

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *Echinacea purpurea* Y *E. angustifolia* MEDIANTE *Agrobacterium rhizogenes*

Jorge Loaiza*, Roberto Valverde^{1/**}

Palabras clave: *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia*, transformación genética, *Agrobacterium rhizogenes*.
Keywords: *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia*, genetic transformation, *Agrobacterium rhizogenes*.

Recibido: 14/12/05

Aceptado: 08/03/06

RESUMEN

Secciones de tallos de vitroplántulas de *Echinacea purpurea* y *E. angustifolia* fueron inoculadas con *Agrobacterium rhizogenes* cepa SV3101, con la finalidad de obtener plántulas transformadas. Se evaluó el efecto de la acetosiringona en combinación con floriglucinol sobre la transformación. El proceso de transformación aumentó proporcional y significativamente conforme se incrementó las concentraciones de ambos productos; llegándose a obtener un 100% de transformación cuando se usó 200 μM de acetosiringona en combinación con 50 mg l^{-1} de floriglucinol. La eliminación de la bacteria se logró con 6 ml l^{-1} del Plant Preservative Mixture (PPM). También, se logró el cultivo *in vitro* de sólo raíces transformadas, las cuales incrementaron su peso seco 11 veces en un periodo de 24 días de cultivo, momento en el cual se hace necesario iniciar un nuevo cultivo.

ABSTRACT

Genetic transformation of *Echinacea purpurea* and *E. angustifolia* with *Agrobacterium rhizogenes*. To achieve the genetic transformation of *Echinacea purpurea* and *E. angustifolia* plants, stem sections of *in vitro* plantlets inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* strain SV3101 were co-cultivated with a mix of acetosyringone and phloroglucinol. Plant transformation increased proportionally and significantly by increasing the mix concentration. Highest transformation (100%) was obtained with 200 μM of acetosyringone and 50 mg l^{-1} of phloroglucinol. *Agrobacterium* elimination was achieved by a treatment with Plant Preservative Mixture (PPM) (6 ml l^{-1}). Isolated roots from the transformed plantlets were successfully grown, showing a 11-fold weight increase at the end of 24 days in culture; after this period roots need to be transferred to a new culture medium.

INTRODUCCIÓN

Echinacea sp. es una planta nativa de Norte América, que ha sido usada por muchos años con propósitos medicinales, en forma externa

es utilizada contra las picaduras de serpientes, insectos y quemaduras mientras que internamente su uso es indicado para controlar la tos, los resfríos, el dolor de garganta, las infecciones e inflamaciones. También, se ha confirmado la

1/ Autor para correspondencia: Correo electrónico: robertov@cariari.ucr.ac.cr

* Escuela de Química, Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.

** Biotecnología de Plantas, Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

actividad inmunoestimuladora, antiviral y antibacteriana de *Echinacea* sp. en humanos (Blanco *et al.* 2003).

Los principales metabolitos secundarios identificados en diferentes partes de la planta de *Echinacea* incluyen: alcaloides; alcalmidas; polisacáridos; poliacetilenos; flavonoides; derivados fenólicos (ácido cafeico, ácido cichórico, ácido clorogénico); aceites esenciales; y el glicósido equinacósido (Loaiza *et al.* 2004).

La biotecnología ofrece 3 estrategias de producción de compuestos bioactivos: mediante procesos fermentativos, donde hay un crecimiento de biomasa y la biosíntesis de un producto que ocurre en un biorreactor; la micropropagación, a través de la cual los clones seleccionados por las características fenotípicas y libres de patógenos son propagados en condiciones asépticas y rigurosamente controladas; y, a través de la ingeniería genética, cuya finalidad es la alteración del genoma de las células a través de la introducción de nuevos genes y la consecuente obtención de células, órganos y plantas transgénicas.

La ingeniería genética ha tomado un papel preponderante en el mejoramiento genético de las plantas, al introducir con rapidez las características de interés. Dentro de las principales técnicas que se utiliza en la transformación genética están: *Agrobacterium* spp.; biobalística; electroporación; y microinyección (Potrykus *et al.* 1998). En la transformación de plantas, la utilización de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*, como vector de genes, ha sido una técnica utilizada con éxito en los últimos 15 años en plantas dicotiledóneas y últimamente en ciertas monocotiledóneas (Usami *et al.* 1988).

Agrobacterium rhizogenes es una bacteria gram negativa, patogénica, que provoca la formación de raíces en los sitios de infección. Los mecanismos responsables de la formación de estas raíces son activados una vez que ocurre la transferencia de un segmento de ADN de la bacteria al hospedero; este segmento de ADN contiene varios genes, entre ellos los responsables

de la síntesis de aminoácidos esenciales para la bacteria -opinas- y otros responsables de la síntesis de enzimas involucradas en la formación de auxinas activas, las cuales actúan en el proceso de la rizogénesis. Las raíces una vez transformadas tienen la capacidad de continuar su crecimiento de una manera autónoma, aún separadas de la planta madre, si son cultivadas *in vitro*.

El cultivo de raíces transformadas por *A. rhizogenes* presenta muchas ventajas en comparación con el cultivo de células y de raíces sin transformar. Algunas de estas ventajas son: mayor estabilidad genética; en muchos casos un crecimiento más acelerado; y, una mayor productividad de metabolitos secundarios (Puhler 1983, Tepfer 1983, Mano 1989, Toivonen 1993, Nobukazu 1997).

Los extractos de plantas son el mayor recurso para la purificación de productos farmacéuticos. Así, las técnicas de cultivo *in vitro* de células u órganos han permitido estandarizar la producción de metabolitos secundarios, al lograr la multiplicación de algunos de estos órganos y células en bioreactores. En el caso de la familia Asteraceae se ha demostrado la susceptibilidad de diferentes especies de esta familia, entre ellas *Echinacea purpurea*, a la infección con *A. rhizogenes*, y la inducción de una mayor producción de alcalmidas en plantas transformadas (Mugnier 1988, citado por Towers y Ellis 1993; Trypsteen *et al.* 1991).

Muchas veces los procesos de transformación no son del todo efectivos, presentan resultados muy erráticos o la eficiencia es baja. Para incrementar la eficiencia de la transformación, son utilizados compuestos fenólicos como la acetosiringona y el floriglucinol, donde los primeros actúan a nivel de los genes *vir* y los segundos a través de un efecto sinérgico con las auxinas.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la acetosiringona en combinación con el floriglucinol en la transformación genética de *Echinacea purpurea* y *E. angustifolia* mediante *A. rhizogenes*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica. Para esta investigación se utilizó plántulas creciendo *in vitro*, obtenidas según los protocolos descritos por Loaiza *et al.* 2004.

Cepa de *Agrobacterium rhizogenes*

Se utilizó la cepa tipo agropina SV 3101 que posee el gen reportero β -glucuronidasa y el gen de selección *NPT II* (resistencia a la kanamicina), esta cepa fue gentilmente cedida por el Instituto Max Plank, en Alemania.

La cepa de *A. rhizogenes* se cultivó en un medio de crecimiento bacterial compuesto por: extracto de carne 1 g l⁻¹, extracto de levadura 2 g l⁻¹, peptona 5 g l⁻¹, NaCl 5 g l⁻¹, agar 0,8% g l⁻¹, el pH fue de 7,2-7,5. Este medio fue suplementado con 100 mg l⁻¹ de kanamicina (Sigma®).

Previo a la inoculación, la cepa mantenida en conservación a 4°C se puso a crecer en platos Petri con el medio de crecimiento antes mencionado. Luego de 3 días en la oscuridad y a temperatura ambiente, se obtuvo un crecimiento bacterial con colonias definidas y de color uniforme. De estas colonias se tomó una muestra

utilizando un asa bacteriológica, la cual se diluyó en 1 ml de agua destilada estéril hasta preparar la suspensión bacterial.

Transformación

La transformación se realizó en plántulas creciendo *in vitro* de 4 semanas de edad (Figura 1 A). A las plántulas de *Echinacea* se les eliminó las hojas y las raíces, obteniendo secciones de tallo de 3 a 5 cm cada una (Figura 1 B). Los explantes fueron inoculados en la base del tallo, mediante incisiones con un bisturí previamente sumergido en la suspensión bacterial (10⁸ células ml⁻¹). Luego de la inoculación de los explantes, estos fueron colocados en el medio sólido MS-50, al cual se le adicionó acetosiringona [3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxy-acetophenone (Aldrich chem. Co.)] y floriglucinol [1,3,5-trihydroxybenzene (Sigma®)] en las siguientes combinaciones: 50/5, 100/25 y 200/50 de acetosiringona (μ M)/floriglucinol (mg l⁻¹), respectivamente. Para cada tratamiento se utilizó 6 explantes. Además, se incluyó 2 testigos: uno que consistió en un grupo de 6 explantes, los cuales fueron inoculados con la bacteria y puestos a crecer en un medio de cultivo desprovisto de acetosiringona/floriglucinol; y otro que consistió en un grupo de 6 explantes los cuales no fueron inoculados con la bacteria y se pusieron

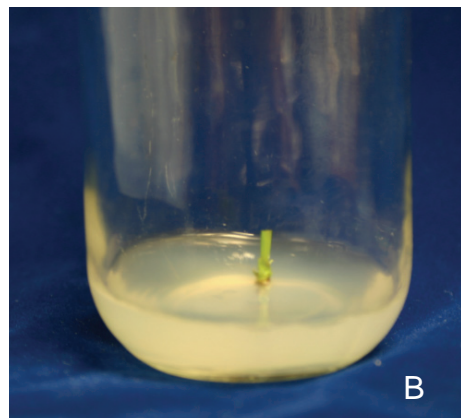
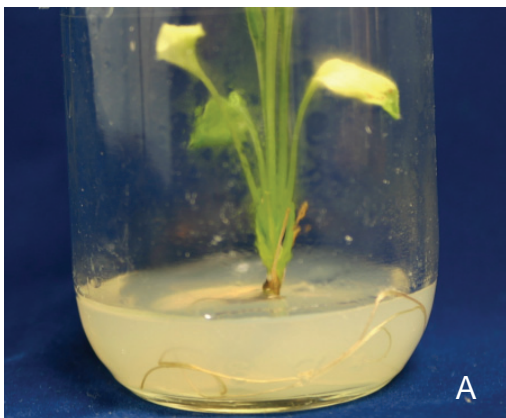


Fig. 1 A. Plántulas de 4 semanas de crecimiento *in vitro*. B. Sección del tallo utilizada para la transformación genética.

a crecer también en un medio de cultivo desprovisto de acetosiringona/floroglucinol. Las condiciones de cultivo fueron total oscuridad y 25°C por 4 días.

Posterior a dicho periodo, cada explante fue transferido a un medio sólido MS-50 suplementado con 3 mg l⁻¹ de AIA y se mantuvo allí por 4 semanas con renovaciones semanales del medio de cultivo. Las condiciones de crecimiento, fueron temperatura 25° ± 1°C, luz continua con una intensidad de 120 μmol m⁻²s⁻¹.

La eficiencia de la infección se definió como el número de explantes transformados entre el número total de explantes $\times 100 = \%$. Fueron considerados como explantes transformados aquellos que sobrevivieron en el medio de cultivo suplementado con la concentración letal de kanamicina.

Eliminación de la bacteria y sensibilidad al antibiótico

Esta parte de la investigación comprendió 2 procedimientos:

- 1- Se utilizó un medio líquido MS-50 suplementado con 500 mg l⁻¹ de Cefatoxime (Claforán, Hoechst) y 100 mg l⁻¹ de kanamicina (Sigma ®). Los explantes luego de 4 días en oscuridad total, fueron colocados en el medio selectivo durante 2 ciclos consecutivos de 24 h cada uno, con agitación constante y nuevamente a la oscuridad. Posteriormente, fueron transferidos a un medio sólido MS-50 sin reguladores de crecimiento y a las 4 semanas una porción de raíz fue macerada y rallada sobre el medio de crecimiento bacterial.
- 2- En el medio MS-50 líquido fueron evaluadas diferentes concentraciones del producto Plant Preservative Mixture (PPM) (Plant Cell Technology, Inc.). Los explantes fueron colocados en 4 diferentes concentraciones del producto: 2, 4, 6 y 8 ml l⁻¹; por 3 semanas en agitación constante y con renovaciones semanales del medio de

cultivo. Al final de las 3 semanas una porción de raíz fue macerada y rallada sobre el medio de crecimiento bacterial, como en el caso anterior.

En ambas pruebas no solo se tomó en consideración la eliminación completa de la bacteria, sino también la sobrevivencia del explante y su posterior crecimiento.

Verificación de la transformación genética

Raíces sin transformar de echinacea fueron incubadas en medio líquido MS-50 suplementado con diferentes concentraciones de kanamicina (1, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg l⁻¹), con el propósito de seleccionar la concentración letal del antibiótico.

Con la determinación de la concentración letal del antibiótico, las raíces obtenidas por medio de la infección con *A. rhizogenes*, fueron incubadas en el medio MS-50 suplementado con kanamicina. Las raíces que mostraron crecimiento óptimo fueron consideradas como transformadas.

Ensayo de β-glucuronidasa

La actividad de la β-glucuronidasa se analizó al colocar una porción de las raíces consideradas como transformadas en 500 μl de buffer de fosfato (0,2 M NaH₂PO₄, 0,2 M Na₂HPO₄ y Tritón x-100 al 10%) que contenía 250 μl de la solución X-Gluc. (10 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indoyl-β-D-glucoronide en 250 μl de N-N-dimetilformamide). Las raíces fueron incubadas durante 2 h al vacío a temperatura ambiente.

Cultivo *in vitro* de raíces transformadas

De las raíces transformadas de ambas especies de echinacea, 100 mg fueron cultivados en un medio líquido MS-50, suplementado con 2 ml l⁻¹ de PPM. Estas fueron colocadas en erlenmeyers de 250 ml en agitación constante y en oscuridad total.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la acetosiringona / floroglucinol

Los resultados que se presenta en el cuadro 1, muestran que el proceso de transformación se incrementó proporcional y significativamente conforme aumentaron las concentraciones de ambos productos; llegándose a tener un 100% de transformación en la concentración de 200 μM de acetosiringona y 50 mg l^{-1} de floroglucinol. Los explantes inoculados con la bacteria y puestos a crecer en un medio de cultivo desprovisto de acetosiringona/floroglucinol mostraron solo un 16,6% de transformación. Estos resultados concuerdan con otros en donde se indica que la utilización de compuestos fenólicos durante el proceso de transformación genética con *Agrobacterium* mejora sustancialmente el porcentaje de infección por la bacteria (Blount *et al.* 2001, Lupotto 2001). Los compuestos fenólicos, tanto los liberados por las células de la planta cuando ocurre una herida como los de origen sintético *i.e.* acetosiringona, sirven como inductores o co-inductores de los genes bacterianos *Vir* (Stachel *et al.* 1986, 1985). Estos compuestos fenólicos son percibidos por la proteína sensora *VirA*, posteriormente ocurre la trans-fosforilación de la proteína *VirG*, lo que conlleva a la activación de los transcritores de los genes *Vir* (Gelvin 2000). El floroglucinol como regulador de crecimiento funciona principalmente en procesos relacionados con el enraizamiento. Por tanto, y por ser *Echinacea* una planta que requiere un periodo cercano a las 4 semanas para producir raíces, cuando se cultiva *in vitro*, se utilizó este regulador favoreciendo la inducción de las raíces transformadas. Los efectos del floroglucinol han

sido demostrados cuando se ha utilizado en forma independiente o por un efecto sinérgico con las auxinas, sean estas aplicadas en forma exógena, como el caso de este trabajo, en donde se utilizó 3 mg l^{-1} de AIA, o de producción endógena, tal y como lo reportan Gaspar *et al.* (1996).

Sensibilidad al antibiótico

Con la aplicación de una concentración de 100 mg l^{-1} de kanamicina, los explantes transformados mostraron un crecimiento normal. Por el contrario, aquellos explantes no transformados murieron en un tiempo relativamente corto, resultado que es concordante con lo observado por Blanco *et al.* (2003).

Eliminación de la bacteria

En esta fase se utilizó tanto Cefatoxime como Plant Preservative Mixture (PPM). Con el antibiótico Cefotaxime, a pesar de que su uso ha sido indicado para la eliminación de bacterias transformadas, cuyo plásmido posee el gen de selección a la kanamicina; no se logró eliminar totalmente la bacteria de los explantes infectados. Este resultado podría estar relacionado con el grosor de las raíces ya que en trabajos previos por Blanco *et al.* (2003), donde las raíces fueron más delgadas, la bacteria fue eliminada en 48 h con una renovación del medio a las 24 h, pues es conocido que la efectividad del producto disminuye de 12 a 24 h después de reconstituirse la forma liofilizada del antibiótico a temperatura ambiente. En este estudio, luego de 48 h, las bacterias que no fueron eliminadas totalmente del explante renovaron su actividad.

Cuadro 1. Efecto de la combinación de acetosiringona y floroglucinol en la eficiencia de la transformación de explantes de *Echinacea purpurea* y *E. angustifolia* inoculados con la cepa SV 132 de *Agrobacterium rhizogenes*.

Acetosiringona (μM)	50	100	200
Floroglucinol (mg l^{-1})	5	25	50
Transformación (%)	33	67	100*

*Los datos de ambas especies difieren sólo en algunos decimales, por lo que los resultados fueron unificados.

Por lo tanto, como segunda alternativa se utilizó PPM y fue con la concentración de 6 ml l^{-1} que se logró una eliminación total de la bacteria en un periodo de un mes. Con la utilización de este producto no hay riesgos de afectar el desarrollo de la planta, y su valor económico es menor al de muchos antibióticos.

Ensayo de β -glucoronidasa

El análisis histoquímico del gen *GUS* mediante la tinción con X-Gluc., genera un precipitado azul en el sitio de actividad de la enzima. Las raíces que sobrevivieron al tratamiento con kanamicina y crecieron en un medio desprovisto de reguladores de crecimiento mostraron los precipitados azules característicos de esta tinción. Este resultado es un indicativo de la ocurrencia de la transformación y concuerda con lo obtenido por Blanco *et al.* (2003).

Cultivo *in vitro* de raíces transformadas

La figura 2 muestra las raíces transformadas, cultivadas en el medio líquido MS-50 suplementado con 2 ml l^{-1} de PPM, las mismas mostraron un

incremento en peso constante hasta los 24 días de cultivo (Cuadro 2). Sin embargo, a los 28 días las raíces ya han detenido su crecimiento y algunas de ellas se han desintegrado por lo que se observa una disminución en el peso (Cuadro 2). De estos resultados se puede concluir que cada 24 días se hace necesario iniciar un nuevo cultivo de raíces en medio fresco. Además, lo anterior permite corroborar los resultados obtenidos en pruebas anteriores acerca de la efectividad de la metodología empleada en la transformación genética de esta planta mediante *A. rhizogenes*.

En conclusión, los resultados obtenidos en esta investigación validan la metodología de transformación genética descrita por Blanco *et al.* (2003). En el caso particular de esta planta, el crecimiento de las raíces transformadas en un medio líquido abre la posibilidad de obtener los compuestos de interés mediante esta vía. El método empleado es una muestra a pequeña escala de lo que podría ser el cultivo de estas raíces en biorreactores para la producción comercial de los metabolitos secundarios. Aún se requiere analizar la capacidad de las raíces transformadas en la producción de los metabolitos de interés farmacéutico.

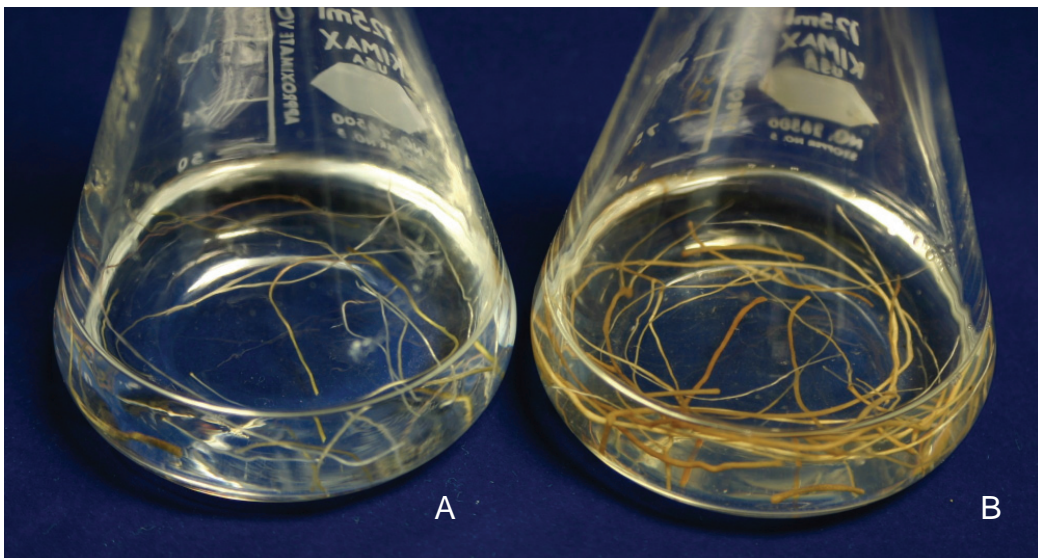


Fig. 2. Crecimiento de las raíces de *Echinacea purpurea*. A. Raíces sin transformar. B. Raíces transformadas.

Cuadro 2. Crecimiento de raíces transformadas de *Echinacea angustifolia* y *E. purpurea* (promedio de 3 repeticiones).

Tiempo (días)	<i>Echinacea angustifolia</i>		<i>Echinacea purpurea</i>	
	Peso fresco (mg)	peso seco (mg)	peso fresco (mg)	peso seco (mg)
0	100	10	100	10
4	290	18	295	18
8	380	20	390	25
12	460	26	480	28
16	510	38	530	41
20	700	75	680	73
24	860	115	870	125
28	850	90	850	95

LITERATURA CITADA

- BLANCO M., VALVERDE R., GOMEZ L. 2004. Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía Costarricense* 27(1): 19-28.
- BLOUNT J., SAMEER M., LLOYD S., HUHMANN D., DIXON R. 2001. Accumulation of acetosiringone in elicited tobacco cell suspension culture expressing an alfalfa cinnamate 4-hydroxylase (C4H) transgene. *In: http://www.rycomusa.com/aspp2001/public/p39/0143.html* (31/08/04).
- GASPAR T., KEVERS C., PENEL C., GREPPIN H., REID D., THORPE T. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant* 32:272-289.
- GELVIN S. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 51:223-256.
- LOAIZA J., VALVERDE R., GÓMEZ L. 2004. Micropropagación de *Echinacea purpurea* a partir de brotes y semillas. *Agronomía Costarricense* 28(2): 17-26.
- LUPOTTO E., REALI A., PASSERA S., CHAN M. 2001. Maize transformation with *Agrobacterium tumefaciens*. *In: http://www.agron.missouri.edu/mnl772767lupotto.html* (31/08/2004).
- MANO Y. 1989. Variation among hairy root clones and its application. *Plant Tiss. Cult. Lett.* 6,1.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 31:129-139.
- NOBUKAZU T. 1997. Strategies for the production of secondary metabolites by pre-transformed regenerants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 3(3):128-137.
- POTRYKUS I., BILANG R., FUTTERER J., SAUTER C., SCHROTT M., SPANGENBERG G. 1998. Genetic engineering of crop plants. *In: Agricultural Biotechnology*. A. Altman, M. Dekker (eds). New York, USA. 770 p.
- PUHLER A. 1983. Molecular genes of the bacterial plant interaction. Springer, Berlin 330 p.
- STACHEL S., NESTER E., ZAMBRYSKI P. 1986. A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:379-383.
- STACHEL S., MESSENS E., VAN MONTAGU M., ZAMBRYSKI P. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318:624-629.
- USAMI S., OKAMOTO S., TAKEBE I., MACHIDA Y. 1988. Factor inducing *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression is present in monocotyledonous plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:3748-3752
- TEPFER D. 1983. The biology of genetic transformation of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*. *In: Molecular genetics of the bacteria plant interaction*. A. Phuler (ed.). Springer. Berlin, p. 248-258.
- TOIVONEN I. 1993. Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. *Biotechnol. Prog.* 9:12-20.

- TOWERS N., ELLIS S. 1993. Secondary metabolism in plant tissue cultures transformed with *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* In: Human Medicinal Agents from Plants. ACS Symposium Series 534. A.D. Kinghorn, M.F. Baladrin (eds). American Chemical Society, Washington, DC. p. 56-78.
- TRYPSTEEN M., VAN LIJSEBETTENS M., VAN SEVEREN R., VAN MONTAGU M. 1991. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Echinacea purpurea*. Plant Cell Report 10:85-89.