



Effect of three strains of *Agrobacterium rhizogenes* and explant type on genetic transformation of *Stevia rebaudiana*

Efecto de tres cepas de *Agrobacterium rhizogenes* y el tipo de explante sobre la transformación genética de *Stevia rebaudiana*

Luz Calderón- Gabriel ¹, Adriana Jiménez -Brigada ¹, Ariana Arlene Huerta -Heredia ^{1, 2}, Jacqueline Capataz-Tafur ¹, Edgar García-López ^{1, 2}. ¹Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec, Instituto de Biotecnología, División de Estudios de Posgrado. Oax. C. P. 68301.

²Catedras CONACYT-UNPA

*e-mail: egarcia@unpa.edu.mx, egarcialo@conacyt.mx

ABSTRACT

Stevia rebaudiana Bertoni is a plant that accumulates steviol glycosides (SGs) which have a sweetening power over 300 times greater in the pure compounds than sucrose. In addition, the SGs do not provide any calories. A promising strategy to improve the SGs production is the establishment of hairy root cultures via agrotransformation. The effect of three *Agrobacterium rhizogenes* strains LB9402, K599 and AR4 on the induction of hairy roots in *Stevia rebaudiana* was evaluated. The transformation procedure was mediated by *A. rhizogenes* in two types of plant material: hypocotyl explants and whole seedlings. The putative hairy roots started emerging one week after infection. These roots were separated from the explants and were cultivated independently in semisolid MS culture medium for their propagation. The LB9402 strain showed the greatest virulence towards *S. rebaudiana*, due to the large induction of putative hairy roots after 7 and 15 days in comparison with the other strains.

Keywords: Agrotransformation, hairy roots, steviosides

RESUMEN

La planta *Stevia rebaudiana* Bertoni acumula glucósidos de esteviol diterpénicos (GEDs), que llegan a tener un poder edulcorante en estado puro 300 veces mayor que el de la sacarosa y no aportan calorías. Una estrategia prometedora para mejorar la producción de GEDs es la generación de raíces transformadas vía agrotransformación, para ello en este trabajo se tuvo como objetivo evaluar el efecto de tres cepas de *Agrobacterium rhizogenes*: LB9402, K599 y AR4, sobre la formación de raíces aéreas en *Stevia rebaudiana*. La transformación se realizó por infección mediada por *A. rhizogenes* en dos modalidades, explantes de hipocotilo y en plántulas completas. Las raíces putativas empezaron aemerger a partir de la primera semana de infección, las cuales fueron separadas y cultivadas independientemente en medio MS semisólido para su propagación. La cepa LB9402 mostró

la mayor virulencia hacia *S. rebaudiana*, en términos del tiempo acelerado de infección ya que mostró la mayor cantidad de raíces putativas en los lapsos de 7 y 15 días.

Palabras clave: Agrotransformación, raíces transformadas, esteviósidos.

1. INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta herbácea perenne que pertenece a la familia Asteraceae, es originaria de algunas regiones de América del Sur (Paraguay y Brasil) donde es conocida como "la hierba dulce de Paraguay" (Geuns 2003). Es una planta interesante porque acumula glucósidos de esteviol diterpénicos (GEDs), su poder edulcorante en estado puro puede ser 300 veces mayor que el de la sacarosa y no aporta calorías. Los compuestos responsables del dulzor de la *Stevia* son principalmente el esteviósido y el rebaudiósido A, y en menor proporción esteviolbósido, rebaudiósido A, B, C, D, E y F y dulcósido (Yang *et al.*, 2014). Estas características han hecho que se utilicen como sustituto de azúcares y como adyuvantes en el tratamiento de la diabetes y obesidad (Anton *et al.*, 2010).

Por otro lado, la ingeniería genética ha tomado una posición preponderante en el mejoramiento de plantas, al introducir con rapidez las características de interés, es decir, a través de la transformación genética. Dentro de las principales metodologías que se utiliza en la transformación están: *Agrobacterium spp*, biobalística y electroporación (Loaiza & Valverde, 2006).

Agrobacterium rhizogenes es una bacteria gram-negativa del suelo patogénica de plantas que induce la formación de raíces pilosas en los sitios de infección que expresan genes transferidos por la bacteria; es una técnica utilizada con éxito en los últimos años como vector de genes heterólogos (Chandra 2012). Contiene un plásmido Ri (inductor raíz) que incluye un segmento denominado ADN-T que es la región del plásmido Ri que se transfiere al genoma de la planta. El ADN transferido (ADN-T) contiene un conjunto de oncogenes, entre ellos los genes *rol*, cuya expresión, en células vegetales, conduce a un crecimiento neoplásico de los tejidos (Tzfira & Citovsky 2006).

Las raíces transformadas generadas vía agrotransformación son un sistema prometedor para la producción de metabolitos secundarios, por sus características como mayor estabilidad genética; crecimiento acelerado; además tienen la capacidad de continuar su crecimiento de una manera autónoma, aún separadas de la planta madre, si son cultivadas *in vitro* en ausencia de hormonas de crecimiento (Srivastava & Srivastava 2012).

En el presente trabajo se evaluó el efecto de tres cepas de *Agrobacterium rhizogenes*: LB9402, K599 y AR4 sobre la transformación de plántulas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* para generar cultivos de raíces trasformadas útiles para el estudio de la regulación metabólica dentro de la ruta.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Material biológico y desinfección

El material vegetal utilizado fueron plántulas *in vitro* de *S. rebaudiana* de dos meses de edad generadas en el Laboratorio de cultivo de células vegetales de la universidad del Papaloapan y explantes provenientes de plantas crecidas en invernadero. Estos últimos explantes fueron sometidos a un proceso de desinfección que incluyó lavados secuenciales con agua estéril, detergente líquido comercial, hipoclorito de sodio al 3% y finalmente con etanol al 70 %, todo esto se realizó dentro de una campana de flujo laminar.

Las cepas utilizadas fueron LB9402, AR4 y K599, que contienen plásmidos silvestres, el plásmido Ri (inductor raíz), que contiene cuatro genes, *rol A, B, C* y *D* fundamentales en la inducción de raíces; las cuales fueron donadas amablemente por el Dr. Graciano Calva Calva del laboratorio de Ingeniería Metabólica del CINVESTAV-IPN unidad Zácatenco.

Las bacterias fueron cultivadas de acuerdo a su uso en medio LB semisólido o líquido y se incubaron a 28°C por 48 hr.

1.2. Agrotransformación

La infección se llevó a cabo en 2 modalidades, en hipocotilos y plántulas, con tres cepas diferentes K599, LB9402 y AR4. La infección de todos los hipocotilos se llevó a cabo al ponerlos en contacto con una suspensión bacteriana de 48 horas de crecimiento (fase exponencial) en medio LB de las cepas, correspondientemente. En las plántulas, se les cortó la parte aérea y se infectaron en la herida de la manera antes descrita. Algunos frascos con explantes de hipocotilo y plántulas no fueron expuestos a la bacteria como controles negativos de infección. Todos los especímenes infectados fueron puestos en medio semisólido MS suplementado con sacarosa 2% y vitaminas, sin reguladores de crecimiento y fueron incubados a 25 °C, bajo un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Las raíces emergidas del punto de punción en la plántula o explante infectado, se cortaron y propagaron independientemente en medio MS (Murashige y Skoog 1962) semisólido adicionado con cefotaxima (300 µg/ml). Estos explantes se resembraron en medio fresco cada 5 días para eliminar la colonización de *Agrobacterium* y obtener cultivos axénicos. Por otro lado, se utilizaron las raíces de cultivos *in vitro* de las plántulas de *Stevia*, para el establecimiento de cultivos de raíces no transformados, las cuales se colocaron en matraces con medio líquido MS con IBA (ácido indol butírico) 0.5 mg/l y se incubaron a 25° C en un fotoperíodo de 16-8 horas luz-oscuridad en agitación a 110 rpm para ser utilizados como control, para la comparación en la producción de raíces transformadas y no transformadas.

2. RESULTADOS

La infección con *A. rhizogenes* indujo raíces aéreas y pilosas en los puntos de punción de manera general en todos los especímenes. Estas raíces aparecieron a los 7 días de cultivo en

los hipocotilos y plántulas infectados con las cepas LB9402 y AR4, sin embargo la cepa K599 indujo las primeras raíces aéreas a los 15 días (fig. 1). Las raíces emergidas mostraban las características morfológicas típicas de las raíces transformadas: vellosidad abundante, rápido crecimiento y alta ramificación, las cuales fueron separadas y cultivadas independientemente en medio MS para su propagación (fig. 2).

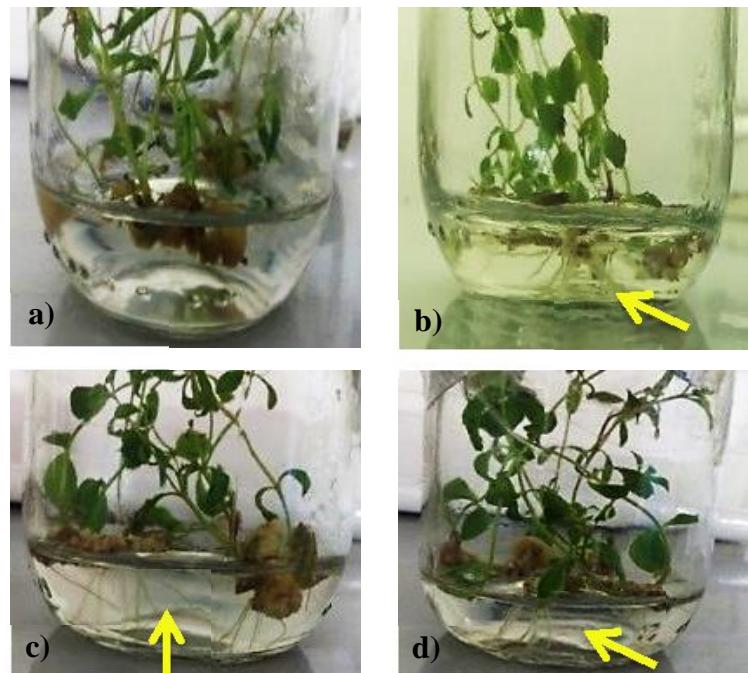


Fig. 1.- a) Explante control, b) Raíces emergidas en hipocotilos infectados con AR4 (flechas), c) Hipocotilos infectados con LB9402, d) hipocotilos infectados con K599.



Fig. 2.- Crecimiento independiente de raíces putativas en medio MS después de 15 días de cultivo.

El conteo de raíces emergidas después de un mes de cultivo y tiempo de infección se muestra en la tabla 1. Todos los explantes que fueron desinfestados provenientes de planta de invernadero, no mostraron respuesta a la infección por *A. rhizogenes*.

Las raíces emergidas son eventos totales de transformación, es decir las raíces que salieron durante todo el tratamiento, vimos que la cepa LB9402 en las dos modalidades obtuvo el mayor número de raíces esto se debe a que es la cepa que mostró la mayor virulencia hacia *estevia*. El tiempo de aparición de raíces se refiere al tiempo en que aparecieron las primeras raíces, cuando se empezó a observar los efectos aparentes de transformación (vellosidad abundante, rápido crecimiento y alta ramificación).

Tabla 1. Comparación del número de raíces emergidas después de 7 y 15 días, en la infección con las tres cepas y el tiempo de aparición de las primeras raíces, con cada uno de los tratamientos.

Cepas	Hipocotilos			Plántulas		
	AR4	LB9402	K599	AR4	LB9402	K599
Raíces emergidas	37	50	44	50	87	60
Tiempo de aparición de raíces	7 días	7 días	15 días	7 días	7 días	15 días

4. DISCUSIÓN

La virulencia en la agrotransformación es una condición en la cual la infección genera la mayor cantidad de raíces en el menor tiempo posible. Esta condición puede variar en las diferentes cepas de *A. rhizogenes*. La selección del tipo de explante y la cepa de *A. rhizogenes* es un factor muy importante que afecta a la frecuencia de transformación (Valimehr *et al.*, 2014). Estudios anteriores han demostrado que existen varios factores, tales como genotipo, factores físicos y químicos, y tipo de explante, que afectan la transformación genética por mediada *Agrobacterium* (Sarker and Biswas 2002, Lengliz *et al.*, 2009). En el presente trabajo se evaluó el efecto de tres tipos de cepas LB9402, K599 y AR4 para infectar dos tipos material vegetal: hipocotilos y plántulas; y determinar el número de eventos de transformación totales, se encontró que la cepa LB9402 fue la más virulenta. Resultados similares de virulencia se han encontrado durante la infección de *Prosopis chilensis* (algarrobo chileno) en la cual se obtuvo un mayor número de eventos de enraizamiento en comparación con las raíces normales de esta planta y con el uso de IBA (ácido 3 indol-butírico) (Caro *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha reportado que la elección de las cepas más efectivas o virulentas de *A. rhizogenes* es altamente dependiente de la especie vegetal utilizada y debe ser determinado empíricamente (Thwe *et al.* 2016). En este contexto, se han reportado numerosos experimentos que soportan lo observado en este trabajo (Ionkova y Fuss 2009, Gangopadhyay *et al.* 2010, Thwe *et al.* 2016), por ejemplo, se han probado distintas cepas de *A. rhizogenes* en la transformación de *Artemisia annua* (ajeno) donde la frecuencia de transformación de LB9402 fue de 100% obteniendo el mayor número de raíces emergidas (Giri *et al.*, 2001). Aunque los pasados datos fueron obtenidos en sistemas diferentes nos permiten soportar los resultados obtenidos en este trabajo sobre la mayor virulencia de *A. rhizogenes* LBA9402 sobre *S. rebaudiana*.

Las raíces transformadas se han utilizado para distintos fines, por ejemplo, para la inducción de raíces transformadas de *Berberis aristata* (árbol de la cúrcuma), una planta en peligro de extinción. En ese trabajo se evaluó que los tipos de explantes también influyeron en la generación de raíces transformadas debido a la actividad meristemática, y se encontró que la cepa MTCC 532 fue más eficaz obteniéndose el protocolo para la inducción de la raíz pilosa que podría ser más útil para la producción de berberina, un alcaloide isoquinolénico con actividad antibiótica y de regulación del metabolismo de glucosa y lípidos (Brijwal & Tamta 2015). Si bien es cierto que la cepa MTCC 532 no fue utilizada en el desarrollo para el protocolo del presente trabajo, datos como los discutidos anteriormente muestran una diferencia entre la virulencia de diferentes cepas contra variadas especies vegetales de manera similar a lo observado en este trabajo y justifica la realización de experimentos en los que se evalúen la susceptibilidad de cada especie en particular a la transformación genética mediada por *A. rhizogenes*. Interesantemente también se encuentran trabajos en los cuales las raíces transformadas han sido utilizadas para la inserción de características de interés, como en la producción y caracterización de hormona de crecimiento humano (hGH1) producida por cultivos de raíces transformadas en *Brassica oleracea* var. *italica*, donde se encontró que los cultivos de raíces tienen potencial como una alternativa de producción de compuestos de alto valor agregado (García *et al.*, 2013), de manera análoga a la aplicación proyectada a mediano plazo para las raíces transformadas de *S. rebaudiana* en la producción de GEDs.

Así, en conclusión, se logró establecer un protocolo de inducción de raíces transformadas a partir de plántulas e hipocotilos *in vitro* de *S. rebaudiana* en el cuál se observó que la cepa LBA9402 mostró la mayor virulencia hacia *S. rebaudiana*, en cuanto al tipo de explantes se observó que en la modalidad de plántula se obtuvo el mayor número de raíces.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto 3212 Cátedra-CONACyT (N° 183958), INFRA CONACyT N° 255514. Al CONACyT por el apoyo otorgado al primer autor a través del Programa de Fortalecimiento Académico para Indígenas.

CONFLICTO DE INTERESES

No existe conflicto de interés.

REFERENCIAS

- Anton S. D., Martin CK., Han H., Cefalu WT., Geiselman P. & Williamson D. A. 2010. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*.;55: 37-43.
- Brijwal L; Tamta S. 2015. *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in endangered *Berberis aristata* DC. *SpringerPlus* 4:443.

Caro L., Marinangeli P., Curvetto N. R & Hernández L. 2000. *agrobacterium rhizogenes* vs inducción auxínica para la rizogénesis in vitro de *prosopis chilensis* (mol.) stantz. multequina 9: 47-53.

Chandra S. 2012. Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnol Lett* 34:407–415.

Gangopadhyay M, Dewanjee S, Bhattacharyya S, Bhattacharya S. 2010. Effect of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* and nature of explants on *Plumbago indica* hairy root culture with special emphasis on root biomass and plumbagin production. *Nat Prod Commun*. 5(12):1913-6.

García E., Ramos .E. G., Gómez O. & Calva G. 2013. MALDI-TOF Characterization of hGH1 Produced by Hairy Root Cultures of *Brassica oleracea* var. *italica* Grown in an Airlift with Mesh Bioreactor. *American Institute of Chemical Engineers* 30:161–171.

Geuns, J. 2003. Stevioside. *Phytochem*. 64, 913-921.

Giri A, Ravindra S. T., Dhingra V. & Narasu L.M. 2001. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. *current science*, vol. 81, no. 4.

Giri A., Giri C. C., Dhingra V., & Narasu M. L. 2001. Enhanced podophyllotoxin production from *Agrobacterium rhizogenes* transformed cultures of *Podophyllum hexandrum*. *Nat Prod Lett* 15:229–235.

Ionkova I, Fuss E. 2009. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and lignan production in *Linum tauricum* ssp. *tauricum*. *Phcog Mag*. 5:14-8

Lengliz R., Gorsane F., Majoul H., Fakhfakh H. 2009. Molecular and phenotypical characterization of transgenic tomato plants: *Solanum lycopersicon*. *Acta Hortic. (ISHS)* 823: 33-40.

Loaiza J; Valverde R. 2006. Transformación genética de *Echinacea purpurea* Y *E. angustifolia* mediante *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía Costarricense* 30(1): 27-34. ISSN:0377-9424.

Murashige T; Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant*.3:473-479.

Sarker RH., Biswas A. 2002. In vitro Plantlet Regeneration and *Agrobacterium* mediated Genetic Transformation of Wheat (*Triticum aestivum L.*). *Plant Tissue Cult*. 12(2): 155-165.

Srivastava S; Srivastava A. K. 2012. In Vitro Azadirachtin Production by Hairy Root Cultivation of *Azadirachta indica* in Nutrient Mist Bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol* 166:365–378.

Thwe A., Valan Arasu M., Li X., Park C. H., Kim S. J., Al-Dhabi N. A., & Park S. U. 2016. Effect of Different *Agrobacterium rhizogenes* Strains on Hairy Root Induction and Phenylpropanoid Biosynthesis in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum Gaertn.*). *Frontiers in Microbiology*. 7, 318.

Tzfira T; Citovsky V. 2006. Current *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. 17:147–154.

Valimehr S., Sanjarian F., Hashemi H., Sharafi A., Sabouni F. 2014. A reliable and efficient protocol for inducing genetically transformed roots in medicinal plant *Nepeta pagonosperma*. *Physiol Mol Biol Plants* 20(3):351–356

Yang Y., Huang S., Han Y., Yuan H., Gu C. & Wang Z. 2014. Environmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in *Stevia rebaudiana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 0981-9428.