

SENSIBILIDAD A LA KANAMICINA Y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE ALCORNOQUE (*QUERCUS SUBER* L.)

Rubén Álvarez Fernández* y **Ricardo Javier Ordás Fernández****

Universidad de Oviedo, Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. C/ Catedrático Rodrigo Uría s/n. 33071-OVIEDO (España). Correo electrónico: *rubenaf.uo@gmail.com; **rordas@uniovi.es

Resumen

En este trabajo se estudia la sensibilidad de los embriones somáticos de alcornoque al antibiótico kanamicina y se demuestra la eficacia de la construcción pBIN19-*sgfp* en la transformación genética. La sensibilidad se determina a partir de datos de incremento de peso fresco relativo entre subcultivos y se contrasta con la observación macromorfológica de los embriones. Se concluye que la kanamicina es un agente selectivo adecuado y que la sensibilidad al antibiótico depende del genotipo, y se demuestra su validez obteniendo embriones transgénicos para la proteína verde fluorescente.

Palabras clave: *Alcornoque*, *Embriones somáticos*, *sGFP*, *Kanamicina*, *Transformación genética*

INTRODUCCIÓN

El alcornoque (*Quercus suber* L.) es una de las especies más características del ecosistema mediterráneo. Incluida en los programas de reforestación de la Unión Europea, su interés reside en su valor medioambiental, pues forma parte del ecosistema de la dehesa, y en la producción de corcho. Este material tiene gran variedad de aplicaciones, y sería interesante poder alterar sus propiedades físicas y químicas para potenciarlas o mejorarlas. Por otra parte el alcornoque está afectado por diversos hongos y plagas (BERNAL Y CARDILLO, 2004, CARDILLO Y BERNAL, 2003; LUQUE et al., 2002; ROBIN et al., 2001), y la introducción de resistencias sería de gran utilidad a los cultivadores. Sin embargo un largo ciclo juvenil y complejas características reproductivas dificultan su mejora, hecho que despierta el interés de aproximaciones biotecnológicas entre las que se encuentra la transformación genética.

En la actualidad, la transformación genética de individuos maduros seleccionados de alcornoque es un hecho (ÁLVAREZ et al., 2004; ÁLVAREZ & ORDÁS, 2007), gracias a la posibilidad de clonación y regeneración de individuos mediante embriogénesis somática (HERNÁNDEZ et al., 2003 a,b). Se ha desarrollado un protocolo de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para el genotipo M10 con una eficiencia de hasta el 43%, pero al aplicarlo a otros genotipos se han observado grandes variaciones en la eficiencia e incluso ineficacia de la transformación (ÁLVAREZ & ORDÁS, 2007), lo que unido a las diferentes capacidades proliferativas observadas sugiere que la sensibilidad al antibiótico podría depender también del genotipo.

Lo anterior ha conducido a buscar más parámetros que puedan influir en la eficiencia de transformación. Por un lado, para comprobar si la estrategia de selección de las células transformadas (BIRCH, 1997) podría condicionar la eficiencia de transformación, se estudia la sensibilidad

de diferentes genotipos de alcornoque a la kanamicina. Por otro lado, se pretende confirmar que el protocolo publicado por ÁLVAREZ et al. (2007) es independiente de la construcción binaria utilizada. Para ello se estudia el gen marcador *sgfp-S65T* (CHIU et al., 1996), una optimización del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) para la expresión en plantas, que permitiría abordar y resolver el problema de la aparición de quimeras (ÁLVAREZ et al., 2004). Este marcador también permitiría realizar ensayos no destructivos, lo que supone una ventaja frente al gen uidA (ÁLVAREZ et al., 2004), y el análisis visual a tiempo real de las putativas líneas transgénicas facilitaría el descarte de las quimeras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de cultivo

Se utilizaron embriones somáticos obtenidos a partir de hojas de tres árboles adultos de alcornoque de Torrelaguna (Madrid) y La Almoraima (Cádiz), cedidos por el Dr. Mariano Toribio [Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural (IMIDRA)]. Las líneas M10, Alm1 y Alm5 se escogieron porque presentan diferentes comportamientos de proliferación: Alm5 tiende preferentemente a madurar y exhibe la tasa de proliferación más baja, mientras Alm1 y M10 presentan respectivamente la tasa intermedia y la más alta en las condiciones de cultivo del experimento.

Los embriones se cultivaron siguiendo el protocolo descrito por HERNÁNDEZ et al. (2003 a, b) con pequeñas modificaciones (ÁLVAREZ et al., 2006). Los embriones somáticos se subcultivaron mensualmente en el medio de cultivo MSSH, y se mantuvieron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperíodo de 16/8 h y baja irradiancia ($< 40 \mu\text{moles m}^2\cdot\text{s}^{-1}$). El MSSH se compone de los macroelementos del medio SH (SCHENK & HILDEBRANDT, 1972) [(1x): 2500 mg.L⁻¹ KNO₃, 200 mg.L⁻¹ CaCl₂·2H₂O, 400 mg.L⁻¹ MgSO₄·7H₂O y 300 mg.L⁻¹ NH₄H₂PO₄], y los microelementos, vitaminas y Fe-EDTA del MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) [(1x) microelementos: 0,025 mg.L⁻¹ CoCl₂·6H₂O; 0,025 mg.L⁻¹ CuSO₄·5H₂O; 36,7 mg.L⁻¹ FeNaEDTA; 6,2 mg.L⁻¹ H₃BO₃; 0,83 mg.L⁻¹ KI; 16,9 mg.L⁻¹ MnSO₄·H₂O; 0,25 mg.L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O y 8,6 mg.L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O.

Vitaminas: 2 mg.L⁻¹ glicina; 100 mg.L⁻¹ mioinositol; 0,5 mg.L⁻¹ ác. nicotínico; 0,5 mg.L⁻¹ piridoxina-HCl; 0,1 mg.L⁻¹ tiamina-HCl]. Se ajustó el pH a 5,7, se le añadió 0,6% (p/v) de agar bacteriológico (Roko-Agar®, España) y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 min.

Sensibilidad de los embriones somáticos a la kanamicina

Se estudió la sensibilidad al antibiótico en las siguientes concentraciones: 0, 12,5, 25, 50, 75 y 100 mg.L⁻¹. Para ello se cultivaron tres réplicas de 200-500 mg de embriones por experimento, en oscuridad y a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, en placas Petri con 10 mL de medio sólido MSSH con el agente selectivo.

Los embriones se subcultivaron cada 20 días durante 3 meses, siempre en presencia del agente selectivo, y en cada subcultivo se tomaron fotografías y medidas de peso fresco que al acabar el experimento se transformaron en incrementos de peso fresco relativo [$\Delta P_{FR} = (\text{peso}_n - \text{peso}_{n-1}) / \text{peso}_{n-1}$, siendo n el subcultivo dado].

Todos los experimentos se repitieron al menos 2 veces con un mínimo de 3 réplicas por tratamiento, de acuerdo con un diseño completamente aleatorizado. Los datos de ΔP_{FR} se presentan como media \pm error estándar (E.E.). Los datos se analizaron para cada periodo de tiempo mediante un ANOVA unifactorial con un nivel de significación $\alpha=0,05$.

Transformación genética y detección de la proteína verde fluorescente

La línea M10 se transformó genéticamente con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 con el plásmido binario pBIN19-*sgfp* (CHIU et al., 1996), que incluye un gen modificado de la proteína verde fluorescente (sGFP), utilizable como indicador de la eficiencia y estabilidad de la transformación. Se siguió el protocolo descrito en ÁLVAREZ & ORDÁS (2007).

De cultivos bacterianos conservados a -80°C se extrajo un inóculo, que se cultivó a 28°C durante 48 h en medio YEP sólido (15 g.L⁻¹ de agar) con 10 mg.L⁻¹ de rifampicina y 100 mg.L⁻¹ de kanamicina. Una vez visibles las colonias aisladas, los cultivos se almacenaron a 4°C durante un mes como máximo. Para realizar la transformación se inoculó una colonia bacteriana en

medio YEP (AN et al., 1988) líquido con 50 mg.L⁻¹ de kanamicina y se incubó a 250 rpm y 28°C durante 16 h. Antes de la inoculación se ajustó la densidad óptica del cultivo a 600 nm (DO₆₀₀) a 0,5. A continuación el cultivo se centrifugó a 3000 g 10 min, y el sedimento bacteriano se lavó en 10 ml de MgSO₄ 10 mM, para centrifugarlo de nuevo y finalmente resuspenderlo en el medio MSSH líquido.

Se inocularon agregados embriogénicos de 2-5 mm en proliferación activa, precultivados durante 20 días en medio MSSH. Los explantos se colocaron en un recipiente con medio de cultivo MSSH líquido para prevenir su desecación, y una vez reunidos se utilizó el medio en que habían permanecido para resuspender la bacteria. Los explantos se inocularon en la solución bacteriana durante 20 min en agitación leve (~100 rpm), se secaron sobre papel de filtro estéril y se depositaron en placas Petri con 10 mL de medio MSSH sólido. Se cocultivaron durante 2 días en oscuridad a 25 ± 1°C. Transcurrido el cultivo, se lavaron dos veces consecutivas en medio MSSH líquido, la segunda de ellas con 600 mg.L⁻¹ de cefotaxima. Por último, se secaron sobre papel de filtro y se transfirieron a recipientes de cultivo con 10 mL de medio MSSH sólido con 500 mg.L⁻¹ de cefotaxima y 100 mg.L⁻¹ de kanamicina.

La detección de proteína verde fluorescente (sGFP) se realizó en embriones que habían proliferado en presencia de kanamicina durante cuatro meses. Para ello se utilizaron un microscopio óptico

de fluorescencia Leika DMR-XA con un objetivo NPlan 2,5x/0,07 y un filtro L5 Azul BP 480/40 BP 527/530, y un microscopio láser confocal Leica TCS-SP2-AOBS con un objetivo PL APO 10X/0.40, divisor de haz acústico óptico (AOBS) y una configuración de láser de argón de 488 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cultivos en presencia de los agentes selectivos se realizaron en oscuridad por varias razones: por una parte, en experimentos previos se observó que estas condiciones reducían la aparición de fenoles, que inhibían la proliferación y desencadenaban la necrosis y muerte de los explantos (datos no mostrados); asimismo, HERNÁNDEZ et al. (2003a) hacen notar que las bajas intensidades de luz retrasan la aparición de tejido necrótico cuando se distancian los subcultivos; y finalmente, en previsión del uso de antibióticos fotosensibles como la cefotaxima para eliminación de *Agrobacterium* después del cocultivo.

Sensibilidad a la kanamicina

La sensibilidad a la kanamicina se estudió en tres líneas embriogénicas con comportamientos de proliferación diferentes: Alm5 tiende preferentemente a madurar y exhibe la tasa de proliferación más baja, mientras Alm1 y M10 presentan respectivamente la tasa intermedia y la más alta.

La kanamicina inhibió significativamente la proliferación a los 40 días de cultivo en las líneas estudiadas (Figura 1). El aumento posterior de

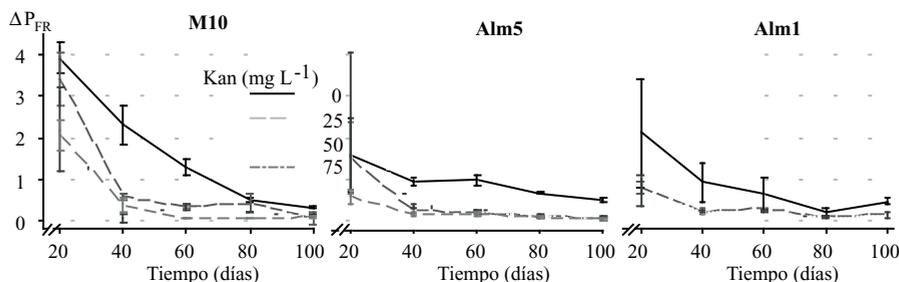


Figura 1. Sensibilidad de las líneas embriogénicas de alcornoque a la kanamicina. Se cultivaron tres réplicas de 200-500 mg de agregados embriogénicos, en oscuridad y a 25 ± 1°C, en placas Petri con 10 mL de medio sólido MSSH con kanamicina en el rango de 0-75 mg.L⁻¹. Los datos representan los incrementos de peso fresco relativo [$\Delta P_{FR} = (\text{peso}_n - \text{peso}_{n-1}) / \text{peso}_{n-1}$, siendo n el subcultivo dado] entre los subcultivos de 20 días en tres líneas embriogénicas de *Q. suber* (M10, Alm5 y Alm1). Nota: con objeto de simplificar la gráfica no se han representado todas las concentraciones de antibiótico ensayada

peso fresco se debió principalmente a la maduración de los embriones, parte de los cuales sufrieron necrosis dependiendo de la concentración de agente selectivo. El ΔP_{FR} del control disminuyó a lo largo del tiempo, probablemente porque los embriones no se disgregan al ser subcultivados y los agregados aumentan progresivamente de tamaño, dificultando la asimilación de los nutrientes del medio (HERNÁNDEZ et al., 2003 a).

En la figura 2 se observa el efecto de la kanamicina a los tres meses de cultivo. La línea M10 fue la menos sensible a la kanamicina: 75 mg.L⁻¹ inhibieron la proliferación en 40 días. Las otras dos, Alm1 y Alm5, se mostraron más sensibles al antibiótico: Alm5 presentó una sensibilidad intermedia (25 mg.L⁻¹) y Alm1 fue la más sensible (12,5 mg.L⁻¹). Al cabo de tres meses no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos; y aunque esto sugiere que podrían emplearse las concentraciones bajas de kanamicina para favorecer la multiplicación de las células transformadas, es preferible usar concentraciones altas para evitar la aparición de quimeras. De hecho, otros experimentos de transformación han demostrado la eficacia de concentraciones de 100 mg.L⁻¹, y la ausencia de quimeras después del cultivo de los embriones de las líneas Alm1 y M10 durante al menos 4 meses en presencia del antibiótico (ÁLVAREZ et al., 2004, 2006).

Los resultados expuestos contrastan con los obtenidos en masas proembriónicas (PEMs)

de *Q. suber* por SÁNCHEZ et al. (2005), que rechazan la kanamicina como agente selectivo. Los autores cultivan estas masas en presencia del antibiótico (30-500 mg.L⁻¹) y obtienen un 100% de supervivencia en todas las concentraciones ensayadas. En vista de esos resultados escogen la higromicina como agente selectivo.

Otros trabajos en *Castanea sativa*, fagácea como *Q. suber*, avalan la efectividad de la kanamicina como agente selectivo. SEABRA & PAÍS (1998) observan que 50 mg.L⁻¹ inhiben la caulogénesis en hipocotilos de *C. sativa*, aunque incrementan la concentración escalonadamente hasta 150 mg.L⁻¹ para reducir la aparición de escapes. Los autores también comentan que el cultivo con paromomicina, otro aminoglicósido más fuerte, disminuye los escapes; en nuestros cultivos de embriones somáticos, sin embargo, hemos observado que este último antibiótico produce necrosis (ÁLVAREZ et al., 2004), hecho no deseable en un protocolo de selección. CORREDOIRA et al. (2004) describen por su parte que 30 mg.L⁻¹ ya inhiben el aumento de peso fresco de embriones somáticos, lo que coincide con nuestras observaciones en *Q. suber*, aunque ven necesarios más de 100 mg.L⁻¹ para inhibir la embriogénesis secundaria.

Transformación genética

Se obtuvieron 10 líneas resistentes a kanamicina, y se detectó fluorescencia de sGFP

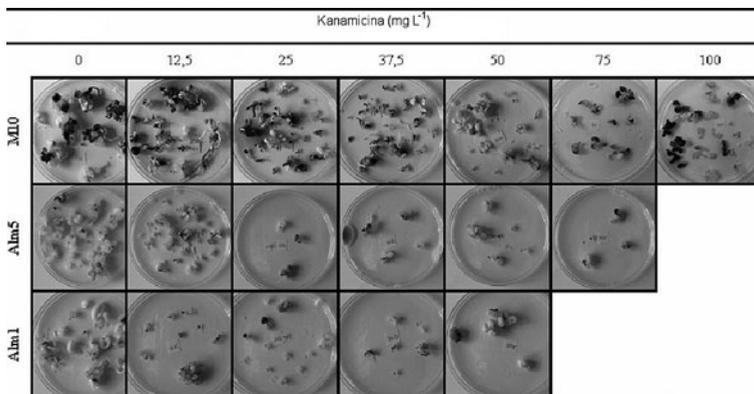


Figura 2. Efecto de la kanamicina sobre los embriones somáticos de las líneas M10, Alm 5 y Alm 1 a los tres meses de cultivo. Se muestra el estado, después de tres meses de subcultivos de 20 días, de cultivos con un peso inicial de 200-500 mg de agregados embriogénicos, mantenidos en oscuridad y a 25 ± 1°C en placas Petri con 10 mL de medio sólido MSSH con kanamicina en el rango de 0-100 mg.L⁻¹

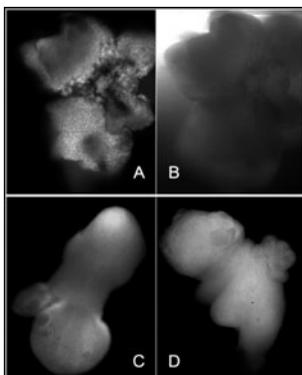


Figura 3. Detección de fluorescencia de sGFP. Las fotografías fueron tomadas unos 5 meses después de la inoculación de los explantos. A y B, imagen confocal de fluorescencia y de transmisión, respectivamente, de un mismo agregado embriogénico. C y D, imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia de un embrión en estado cotiledonar (C) y de un agregado embriogénico (D)

homogénea en todas ellas (Figura 3). Este hecho, junto con el alto porcentaje (90% al menos) de actividad GUS detectado en otros experimentos, sugiere que la eficiencia de la transferencia del ADN-T es alta y que los truncamientos son un fenómeno poco frecuente.

En conclusión, la metodología descrita ilustra la posibilidad de transformar embriones somáticos de *Quercus suber* L. obtenidos de plantas adultas seleccionadas con la construcción pBIN19-*sgfp*; luego este gen podría emplearse como marcador vital de eventos de transformación en dichos explantos y se evitarían los ensayos destructivos. Por otro lado, la alta sensibilidad al antibiótico observada en las líneas Alm1 y Alm5 podría ser la causa de la baja eficiencia de transformación observada en un trabajo previo (ÁLVAREZ & ORDÁS, 2007), por lo que se sugiere que el protocolo de selección debería optimizarse independientemente para cada genotipo. Actualmente, se está trabajando para comprobar si la modificación de las condiciones de transformación puede permitir transformar los genotipos Alm1, Alm5 y Alm80, cuya eficiencia de transformación fue muy baja o nula (ÁLVAREZ & ORDÁS, 2007).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto FEDER Ref. 1FD97-0744, una beca productivo-

ral concedida por FICYT dentro del Plan I+D+I 2001-2004, y una ayuda de finalización de Tesis de la Universidad de Oviedo. Asimismo agradecemos al grupo del Dr. Mariano Toribio la cesión de los cultivos embriogénicos de alcornoque.

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ, R. & ORDÁS, R.J.; 2007. Improved genetic transformation protocol for cork oak (*Quercus suber* L.). *Plant Cell Tiss. Org.* 91(1): 45-52.
- ÁLVAREZ, R.; ALONSO, P.; CORTIZO, M.; CELESTINO, C.; HERNÁNDEZ, I.; TORIBIO, M. & ORDÁS, R.J.; 2004. Genetic transformation of selected mature cork oak (*Quercus suber* L.) trees. *Plant Cell Rep.* 23(4): 218-223.
- ÁLVAREZ, R.; TORIBIO, M. & ORDÁS, R.J.; 2006. Cork oak trees (*Quercus suber* L.). In: K. Wang (ed.), *Methods in Molecular Biology* 344: *Agrobacterium* protocols, 2/e II: 113-123. Humana press Inc. Totowa, NJ.
- AN, G.; EVERT, P.; MITRA, A. & HA, S.; 1988. Binary vectors. In: S. Gelvin, R. Schilperoort & D.P. Verma (eds.), *Plant molecular biology manual*: 1-19. Kluwer. Dordrecht.
- BERNAL, C. & CARDILLO, E.; 2004. Plagas y enfermedades del alcornoque: La culebra del corcho. *Cuadernos forestales n.º 2*. Instituto del Corcho, la Madera y el Carbón Vegetal (IPROCOR).

- BIRCH, R.G.; 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 297-326.
- CARDILLO, E. & BERNAL, C.; 2003. Recomendaciones selvícolas para alcornoques afectados por el fuego. *Cuadernos forestales nº 1. Instituto del Corcho, la Madera y el Carbón Vegetal (IPROCOR)*.
- CHIU, W.-L.; NIWA, Y.; ZENG, W.; HIRANO, T.; KOBAYASHI, H. & SHEEN, J.; 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr. Biol.* 6(3): 325-330.
- CORREDOIRA, E.; MONTENEGRO, D.; SAN-JOSE, M.C.; VIEITEZ, A.M. & BALLESTER, A.; 2004. Agrobacterium-mediated transformation of European chestnut embryogenic cultures. *Plant Cell Rep.* 23(5): 311-318.
- HERNÁNDEZ, I.; CELESTINO, C.; ALEGRE, J. & TORIBIO, M.; 2003 a. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. II. Plant regeneration from selected cork oak trees. *Plant Cell Rep.* 21(8): 765-770.
- HERNÁNDEZ, I.; CELESTINO, C. & TORIBIO, M.; 2003 b. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. I. Factors affecting the induction in leaves from mature cork oak trees. *Plant Cell Rep.* 21(8): 759-764.
- LUQUE, J.; PARLADÉ, J. & PERA, J.; 2002. Seasonal changes in susceptibility of *Quercus suber* to *Botryosphaeria stevensii* and *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathol.* 51(3): 338-345.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F.; 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3): 473-497.
- ROBIN, C.; CAPRON, G. & DESPREZ-LOUSTAU, M.; 2001. Root infection by *Phytophthora cinnamomi* in seedlings of three oak species. *Plant Pathol.* 50(6): 708-716.
- SÁNCHEZ, N.; MANZANERA, J.; PINTOS, B. & BUENO, M.; 2005. Agrobacterium-mediated transformation of cork oak (*Quercus suber* L.) somatic embryos. *New For.* 29(2): 169-176.
- SCHENK, R. & HILDEBRANDT, A.; 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50(1): 199-204.
- SEABRA, R. & PAÍS, M.; 1998. Genetic transformation of European chestnut. *Plant Cell Rep.* 17(3): 177-182.