

GENERACIÓN DE RAÍCES Y PLÁNTULAS TRANSGÉNICAS DE TORONJA Y LIMA DULCE MEDIANTE EL USO DE *Agrobacterium rhizogenes*

GENERATION OF GRAPEFRUIT AND SWEET LIME TRANSGENIC ROOTS AND PLANTLETS VIA *Agrobacterium rhizogenes*

Arturo Serna Pérez y Eugenio Pérez Molphe Balch*

Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940. C.P. 20100 Aguascalientes, Ags. México. Tel: 01 (449)910-8420, Fax: 01(449)910-8401. Correo electrónico: eperezmb@correo.uaa.mx

* Autor para correspondencia

RESUMEN

La transformación genética es una técnica atractiva para el mejoramiento de los cítricos ya que evita los largos periodos juveniles y permite introducir nuevas características a un cultivar sin alterar los rasgos existentes. Un paso indispensable para aplicar esta tecnología de mejoramiento de los cítricos, es el desarrollo de sistemas eficientes de transformación genética que confieran ventajas agronómicas. En este reporte se presenta el desarrollo de sistemas de transformación genética basados en *Agrobacterium rhizogenes* para la toronja (*Citrus paradisi* cvs. Duncan y Rio Red) y la lima dulce (*Citrus limmettioides*). Primero se generaron raíces transformadas por medio del cocultivo de segmentos de tallo obtenidos de plántulas germinadas *in vitro* con *A. rhizogenes* cepa A4, que contenía el plásmido tipo silvestre pRiA4 y el vector binario pESC4 con los genes *nos-nptII* y *cab-gus*. La mayor eficiencia de transformación, medida como el porcentaje de explantes que formaron raíces, se obtuvo en la toronja Duncan (78 %), seguida por la toronja Rio Red (68 %) y la lima dulce (60 %). Se detectó actividad de GUS en 89, 92 y 76 % de las raíces generadas en toronja Duncan, toronja Rio Red y lima dulce, respectivamente. Luego se regeneraron brotes adventicios a través de organogénesis en segmentos de raíz transformada cultivados en medios con citocininas o con citocininas y auxinas; tales brotes adventicios se generaron en 24 % de los casos en toronja Duncan, en 14 % de los de toronja Rio Red y en 8 % de los de lima dulce. Los análisis GUS confirmaron que las plantas regeneradas conservaron la actividad de este gen introducido a las raíces transformadas. Los resultados mostraron que el sistema de transformación establecido introdujo exitosamente ADN foráneo a la toronja y a la lima dulce, y que puede ser útil para la generación de plantas que expresen genes de interés agronómico.

Palabras clave: *Citrus paradisi*, *Citrus limmettioides*, raíces transformadas, transformación genética.

SUMMARY

Genetic transformation is an attractive technique for citrus improvement because it avoids long juvenile periods and it offers the ability to introduce single new characteristics into a cultivar without altering existing traits. Development of efficient genetic transformation systems that confer agronomic advantages is an indispensable step to apply this technology to citrus breeding. In this report we pre-

sent the development of genetic transformation systems for grapefruit (*Citrus paradisi* cvs. Duncan and Rio Red) and sweet lime (*C. limmettioides*) using *Agrobacterium rhizogenes*. First, transformed roots were generated by coculturing stem segments obtained from *in vitro* germinated seedlings with *A. rhizogenes* strain A4 containing the wild-type plasmid pRiA4 and the binary vector pESC4 with *nos-nptII* and *cab-gus* genes. The highest transformation efficiency, measured as the percentage of root forming explants, was obtained in Duncan grapefruit (78 %), followed by Rio Red grapefruit (68 %) and sweet lime (60 %). GUS activity was observed in 89, 92 and 76 % of Duncan and Rio Red grapefruits, and sweet lime roots, respectively. Second, adventitious buds were regenerated through organogenesis on transformed root segments cultivated in media with either cytokinins and auxins or only cytokinins. Adventitious buds were generated in 24, 14 and 8 % of the segments of Duncan and Rio Red grapefruits, and sweet lime transformed roots, respectively. Regenerated buds were transferred to medium without growth regulators to elongate and produce adventitious roots. GUS analyses confirmed that generated plants conserved its activity. Our results show that the established transformation system successfully delivered foreign DNA to grapefruit and sweet lime, and it might be useful in generation of plants expressing genes of agronomic interest.

Index words: *Citrus paradisi*, *Citrus limmettioides*, genetic transformation, transformed roots.

INTRODUCCIÓN

México ocupa el 5º lugar mundial en producción de cítricos, con poco más de 5.5 millones de toneladas cosechadas durante 1999-2000 (FAO, 2001). Los cítricos más importantes son la naranja dulce (*Citrus sinensis*) y el limón mexicano (*C. aurantifolia*), seguidos por la mandarina (*C. reticulata*), toronja (*C. paradisi*) y lima dulce (*C. limmettioides*). El cultivo de los cítricos está expuesto a factores que disminuyen la producción y restringen su extensión, como las enfermedades, plagas y condiciones de estrés abiótico, problemas que se pueden resolver mediante la generación de materiales genéticamente más resistentes, más productivos y de mejor calidad. Los programas de

fitomejoramiento convencional han logrado avances sustanciales en la obtención de nuevas variedades en muchas especies de plantas cultivadas; sin embargo, los largos periodos de juvenilidad, la existencia de híbridos interespecíficos o poliploides complejos que se deben propagar de forma vegetativa, el reducido número de genotipos disponibles y el desarrollo de embriones nucelares, dificultan y prolongan la selección de plantas en los cítricos (Gmitter *et al.*, 1992). La introducción directa de genes a través de la transformación genética podría acelerar el mejoramiento de las especies cítricas y evitar los obstáculos antes descritos.

Recientemente se ha reportado la transformación genética en varias especies de cítricos a través del uso de diversas metodologías (Pérez-Molphe-Balch, 2003). Luth y Moore (1999) fueron los primeros en reportar la transformación genética de toronja (*Citrus paradisi*), al introducir mediante *Agrobacterium tumefaciens* el gen reportero *gus* y el marcador de selección *nptII*; observaron actividad de GUS (β -glucuronidasa) en 43.5 % de los brotes regenerados después de la transformación, pero la mayoría resultaron ser quimeras y sólo 11.9 % mostró actividad en todos los tejidos, y obtuvieron algunas plantas transgénicas del cultivar Duncan al enraizar algunos de los brotes generados.

Yang *et al.* (2000) también obtuvieron plantas transgénicas de toronja cv. Rio Red al introducir una construcción que incluía el gen *gus*, una versión no traducible del gen de la cápside del Virus de la Tristeza de los Cítricos (VTC) y el gen de la aglutinina de *Galanthus nivalis* (con propiedades insecticidas); debido a su incapacidad de enraizamiento, los brotes generados fueron injertados sobre plántulas no transformadas, y así pudieron obtener plantas completas. Febres *et al.* (2003) generaron y caracterizaron plantas de toronja cv. Duncan transformadas con varias secuencias del VTC, con un promedio de 14 % de brotes GUS positivos, aunque 83 % de estos brotes resultaron ser quimeras. En todos los trabajos citados se utilizaron sistemas de transformación basados en el cocultivo de explantes con *A. tumefaciens* y en la posterior regeneración de brotes por organogénesis directa a partir de los tejidos cocultivados. En el caso de la lima dulce (*C. limmettioides*), no existen reportes previos de transformación genética.

La transformación con *A. rhizogenes* para la introducción directa de genes es un sistema alternativo que ha sido utilizado con éxito en cítricos como el limón mexicano (Pérez-Molphe-Balch y Ochoa-Alejo, 1998) y el naranjo agrio (*C. aurantium*) (Chávez-Vela *et al.*, 2003). Consiste en la generación de raíces transformadas al cocultivar explantes con una cepa silvestre de *A. rhizogenes* que contenga, además del plásmido Ri, un vector binario con los

genes de interés. Las raíces transformadas son usadas como explantes para la regeneración de brotes transgénicos por organogénesis. Este sistema de transformación ha mostrado algunas ventajas con respecto al basado en *A. tumefaciens*, como mayor eficiencia de transformación, ausencia de quimeras y fácil enraizamiento de los brotes transgénicos generados (Pérez-Molphe-Balch, 2003). A la fecha no existen reportes de transformación genética de la toronja y la lima dulce al usar *A. rhizogenes* como vector.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar sistemas alternos para la transformación genética de toronja y lima dulce mediante el uso de *A. rhizogenes*, ya que esta tecnología podría permitir la introducción directa de genes de interés agronómico, como los que confieren mayor resistencia a plagas, enfermedades y factores ambientales adversos, o mejoran la calidad del fruto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Los explantes usados para el cocultivo se tomaron de plántulas de toronja (cvs. Duncan y Rio Red) y lima dulce germinadas *in vitro*, éstas provenientes de semillas de frutos seleccionados por su buen tamaño y color, y por la ausencia de daños y síntomas de infección por microorganismos. Las semillas se lavaron tres veces con el detergente líquido Dermoclean 1 %, luego se trataron con etanol 70 % durante 45 s y finalmente se desinfectaron por 25 min con una solución de hipoclorito de sodio 0.75 %. Se enjuagaron cuatro veces con agua destilada esterilizada y se sembraron en condiciones de asepsia, en el medio básico MS (Murashige y Skoog, 1962) con 50 % de la concentración de sales y compuestos orgánicos, pH 5.7 y 8 g L⁻¹ de agar (Sigma) como gelificante. Estos cultivos se mantuvieron en oscuridad a 25 \pm 2 °C por dos meses y luego se incubaron bajo luz continua por dos semanas con una intensidad lumínica de 54 μ mol m⁻² s⁻¹, provista por lámparas fluorescentes de 75 W.

Generación de raíces transformadas. Se utilizó la cepa A4 de *A. rhizogenes*, que es de tipo agropina y contiene el plásmido silvestre pRiA4 que confiere el fenotipo de raíces pilosas. Además, le fue introducido el plásmido ESC4 que actúa como vector binario y que lleva el gen marcador de selección de la neomicina fosfotransferasa II (*nptII*) bajo el control del promotor y terminador *nos* y el gen reportero de la β -glucuronidasa (*gus*) bajo el control del promotor *cab* y el terminador *ocs* (Jofre-Garfias *et al.*, 1997). La bacteria se cultivó en medio YM líquido (manitol 10 g L⁻¹, sulfato de magnesio 0.2 g L⁻¹, fosfato dibásico de potasio 0.5 g L⁻¹, extracto de levadura 0.4 g L⁻¹ y cloruro de sodio 0.1 g L⁻¹) con 50 mg L⁻¹ de rifampicina y 50 mg L⁻¹ de kanamicina, y se incubó por 72 h a 28 °C con agitación orbital a 120 rpm. Para

asegurar una densidad conocida y homogénea de bacterias en los experimentos de cocultivo, la cantidad de células por mL del cultivo bacteriano se determinó con un espectrofotómetro, mediante la determinación de la absorbancia a 620 nm e interpolación del valor obtenido en una curva patrón anteriormente elaborada. Una vez conocida la densidad del cultivo, éste se diluyó en medio MS líquido hasta obtener las suspensiones de 1×10^8 y 1×10^9 células/mL usadas en los experimentos posteriores.

El cocultivo se realizó en dos etapas; en la primera se colocaron los explantes dentro de la suspensión bacteriana por 45 min, y luego se eliminó el exceso de líquido con una gasa esterilizada. En la segunda etapa los explantes se dejaron en medio MS sólido por 72 ó 96 h, según el experimento. En un primer experimento se probaron dos tipos de explantes para elegir el de mayor eficiencia de transformación: segmentos de tallo y de raíz de 15-20 mm, a los que se les hicieron de cuatro a seis heridas transversales con bisturí. La suspensión bacteriana fue de 1×10^8 células/mL y el cocultivo se hizo por 72 h, para después transferir los explantes al medio de selección. Se utilizaron 50 explantes de cada tipo por especie y el experimento completo se repitió dos veces.

En un segundo experimento se probaron ocho tratamientos resultantes de dos tiempos de cocultivo (72 y 96 h), dos concentraciones de la suspensión bacteriana (1×10^8 y 1×10^9) e infiltración con vacío (con y sin infiltración), para elegir el tratamiento de mayor eficiencia de transformación. La técnica de infiltración consiste en aplicar tres ciclos de vacío (60 kPa) de 2 min cada uno, durante los 45 min de incubación con la suspensión bacteriana. Los explantes usados fueron segmentos de tallo de 15-20 mm heridos con el bisturí, con 50 explantes por tratamiento y por especie, y el experimento completo se repitió dos veces. El medio de selección que se utilizó en todos los casos fue el MS suplementado con 5 % p/v de sacarosa, 0.8 % p/v de agar, 500 mg L⁻¹ de cefotaxima (Claforan, Russell), 500 mg L⁻¹ de carbenicilina (Carbecin, Sanfer); estos dos antibióticos se usaron para eliminar la bacteria, y 50 mg L⁻¹ de kanamicina (Sigma-Aldrich) como agente selectivo. La concentración óptima de kanamicina se determinó mediante la elaboración de una curva de tolerancia con tejidos no transformados (datos no mostrados).

En todos los experimentos los cultivos se incubaron a 25 ± 2 °C en la oscuridad y los resultados que se registraron a los 40 d de cultivo: porcentaje de explantes que presentaron raíces y número promedio de raíces por explante. Las raíces presuntamente transformadas obtenidas de los experimentos anteriores se subcultivaron cada 30 d, mediante separación del explante original y su transferencia a medio de selección fresco.

Regeneración de brotes adventicios a partir de las raíces transformadas. Como explantes se usaron segmentos de 15 mm de longitud de raíz transformada, obtenidos de los experimentos antes descritos, los cuales se sembraron en posición vertical con la parte proximal sobresaliendo del medio. Para cada especie se estableció un experimento donde se probaron ocho tratamientos obtenidos de la aplicación de citocininas solas o combinadas con una auxina en el medio de cultivo (Cuadros 6, 7 y 8). Estos tratamientos se seleccionaron con base en experimentos previos con tejido no transformado (datos no mostrados). Los cultivos se mantuvieron en oscuridad a una temperatura de 25 ± 2 °C durante 8 d y luego se incubaron bajo luz continua ($54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a una temperatura de 25 ± 2 °C. Los resultados se registraron a los 40 d, como porcentaje de explantes que generaron brotes y número promedio de brotes producidos por explante. En este experimento se utilizaron 25 explantes de cada especie por tratamiento, y el experimento completo se repitió dos veces. Los mayores brotes regenerados (> 15 mm de longitud) fueron separados del explante original y transferidos a medio sin reguladores para su crecimiento y enraizamiento.

Análisis de los resultados. Para todos los experimentos antes descritos se utilizó un diseño completamente al azar. Los promedios de número de raíces por explante y de número de brotes por segmento de raíz transformada se compararon t de Student (cuando se tenían sólo dos tratamientos) o con un análisis de varianza cuando se tenían tres o más tratamientos; en este último caso se utilizó la prueba de Tukey-Kramer para la comparación de las medias. Los resultados que se muestran en los Cuadros 2 a 8 integran los datos de las dos repeticiones hechas por experimento.

Caracterización de los tejidos transformados. Para la confirmación de la transformación de las raíces y brotes obtenidos se realizaron ensayos histoquímicos, amplificación de los genes introducidos por PCR ("Polymerase Chain Reaction") e hibridación tipo "Southern blot". El ensayo histoquímico para detectar la actividad de GUS se hizo con el método de Stomp (1992), en todas las líneas de raíces transformadas y en algunos de los brotes producidos a partir de las mismas (aquéllos que tenían un tamaño suficiente para tomar una muestra de su tejido sin dañarlos). El volumen de la solución de reacción que se utilizó fue el necesario para cubrir por completo al tejido. Las muestras se incubaron por 12 h a 37 °C; después se lavaron varias veces en etanol 96 % para eliminar la clorofila y se registró el resultado del ensayo. Para el análisis PCR, el ADN de las raíces transformadas se extrajo con el método propuesto por Edwards *et al.* (1991). Los genes que se amplificaron del ADN vegetal fueron *gus*, *nptII*, *rolB* y *virDI*, mediante el procedimiento descrito por Hamill *et*

al. (1991), con un termociclador Bio-Rad Gene Cycler programado para 30 ciclos con las siguientes condiciones: Desnaturalización por 1 min a 94 °C, alineamiento por 1 min a 55 °C y extensión por 3 min a 72 °C. Los iniciadores que se utilizaron para las reacciones de PCR se muestran en el Cuadro 1. El gen *virD1* de *Agrobacterium* no se transfiere al genoma de la planta, por lo que se utilizó para descartar la presencia residual de la bacteria en el tejido vegetal.

Los productos de la amplificación se analizaron en un gel de agarosa 1.25 % teñido con bromuro de etidio. Para el "Southern blot" se extrajo ADN de raíces presuntamente transformadas, de acuerdo con el método de Draper y Scott (1988). El ADN fue digerido con la enzima *HindIII* (New England BioLabs, E.U.A.) y separado en un gel de agarosa 0.7 %. Se utilizaron 20 µg del ADN digerido por carril. Después de la electroforesis el gel se desnaturalizó con NaOH 0.5 M y NaCl 1.5 M, y luego se neutralizó con Tris-HCl pH 8.0 1 M y NaCl 1.5 M. El ADN se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon (Amersham Hybond-N⁺) y se fijó a la misma en una estufa a 90 °C por 2 h. La sonda que se usó fue un fragmento de 517 pb del gen *npt II* marcado con digoxigenina (DIG). El marcaje de la sonda, la hibridización y la detección se realizaron con el "Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II" (Boehringer Mannheim, Alemania). Debido a la necesidad de sacrificar una cantidad considerable de tejido para extraer el ADN, los análisis PCR y Southern blot se hicieron sólo en una muestra de las raíces transformadas generadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En un primer experimento se probaron dos tipos de explantes, segmentos de epicotilo y de raíz, para determinar al más susceptible a la transformación con *A. rhizogenes*. En las tres especies se obtuvieron raíces transformadas en ambos tipos de explante. Sin embargo, la eficiencia de transformación, medida como porcentaje de explantes que

forman al menos una raíz transformada, fue mayor con segmentos de tallo (Cuadro 2) (Figura 1a, b). En toronja Duncan, el número promedio de raíces que se forman por explante fue también significativamente mayor al utilizar segmentos de tallo. En las otras especies no se encontraron diferencias significativas entre el número promedio de raíces transformadas generadas en segmentos de tallo y de raíz. En varios explantes se observó la aparición de tejido calloso en las heridas, además de raíces transformadas. En los tres cítricos probados, las eficiencias de transformación que se obtuvieron fueron menores a las observadas con la misma cepa de *A. rhizogenes* en limón mexicano, con una eficiencia de 94 % (Pérez-Molphe-Balch y Ochoa-Alejo, 1998), y en naranjo agrio con una eficiencia del 91 % (Chávez-Vela *et al.*, 2003). Estas diferencias pueden atribuirse a factores genéticos inherentes a las especies de cítricos analizadas en cada caso, ya que las condiciones utilizadas para la transformación fueron muy similares.

En un segundo experimento se probó el efecto del tiempo de cocultivo, concentración de la suspensión bacteriana e infiltración con vacío en la eficiencia de transformación. En este caso se utilizaron únicamente segmentos de tallo como explantes. En general, la eficiencia de transformación en los tres cítricos se aumentó considerablemente debido a que se obtuvieron raíces transformadas en todos los tratamientos. En lima dulce, la mayor eficiencia de transformación (60 %) se obtuvo con 96 h de cocultivo y una suspensión de 1x10⁹ células/mL, mientras que el promedio más alto de raíces transformadas por explante (2.0) se obtuvo cocultivando por 96 h con 1x10⁸ células/mL (Cuadro 3). En la toronja Rio Red, la mayor eficiencia de transformación (68 %) y el promedio más alto de raíces transformadas por explante (2.56) se obtuvieron con 96 h de cocultivo y una suspensión de 1x10⁸ células/mL (Cuadro 4).

Cuadro 1. Iniciadores utilizados para la amplificación por PCR de los genes *gus*, *nptII*, *rolB* y *virD1* en ADN genómico aislado de tejidos presuntamente transformados de cítricos.

Gen	Iniciador	Secuencia	Fragmento amplificado (pb)
<i>gus</i>	5'	GGTGGGAAAGCGGTTACAAG	1200
	3'	GTTACGCGTTGCTCCGCCA	
<i>nptII</i>	5'	TATTCGGCTATGACTGGGCA	517
	3'	GCCAACGCTATGTCCTGAT	
<i>rolB</i>	5'	ATGGATCCCAAATTGCTATTCTCCACGA	780
	3'	TTAGGCTTCTTCTTCAGGTTACTGCAGC	
<i>virD1</i>	5'	ATGTCGCAAGGACGTAAGCCCA	450
	3'	GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA	

Cuadro 2. Generación de raíces transformadas en explantes de tallo y raíz de lima dulce y toronja Rio Red y Duncan.

Especie	Tipo de explante	Eficiencia de transformación (%) [†]	Número de raíces por explante [‡] (Promedio)
Lima dulce	Tallo	22	1.1 a
	Raíz	6	1.3 a
Toronja Rio Red	Tallo	46	1.1 a
	Raíz	8	1.4 a
Toronja Duncan	Tallo	72	3.3 a
	Raíz	4	1.3 b

[†] La eficiencia de transformación se determinó como porcentaje de explantes cocultivados que generaron raíces transformadas.

[‡] Para obtener el promedio de raíces por explante, se dividió el número total de raíces entre el número de explantes que produjeron raíces. Las medias seguidas de la misma letra en cada especie no son diferentes estadísticamente (t de Student, 0.05).

Cuadro 3. Efecto de la concentración de bacteria, tiempo de cocultivo y el uso de la técnica de infiltración al vacío en la producción de raíces transformadas sobre segmentos internodales de lima dulce.

Tiempo de cocultivo (h)	Concentración de la bacteria [células/mL]	Infiltración con vacío	Eficiencia de transformación (%) [†]	Número de raíces por explante [‡] (Promedio)
72	[1x10 ⁸]	+	44	1.2 b
72	[1x10 ⁸]	-	44	1.6 ab
72	[1x10 ⁹]	+	40	1.4 ab
72	[1x10 ⁹]	-	52	1.4 ab
96	[1x10 ⁸]	+	56	1.9 a
96	[1x10 ⁸]	-	36	2.0 a
96	[1x10 ⁹]	+	52	1.3 ab
96	[1x10 ⁹]	-	60	1.5 ab

[†] La eficiencia de transformación se determinó como el porcentaje de explantes cocultivados que generaron raíces transformadas.

[‡] Para obtener el promedio de raíces por explante, se dividió el número total de raíces entre el número de explantes que produjeron raíces. Las medias seguidas de la misma letra no son diferentes estadísticamente (Tukey-Kramer, 0.05).

Cuadro 4. Efecto de la concentración de bacteria, tiempo de cocultivo y el uso de la técnica de infiltración al vacío en la producción de raíces transformadas sobre segmentos internodales de toronja Rio Red.

Tiempo de cocultivo (h)	Concentración de la bacteria [células/mL]	Infiltración con vacío	Eficiencia de transformación (%) [†]	Número de raíces por explante [‡] (Promedio)
72	[1x10 ⁸]	+	40	1.5 ab
72	[1x10 ⁸]	-	36	1.3 b
72	[1x10 ⁹]	+	48	1.4 b
72	[1x10 ⁹]	-	52	1.5 ab
96	[1x10 ⁸]	+	68	1.8 ab
96	[1x10 ⁸]	-	60	1.9 ab
96	[1x10 ⁹]	+	64	2.6 a
96	[1x10 ⁹]	-	56	2.3 ab

[†] La eficiencia de transformación se determinó como el porcentaje de explantes cocultivados que generaron raíces transformadas.

[‡] Para obtener el promedio de raíces por explante, se dividió el número total de raíces entre el número de explantes que produjeron raíces. Las medias seguidas de la misma letra no son diferentes estadísticamente (Tukey-Kramer, 0.05).

La mayor eficiencia de transformación en los materiales estudiados se obtuvo en la toronja Duncan, donde 78 % de los explantes cocultivados por 96 h con una suspensión de 1x10⁹ bacterias/mL generaron raíces transformadas. En este tratamiento también se obtuvo el mayor promedio de raíces transformadas por explante (2.94) (Cuadro 5). La infiltración con vacío durante la incubación con la suspensión bacteriana tiene como fin facilitar la penetración de *Agrobacterium* en las heridas realizadas al explante, para elevar así la eficiencia de transformación. Sin embargo, en ninguna de las especies evaluadas hubo un incremento significativo de la eficiencia a causa de la infiltración, lo que sugiere que no es indispensable en este sistema de transformación. Las raíces transformadas mantuvieron su crecimiento al subcultivarlas a medio fresco (Figura 1c). Los ensayos histoquímicos mostraron actividad de GUS, medida como la aparición de un precipitado azul en los tejidos, en 89, 92 y 76 % de las raíces generadas de toronja Duncan, toronja Rio Red y lima dulce, respectivamente. También el tejido calloso generado en algunos explantes mostró esta actividad (Figura 1d).

Cuadro 5. Efecto de la concentración de bacteria, tiempo de cocultivo y el uso de la técnica de infiltración al vacío en la producción de raíces transformadas sobre segmentos internodales de toronja Duncan.

Tiempo de cocultivo (h)	Concentración de la bacteria [células/mL]	Infiltración con vacío	Eficiencia de transformación (%) [†]	Número de raíces por explante [‡] (Promedio)
72	[1x10 ⁸]	+	38	1.2 b
72	[1x10 ⁸]	-	43	1.1 b
72	[1x10 ⁹]	+	56	1.8 ab
72	[1x10 ⁹]	-	66	1.8 ab
96	[1x10 ⁸]	+	72	1.9 ab
96	[1x10 ⁸]	-	68	2.1 ab
96	[1x10 ⁹]	+	78	2.9 a
96	[1x10 ⁹]	-	64	2.1 ab

[†] La eficiencia de transformación se determinó como el porcentaje de explantes cocultivados que generaron raíces transformadas.

[‡] Para obtener el promedio de raíces por explante, se dividió el número total de raíces entre el número de explantes que produjeron raíces. Las medias seguidas de la misma letra no son diferentes estadísticamente (Tukey-Kramer, 0.05).

La generación de brotes a partir de las raíces transformadas se logró en las tres especies estudiadas (Cuadros 6, 7 y 8). La mayor eficiencia se obtuvo en toronja Duncan cultivadas en medio con 7.5 mg L⁻¹ de BA y 1 mg L⁻¹ de AIA, donde 24 % de los segmentos de raíz generaron brotes, con un promedio de 3.3 brotes por explante (Cuadro 8). El porcentaje de regeneración de brotes de toronja Duncan resultó menor que el del limón mexicano, donde se obtuvo 41 % de segmentos de raíz transformada que produjeron brotes; sin embargo, en el limón mexicano se produjo un promedio de 2.17 brotes por explante (Pérez-Molphe-Balch y Ochoa-Alejo, 1998), valor que es menor al 3.3 obtenido con la toronja Duncan.

Tanto el porcentaje de regeneración de brotes como el número promedio de brotes generados por segmento de raíz en la toronja Duncan, superaron los valores de 18 % y 1.25 brotes/explante reportados para el naranjo agrio (Chávez-Vela *et al.*, 2003). En lima dulce y toronja Rio Red las eficiencias de regeneración fueron menores (Cuadros 6 y 7). En todos los casos, los brotes se generaron en la parte superior de los segmentos de raíz cultivados verticalmente (Figura 1e). En experimentos previos se observó que la eficiencia de regeneración en raíces cultivadas en posición horizontal es nula en toronja y muy baja en lima dulce (datos no mostrados).

Los ensayos histoquímicos registraron actividad de GUS en todos los tejidos de los brotes regenerados a partir de raíces transformadas (Figura 1f). De los brotes generados en toronja Duncan, toronja Rio Red y lima dulce, 42, 36 y 28 % crecieron satisfactoriamente y pudieron ser aislados y transferidos a medio sin reguladores para su enraizamiento, el cual ocurrió sin problemas. El resto de los brotes nunca alcanzaron un tamaño suficiente para ser aislados y con el tiempo murieron, aun cuando fueron subcultivados con frecuencia unidos a los segmentos de raíz que los generaron. Este problema podría resolverse con un medio y condiciones de cultivo más adecuados para el crecimiento de los brotes una vez que han sido generados. Otra opción sería microinyectarlos sobre patrones no transformados con el fin de acelerar su desarrollo, tal como se ha hecho con brotes transformados con *A. tumefaciens* (Yang *et al.*, 2000).

La confirmación de los transformantes a través de los análisis PCR resultó positiva al amplificarse los genes *rolB*, *nptII* y *gus* a partir de ADN extraído de raíces transformadas (Figura 2 a y b). En los tres casos se amplificaron bandas con el peso molecular esperado. Asimismo, en algunas de las amplificaciones se incluyeron iniciadores diseñados para la amplificación del gen *virD1*, que no se encuentra en el ADN-t del plásmido Ri, por lo que no se transfiere al genoma de la planta. En 75 % de los casos la amplificación del gen *virD1* resultó negativa, en las cuales se descarta la presencia de *Agrobacterium* residual en estas muestras. Sin embargo, en el 25% restante sí hubo amplificación de este gen a partir de ADN aislado de tejidos transformados, lo que indica que en estas líneas la exposición a los antibióticos no fue suficiente para eliminar a la bacteria y que deberán probarse sistemas más eficientes para lograrlo.

Cuadro 6. Producción de brotes adventicios regenerados de segmentos de raíz transformada de lima dulce cultivados en medios con reguladores del crecimiento vegetal.

Reguladores del crecimiento (mg L ⁻¹)			Segmentos de raíz con brotes adventicios (%)	Brotes adventicios por segmento de raíz [†] (Promedio)
BA	2iP	AIA		
5	0	0	0	0
5	0	1	8	1.6 b
7.5	0	0	4	1.2 bc
7.5	0	1	8	1.4 bc
0	7.5	0	4	1.6 b
0	7.5	1	6	1.2 c
0	10	0	6	2.2 a
0	10	1	2	1.2 c

[†] Para obtener el promedio de brotes por explante, se dividió el número total de brotes entre el número de explantes que produjeron raíces. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey-Kramer, 0.05).

Cuadro 7. Producción de brotes adventicios regenerados de segmentos de raíz transformada de toronja Rio Red cultivados en medios con reguladores del crecimiento vegetal.

Reguladores del crecimiento (mg/L ⁻¹)			Segmentos de raíz con brotes adventicios (%)	Brotes adventicios por segmento de raíz [†] (Promedio)
BA	2iP	AIA		
5	0	0	0	0
5	0	1	4	1.4 c
7.5	0	0	4	1.2 c
7.5	0	1	8	1.6 c
0	7.5	0	12	2.4 c
0	7.5	1	10	2.8 c
0	10	0	14	7.0 a
0	10	1	14	4.2 b

[†] Para obtener el promedio de brotes por explante, se dividió el número total de brotes entre el número de explantes que produjeron raíces. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey-Kramer, 0.05).

Cuadro 8. Producción de brotes adventicios regenerados de segmentos de raíz transformada de toronja Duncan cultivados en medios de cultivo MS con reguladores del crecimiento vegetal.

Reguladores del crecimiento (mg/ L ⁻¹)			Segmentos de raíz con brotes adventicios (%)	Brotes adventicios por segmento de raíz [†] (Promedio)
BA	2iP	AIA		
5	0	0	8	1.2 b
5	0	1	14	1.3 b
7.5	0	0	8	1.6 b
7.5	0	1	24	3.3 a
0	7.5	0	0	0
0	7.5	1	10	1.3 b
0	10	0	8	1.2 b
0	10	1	12	1.6 b

[†] Para obtener el promedio de brotes por explante, se dividió el número total de brotes entre el número de explantes que produjeron raíces. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey-Kramer, 0.05).

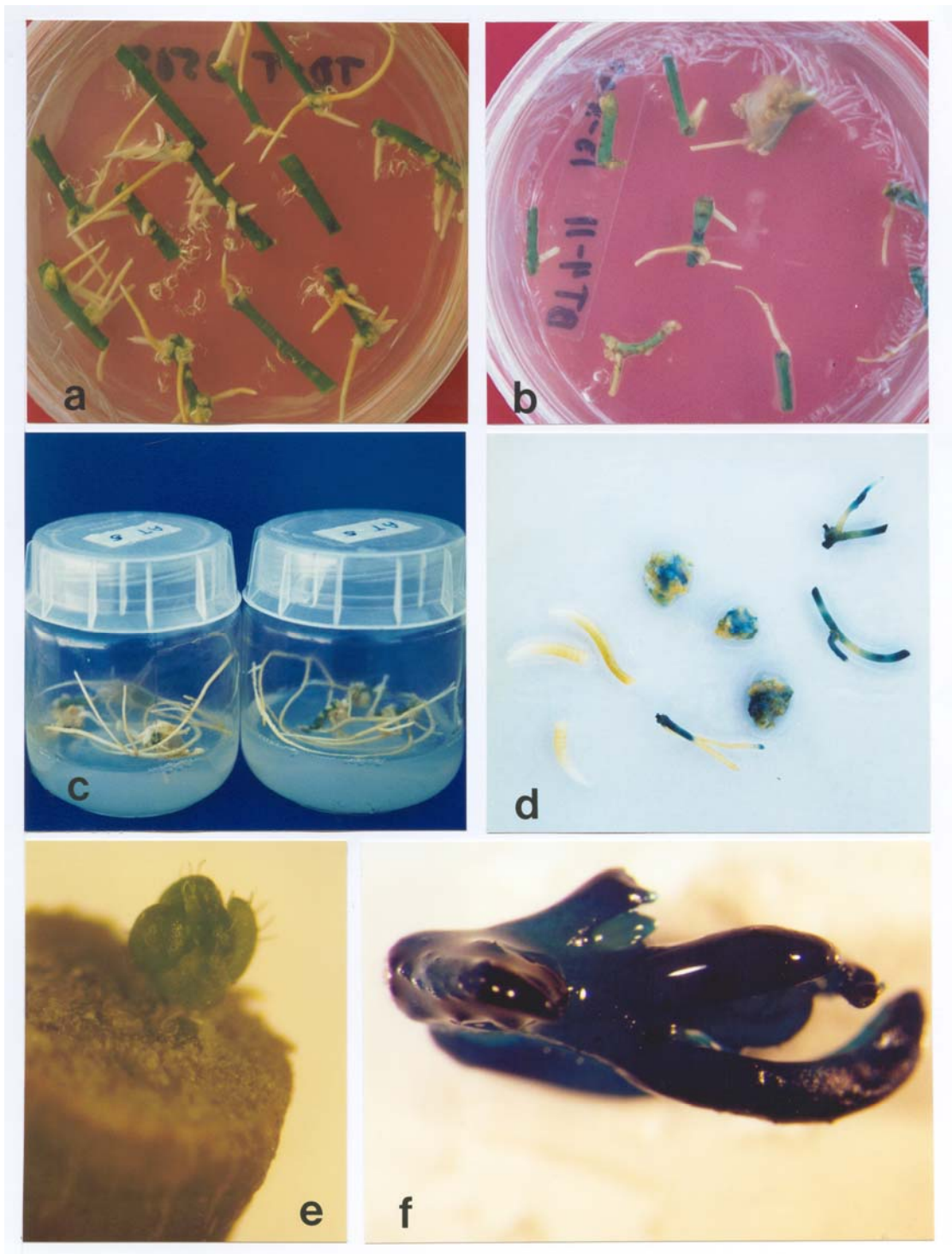


Figura 1. **a)** Generación de raíces transformadas en segmentos de tallo de toronja Duncan, 40 días después de ser cocultivados con *Agrobacterium rhizogenes* A4/pESC4. **b)** Generación de raíces transformadas en segmentos de tallo de lima dulce 40 días después de ser cocultivados con *Agrobacterium rhizogenes* A4/pESC4. **c)** Raíces transformadas de toronja Duncan creciendo después de dos subcultivos a medio de selección fresco. **d)** Ensayo histoquímico para la detección de actividad de GUS en tejido calloso y raíces transformadas de toronja Rio Red. A la izquierda se muestran tres segmentos de raíz no transformada usados como testigo negativo. **e)** Generación de un brote adventicio en el extremo superior de un segmento de raíz transformada de toronja Duncan cultivado en medio con 7.5 mg L^{-1} de BA y 1 mg L^{-1} de AIA. **f)** Ensayo histoquímico para la detección de actividad de GUS en un brote adventicio de toronja Duncan generado a partir de un segmento de raíz transformada.

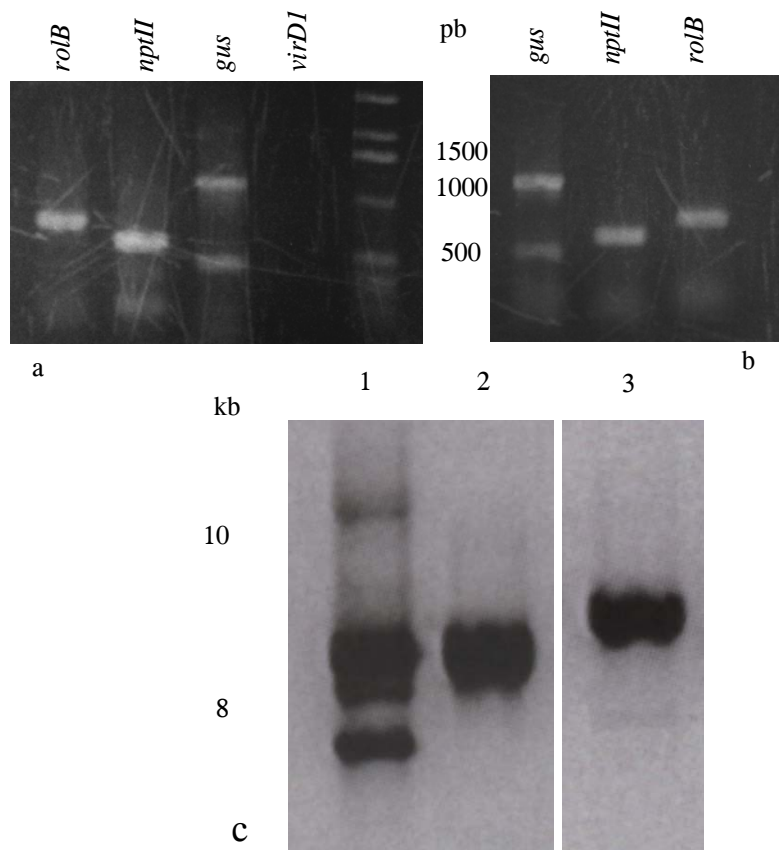


Figura 2. a) Amplificación por PCR de los genes *rolB*, *nptII* y *gus* en ADN de raíces transformadas de toronja Duncan. b) Amplificación por PCR de los genes *rolB*, *nptII* y *gus* en ADN de raíces transformadas de lima dulce. c) Análisis por Southern blot del ADN genómico de raíces transformadas de toronja Duncan (carril 1), toronja Rio Red (carril 2) y lima dulce (carril 3), al utilizar como sonda un fragmento del gen *nptII*.

Finalmente, el análisis por Southern blot confirmó también la transformación genética en las líneas analizadas, al detectarse señales de hibridación entre la sonda marcada para *nptII* y el ADN vegetal (Figura 2c). Se detectaron de una a tres señales de hibridación con tamaños de entre 7 y 11 kb, según la línea de raíces transformadas. Esto podría indicar que en algunos casos se tuvieron integraciones múltiples del gen *nptII* al genoma de la planta, pero tendría que confirmarse mediante análisis con otras enzimas de restricción para digerir al ADN.

CONCLUSIONES

Se cumplió el objetivo de esta investigación ya que se desarrollaron sistemas basados en *Agrobacterium rhizogenes* para la transformación genética de dos cultivares de toronja y uno de lima dulce. Se demostró la posibilidad de generar raíces transformadas de estos cítricos mediante el cocultivo de segmentos de tallo con *A. rhizogenes*, y se demostró la posibilidad de regenerar plantas transgénicas completas a partir de las raíces transformadas. Estas plan-

tas mantienen y continúan expresando los genes foráneos introducidos. Hasta donde se sabe, éste es el primer reporte de transformación genética de estas especies mediante *A. rhizogenes*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado al proyecto por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 31426-B) y la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Proyectos PIB-98-3 y PIBT-00-1). Al CONACYT se le agradece también la beca de posgrado otorgada a A. Serna Pérez. Asimismo, agradecen a la Dra. June Simpson del CINVESTAV por proporcionar el plásmido ESC4 usado en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

Chávez-Vela N A, L I Chávez-Ortiz, E Pérez-Molphe-Balch (2003) Transformación genética del naranjo agrio usando *Agrobacterium rhizogenes*. *Agrociencia* 37:629-639.

- Draper J, R Scott (1988)** The isolation of plant nucleic acids: *In: Plant Genetic Transformation and Gene Expression. A Laboratory Manual*, J Draper, R Scott, P Armitage, R Walden (eds) Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp:199-236.
- Edwards K, C Johnstone, C Thompson (1991)** A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19:1349.
- FAO (2001)** Frutos Cítricos Frescos y Elaborados. Estadísticas Anuales.
- Febres V J, C L Niblett, R F Lee, G A Moore (2003)** Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. *Plant Cell Rep.* 21:421-428.
- Gmitter Jr. F G, J W Grosser, G A Moore (1992)** Citrus: *In: Biotechnology of Perennial Fruit Crops*, F A Hammerschlag, R E Litz (eds). CAB International. Cambridge. pp:335-369.
- Hamill J D, S Rounsley, A Spencer, G Todd, M J C Rhodes (1991)** The use of the polymerase chain reaction in plant transformation studies. *Plant Cell Rep.* 10:221-224.
- Jofre-Garfias A E, N Villegas-Sepúlveda, J L Cabrera-Ponce, R M Adame-Alvarez, L Herrera-Estrella, J Simpson (1997)** *Agrobacterium*-mediated transformation of *Amaranthus hypochondriacus*: light- and tissue-specific expression of pea chlorophyll a/b-binding protein promoter. *Plant Cell Rep.* 16:847-852.
- Luth D, G Moore (1999)** Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 57:219-222.
- Murashige T, F Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-479.
- Pérez-Molphe-Balch E, N Ochoa-Alejo (1998)** Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes* transformed tissues. *Plant Cell Rep.* 17:591-596.
- Pérez-Molphe-Balch E (2003)** Genetic transformation and regeneration of citrus species: *In: Plant Genetic Engineering Vol. 6. Improvement of Fruit Crops*. P K Jaiwal, R P Singh (eds). Sci-Tech Publishing LLC. Houston, USA. pp:1-21.
- Stomp A M (1992)** Histochemical detection of GUS: *In: GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. Gallagher S A (ed). Academic Press Inc. San Diego. pp:103-113.
- Yang Z N, L L Ingelbrecht, E Louzada, M Skaria, T E Mirkov (2000)** *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). *Plant Cell Rep.* 19:1203-1211.