

Embriones Transgénicos de Mango (*Mangifera indica*) cv. 'Ataulfo' con el Gen de la Defensina J1

Transgenic Mango Embryos (*Mangifera indica*) cv. 'Ataulfo' with the Defensin J1 Gen

Marisela Rivera Domínguez, Karen Rosalinda Astorga Cienfuegos, Socorro Vallejo Cohen, Irasema Vargas Arispuro, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Coordinación de Ciencia de los Alimentos, Carr. a la Victoria km. 0.6, Hermosillo Son., CP 83000, México; **Ernesto Sánchez Sánchez,** Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Apdo. Postal 189, Navojoa, Son., CP 85800, México. Correspondencia: marisela@ciad.mx

(Recibido: Septiembre 01 2010 Aceptado: Diciembre 07, 2010)

Rivera Domínguez, M., Astorga Cienfuegos, K. R., Vallejo Cohen, S., Vargas Arispuro, I. y Sánchez Sánchez, E. 2011. Embriones Transgénicos de Mango (*Mangifera indica*) cv. 'Ataulfo' con el Gen de la Defensina J1. Revista Mexicana de Fitopatología 29:78-80.

Resumen. En el presente trabajo se realizó la transformación genética de embriones somáticos de mango cv. 'Ataulfo' con el gen de la defensina J1 de chile pimienta. En ensayos *in vitro* se demostró que extractos proteicos de embriones transformados inhibieron el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger* y *Fusarium* sp. En contraste, extractos proteicos de embriones sin transformar no afectaron el crecimiento de los hongos. Estos resultados, junto con la amplificación de los genes *J1* y *nptII* del ADN genómico, nos indican la incorporación y la expresión del transgen en los embriones.

Palabras clave adicionales: Transformación genética, biobalística, proteínas de defensa, defensina J1 de chile pimienta.

A nivel mundial, México es el principal exportador de mango (*Mangifera indica* L.) y ocupa el quinto lugar en su producción. Entre los principales problemas que enfrenta la industria del mango se encuentran las enfermedades. Particularmente, la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, es la enfermedad más importante. Los fungicidas comerciales que son utilizados para el control de estas enfermedades sólo ofrecen protección temporal. Por lo que las enfermedades fúngicas siguen siendo un problema limitante en estos cultivos. Por otro lado, es conocido que las defensinas juegan un papel importante en el mecanismo de defensa contra hongos, bacterias y protozoos y no son tóxicos a células de mamíferos y plantas. En ensayos *in vitro* se ha determinado su actividad antimicrobiana y la resistencia que ejercen contra fitopatógenos en plantas transgénicas (Zainal *et al.*, 2009). Las cuantiosas pérdidas económicas en el cultivo

Rivera Domínguez, M., Astorga Cienfuegos, K. R., Vallejo Cohen, S., Vargas Arispuro, I. and Sánchez Sánchez, E. 2011. Transgenic Mango Embryos (*Mangifera indica*) cv. 'Ataulfo' with the Defensin J1 Gen. Revista Mexicana de Fitopatología 29:78-80.

Abstract. In this paper, the genetic transformation of somatic embryos of mango cv. 'Ataulfo' with the Bell pepper J1 defensin gene was performed. *In vitro* tests showed that protein extracts from processed embryos inhibited the growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger* and *Fusarium* sp. In contrast, protein extracts from embryos without change did not affect the growth of fungi. These results, together with the amplification of *J1* and *nptII* genes of the genomic DNA, show the incorporation and expression of the transgene in the embryos.

Additional keywords: Genetic transformation, biolistic, defense proteins, bell pepper J1 defensin.

Globally, Mexico is the largest exporter of mango (*Mangifera indica* L.) and ranks fifth in production. Among the main problems facing the industry are mango diseases. In particular, anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, is the most important disease. Commercial fungicides that are used to control this disease only offer temporary protection. Therefore fungal diseases remain a limiting problem in these crops. On the other hand, it is known that defensins play an important role in the defense mechanism against fungi, bacteria and protozoa and are not toxic to mammalian cells and plants. *In vitro* tests have determined their antimicrobial activity and resistance in transgenic plants against pathogens (Zainal *et al.*, 2009). Economic losses in the cultivation of mango, caused mainly by pathogens demand the generation of new breeding resistant lines therefore this study focused on the transformation of somatic embryos of mango cv. 'Ataulfo' with the J1-defensin gene in order to confer protection against

de mango, ocasionadas principalmente por fitopatógenos demanda la generación de nuevas líneas mejoradas resistentes, por lo que el presente trabajo se enfocó en la transformación de embriones somáticos de mango cv. 'Ataulfo' con el gen de la defensina J1 con la finalidad de conferir la protección contra hongos fitopatógenos.

La transformación genética por biobalística fue realizada utilizando el plásmido pKYLX80-J1 conteniendo el gen *J1* de chile pimiento (Meyer *et al.*, 1996) bajo el promotor CaMV35S y el gen de resistencia a kanamicina *nptII* incorporado al plásmido pKYLX80. Las condiciones del bombardeo fueron presión del gas helio de 1200 psi, presión de disparo de 800 psi y distancia de 9 cm., en una cámara de bombardeo PDS-1000/He Du Pont Biolistics Microparticle Acceleration System (BIO RAD). Los embriones bombardeados se mantuvieron por 16 h en medio osmótico y posteriormente, fueron transferidos a medio de mantenimiento y de germinación e incubados en oscuridad a 27°C (Rivera-Domínguez *et al.*, 2004) bajo condiciones selectivas (300 mg de kanamicina). La reacción de PCR se realizó utilizando ADN genómico de embriones en germinación con iniciadores específicos para el gen *nptII* (Blake *et al.*, 1991) y *J1* (Houlné *et al.*, 1998). El ensayo *in vitro* se realizó exponiendo a los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger* y *Fusarium* sp., y discos impregnados con extractos proteicos de embriones en germinación (Meyer *et al.*, 1996). Se realizaron al menos cinco réplicas en cada ensayo y se repitió en dos ocasiones.

La transformación de embriones de mango con el gen *J1*, fue verificado mediante la amplificación del gen *nptII* y el gen *J1* [Figura 1 (A1) y (A2)]. El ensayo *in vitro* de los hongos *C. gloeosporioides*, *A. niger* y *Fusarium* sp., reveló que al igual que el fungicida comercial benomilo (control positivo), el extracto proteico obtenido de los tejidos transformados, logró inhibir el crecimiento de los hongos formando un halo de inhibición del crecimiento micelial alrededor de los discos impregnados. En contraste, se muestra proliferación y crecimiento del fitopatógeno alrededor y sobre los discos impregnados con agua destilada estéril, buffer de extracción y del extracto proteico de los tejidos sin transformar [Figura 1 (A3), (A4) y (A5)].

Los extractos proteicos obtenidos de embriones transgénicos de mango cv. 'Ataulfo' lograron inhibir el crecimiento de los hongos *C. gloeosporioides*, *A. niger* y *Fusarium* sp. Estos resultados junto con la amplificación de los genes *J1* y *nptII* del ADN genómico de los embriones, indican la incorporación y la expresión del transgen. Este es el primer trabajo que reporta la transformación genética de embriones de mango utilizando el gen de la proteína J1.

LITERATURACITADA

- Blake, N.K., Ditterline, R.L. and Stout, R.G. 1991. Polymerase chain reaction for monitoring multiple interaction in *Agrobacterium*-mediated transformation. *Crop Science* 31:1686-1688.
- Houlné, G., Meyer, B. and Schantz, R. 1998. Alteration of the expression of a plant defensin gene by exon shuffling in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Molecular and General*

pathogenic fungi.

Biolistic genetic transformation was performed using plasmid pKYLX80-J1 containing *J1* Bell pepper gene (Meyer *et al* 1996) under the CaMV35S promoter and the kanamycin resistant gene *nptII* incorporated into the plasmid pKYLX80. The bombardment conditions were helium pressure of 1200 psi, set pressure of 800 psi and 9 cm distance in a PDS-

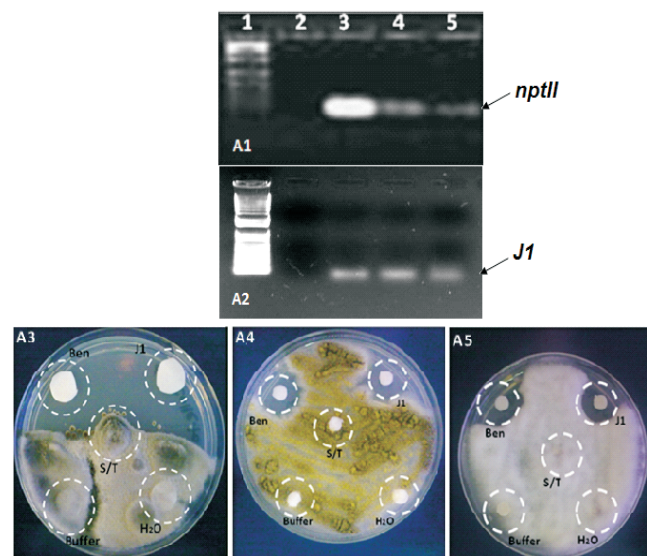


Figura 1. Análisis de la amplificación por PCR (arriba, foto de geles) del gen *nptII* (A1) y del gen *J1* (A2). Carril 1, marcador de pesos moleculares; carril 2, amplificación del ADN genómico de embriones sin transformar; carril 3, amplificación del ADN plasmídico (pKYLX80-J1); carriles 4 y 5, amplificación de ADN genómico de embriones transformados con los genes *J1* y *nptII*. Abajo, efecto de extractos proteicos de embriones en germinación transformados con el gen *J1* sobre el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* (A3), *Aspergillus niger* (A4) y *Fusarium* sp. (A5). Ben, benomilo (200 ppm); J1, extracto proteico (100 mg de proteína) de embriones transformados con el gen *J1*; S/T, extracto proteico de embriones sin transformar; Buffer (extracción de proteínas); H₂O, agua destilada estéril. Las áreas marcadas con círculos en líneas discontinuas indican la posición de los discos.

Figure 1. Analysis of the PCR amplification (above, photo of gels) of the *nptII* gene (A1) and the *J1* gene (A2). Lane 1, molecular weight marker; lane 2, amplification of genomic DNA from untransformed embryos; lane 3, amplification of plasmidic DNA (pKYLX80-J1), lanes 4 and 5, amplification of genomic DNA from embryos transformed with the *J1* and *nptII* genes. Below, effect of protein extracts from germinating embryos transformed with the *J1* gene on the mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (A3), *Aspergillus niger* (A4) and *Fusarium* sp. (A5). Ben, benomyl (200 ppm); J1, protein extract (100 mg protein) of embryos transformed with the *J1* gene; S/T, protein extract from untransformed embryos; Buffer, protein extraction buffer; H₂O, sterile distilled water. Areas marked with circles in dashed lines indicate the position of the discs.

Genetic 259:504-510.

- Meyer, B., Houlné, G., Pozueta-Romero, J., Schantz, M.L. and Schantz, R. 1996. Fruit specific expression of a defensin type gene family in bell pepper. *Plant Physiology* 112:615-622.
- Rivera-Domínguez, M., Manzanilla, M.A., Robles, M. and Gómez-Lim, M.A. 2004. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration of "Ataulfo" mango (*Mangifera indica*). *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 79:1-4.
- Zainal, Z., Marouf, E., Ismail, I. and Fei, C.K. 2009. Expression of the *Capsicum annum* (Chili) defensin gene in transgenic tomatoes confers enhanced resistance to fungal pathogens. *American Journal of Plant Physiology* 4:70-79.

1000/He Du Pont Biolistics Microparticle Acceleration System (BIO RAD) bombing chamber. The bombarded embryos were maintained for 16 h in osmotic medium and then were transferred to maintenance and germination and incubated in the dark at 27°C (Rivera-Domínguez *et al.*, 2004) under selective conditions (300 mg kanamycin). The PCR reaction was performed using genomic DNA from germinating embryos with specific primers for the *nptII* (Blake *et al.*, 1991) and *J1* (Houlné *et al.*, 1998) genes. The *in vitro* testing was performed by exposing the fungi *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger* and *Fusarium* sp., and disks impregnated with protein extracts from germinating embryos (Meyer *et al.*, 1996). At least five replicas were performed in each trial and were repeated twice.

The transformation of mango embryos with the *J1* gene was verified by amplifying the *nptII* gene and the *J1* gene [Figure 1 (A1) and (A2)]. The *in vitro* testing of the fungi *C. gloeosporioides*, *A. niger* and *Fusarium* sp. revealed that as the commercial fungicide benomyl (positive control), the protein extract obtained from transformed tissues, was able to inhibit the growth of fungi forming an inhibition halo of mycelial growth around the impregnated discs. In contrast, proliferation and growth of the pathogen was shown on and around disks impregnated with sterile distilled water, extraction buffer and protein extract from untransformed tissue [Figure 1 (A3) (A4) and (A5)].

Protein extracts obtained from transgenic embryos of mango cv. 'Ataulfo' managed to inhibit the growth of the fungi *C. gloeosporioides*, *A. niger* and *Fusarium* sp. These results together with the amplification of the *J1* and *nptII* genes of the genomic DNA of the embryos indicate the incorporation and expression of the transgene. This is the first study that reports the genetic transformation of mango embryos using the *J1* protein gene.