presencia del virus se manifiesta en la reducción del tamaño de las plantas, produciendo pocos frutos los cuales son pequeños y sin desarrollo completo, y en casos severos causa la muerte de las plantas. Por otro lado por ser el plátano un cultivo de propagación vegetativa favorece altamente la transmisión de las enfermedades cuando no se cuenta con un sistema de producción de semilla asexual con tecnología.

M.Sc., Microbiología. Progr.Nal. Biotecnología Agrícola. Bacteriólogo, Progr. Nal. Biotecnología Agrícola. Biólogo, Progr. Nal. Biotecnología Agrícola. Fitopatología Progr. Nal Biotecnología Agrícola. Ph.D. Virologo de Plantas Laboratorio de Patologia Vegetal, Facultad de Ciencias Agronomicas, Gembloux, Belgium. Biologo Ph.D. Coordinador Linea de Ingenieria Genética Laboratorio de Cultivos Tropicales , Universidad Catolica de Lovaina. Ph.D. Mejoramiento de Platas, Laboratorio de Cultivos Tropicales, Universidad Catolica de Lovaina. I.A. Ph.D. Coordinador Programa Nacional de Biotecnologia Agrícola (1993- 1996).

JUSTIFICACIÓN

El cultivo del plátano constituye en nuestro país gran importancia económica y social, siendo Colombia el primer exportador y el segundo productor de este cultivo a nivel mundial, con un área sembrada de 385.176 ha y con el 24% del área total sembrada en cultivos permanentes, la producción anual se estima en 2.9 millones de toneladas al año, generando 142.000 empleos permanentes equivalente a 36.000 familias en promedio destinadas a ese cultivo. Sin embargo la producción de este cultivo se ve afectada por varias enfermedades de origen viral, fúngico y bacterial lo cual implica que cerca del 30% del costo total de la producción este representado en el uso de químicos para su control. La ingeniería genética constituye una alternativa importante para dar solución a estos problemas obteniendo *variedades mejoradas con resistencia a estos patógenos*. El objetivo final de este trabajo fue establecer una metodología eficiente de transformación en variedades comerciales en Colombia de *Musa spp*, tomando como modelo la obtención de resistencia al virus del mosaico del pepino (CMV) mediada por el gen de la cubierta proteica viral (CP), con el fin de ser aplicada hacia la obtención de plantas transgènicas con resistencia a otras enfermedades económicamente importantes.

OBJETIVOS:

GENERAL:

Desarrollar un sistema de transformación genética, para las principales variedades comerciales de *Musa spp* en Colombia con el fin de obtener resistencia mediada por el gen de la cubierta proteica (CP) de CMV.

ESPECIFICOS:

- Caracterizar el gen CP de aislamientos Colombianos de CMV.
- Construir un vector de transformación con el gen CP de aislamientos colombianos de CMV, y un gen marcador de selección (NPTII) bajo la regulación del promotor CaMV35S.
- Transformar discos de hoja de *Nicotiana tabacum* con los genes de interés, como modelo.
- Transformar células embriogénicas en suspensión (CES) de *Musa spp*, con genes reporteros y de interés.
- Seleccionar y analizar transformantes regenerados.
- Evaluar la resistencia de plantas transformadas en condiciones controladas de invernadero.

METODOLOGÍA

Para la caracterización del gen CP de CMV se recolectaron muestras de las principales zonas productoras del país y se realizaron pruebas de ELISA para diagnosticar, posteriormente se realizó la extracción de dsRNA viral y síntesis de cDNA, y *se diseñaron primers* específicos para la amplificación por PCR del gen CP. El gen CP de dos aislamientos colombianos fue clonado y secuenciado para posteriormente ser introducido en los vectores de transformación pBI141-CP y pIBT110-CP. Este último constructo fue empleado para transformar vía *Agrobacterium tumefaciens* discos de hoja de Nicotiana tabacum Variedad Xanthi , los cuales fueron seleccionados en medio con Kanamicina, se realizaron pruebas de ELISA y westernblot para medir la expresión del gen CP, las líneas seleccionadas fueron evaluadas en condiciones controladas de invernadero.

La transformación de CES de dos variedades de Musa (Dominico Hartón y Three *Hand Planty) se realizó* vía biobalistica con los plásmidos pBI 141-CP y pHAC 27 (El cual tiene un gen reportero Gus), la regeneración se realizó en medio selectivo con Kanamicina y se les realizó pruebas bioquímicas y moleculares para confirmar la presencia del transgen.

RESULTADOS

- Ocho líneas de *Nicotiana tabacum* variedad *xanthi* transformadas vía *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido pIBT-110 –CP, mostraron altos niveles de expresión del gen que codifica para la cubierta proteica del CMV.

- 64 de 78 plantas de *Nicotiana Tabacum* variedad Xanthi (R_1) transformadas con el gen CP, no presentaron sintomatología hasta 30 días post-inoculación y 14 de 78 plantas presentaron retardo en la aparición de síntomas, demostrándose tolerancia a la infección mecánica con una cepa Colombiana de CMV mediada por el gen CP, en condiciones controladas de invernadero.

- El protocolo establecido para la regeneración de CES permitió una regeneración de embriones del 75% con un 26% de variación somaclonal.

- La transformación vía biobalística con el plásmido pAHC 27 de CES de las variedades Dominico hartón y Three Hand Planty, permitió obtener 36 líneas con expresión estable del gen GUS .

- La transformación vía biobalística con el plásmido pBI 141-CP de CES de las variedades Dominico hartón y Three Hand Planty, permitió obtener 3 líneas en las que se amplifico un fragmento de aproximadamente 660 pb correspondientes posiblemente al transgen introducido.

CONCLUSIONES

- La transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, de discos de hoja de *Nicotiana Tabacum,* permitió la transformación estable del gen CP en plantas regeneradas.
- Las plantas transformadas CP de *Nicotiana tabacum* variedad Xanthi, mostraron un alto nivel de expresión del gen CP y un buen nivel de resistencia al ser inoculados artificialmente con aislamientos colombianos de CMV en condiciones controladas de invernadero.
- Los estudios realizados con células embriogénicas en suspensión (CES), demuestran que el establecimiento de estos cultivos celulares es una buena alternativa para la transformación de variedades comerciales de *Musa spp* ; puesto que el porcentaje de regeneración es bastante alto y son empleadas con éxito en transformación.
- La estandarización del protocolo de transformación vía biobalistica en variedades de *Musa spp* permitió la regeneración de transformantes estables, lo cual genera la posibilidad de ser aplicado para la obtención de resistencia a enfermedades económicamente importantes en este cultivo.