

## Determinación de la dosis letal mínima de fosfinitricina para la selección de transformantes de banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*)

Idalmis Bermúdez-Carabaloso\*, Rafael G. Kosky, Maritza Reyes, Borys Chong. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: idalmis@ibp.co.cu

### RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la dosis letal mínima del agente selectivo fosfinitricina, para establecer las condiciones adecuadas de selección de agregados celulares embriogénicos de banano cv. 'Grande naine' transformados genéticamente. Se empleó el medio de cultivo Schenk y Hildebrandt, modificado por Bieberach, al que se adicionaron diferentes concentraciones del agente selectivo (0, 3, 6, 9 y 12 mg. l<sup>-1</sup>). La evaluación del número de explantes muertos se realizó de forma visual a los 30 días de cultivo con la ayuda de una escala de grados elaborada en el trabajo, así como la vitalidad celular por tinción con Diacetato de Fluoresceína (DAF). Las concentraciones del agente selectivo empleadas provocaron la muerte de las células vegetales. Este efecto se incrementó al aumentar la concentración y el tiempo de exposición del material vegetal al medio con el agente selectivo (incremento de la toxicidad). Se seleccionó como la dosis letal mínima la de 6 mg.l<sup>-1</sup>, por ser la que produjo necrosis total en las células de banano y muerte del tejido cuando se observó al microscopio la vitalidad de los agregados celulares.

Palabras clave: agentes de selección, agregados celulares, transformación genética

### ABSTRACT

The present work had the objective of determining the minimum lethal doses of the selective agent phosphineotricine, to establish the adequate conditions for the selection of genetically transformed cellular embryogenic aggregates of banana cultivar Grande Naine. Schenk and Hildebrandt culture medium, modified by Bieberach, was used, adding different concentrations of the selective agent at (0, 3, 6, 9 and 12 mg. l<sup>-1</sup>). The evaluation of the survival of the explants was carried out visually to the 30 days of culture using the scale elaborated in this work, as well as the cellular vitality for staining with Diacetate of Fluoresceine (DAF). The concentrations of the selective agent used, were the cause of the plant cells death. This effect was increased when increasing the concentration and the time of exposition from the vegetable material to the culture medium with the selective agent (increase of the toxicity). The minimal lethal doses selected was 6 mg.l<sup>-1</sup> because the total necrosis in the banana cells and death of the tissue produced when was observed to the microscope the vitality of the cellular aggregates.

Key words: cellular aggregates, genetic transformation, selection agents

### INTRODUCCIÓN

Los frutos del banano constituyen una de las bases de la alimentación humana al proporcionar una fuente importante de vitaminas y minerales, este ocupa el cuarto lugar en el mundo en consumo y en importancia económica, además de ser el fruto tropical más importante del mundo. América Latina es una de las regiones más productoras en el mundo con alrededor de 7.3 millones de toneladas anuales (FAOSTAT, 2004).

A nivel mundial el problema más importante que afecta las producciones de bananos y plátanos es la enfermedad Sigatoka negra. Los métodos tradicionales de Mejoramiento Genético son difíciles y demorados por lo que la utilización de otras herramientas como la Biotecnología Vegetal pueden facilitar estos programas. Los embriones somáticos y las células embriogénicas en suspensión son materiales excelentes para desarrollar programas de

mejora genética; obtención de mutantes, selección *in vitro*, así como la introducción de genes por medio de la ingeniería genética (Kosky, 1998).

Esta última aparece como una alternativa importante para superar las limitaciones que presentan los métodos clásicos de mejoramiento en el género *Musa*, gracias a la posibilidad de introducir cambios genéticos específicos en un corto período de tiempo (Sagi *et al.*, 1994).

En todos los sistemas de transformación de plantas, solamente una fracción de las células de la planta expresa el Acido desoxirribonucleico (ADN) foráneo llegando a ser establemente transformada. Estas células sientan las bases para la regeneración de plantas transgénicas. Con las células transformadas se puede llevar a cabo selección negativa usando agentes selectivos, que provoquen la muerte o inhiban completamente el crecimiento de las células de la planta sin transformar; en combinación con un

marcador de selección expresado en las células transformadas que confiere resistencia al producto tóxico. Alternativamente los métodos de selección positiva, favorecen el crecimiento y regeneración de las células de la planta transformada, mientras las células no transgénicas están carentes de medios para crecer (Pérez, 2000).

La mayoría de los sistemas de selección usados para la transformación de plantas se han basado en el principio de la selección negativa (Bowen, 1993; Schrott, 1995). Comúnmente el uso de agentes selectivos incluye: antibióticos, herbicidas y niveles tóxicos de aminoácidos o sustratos análogos de enzimas.

Los genes marcadores de selección más ampliamente usados como han sido el *neo* (npt II) (Bevan *et al.*, 1983) y *hpt* (Waldron *et al.*, 1985) que fueron genes aislados de *Escherichia coli* y codifican para la enzima neomicina fosfotransferasa II (NPT II) y la higromicina fosfotransferasa (HPT) respectivamente, y el gen *bar* aislado de *Streptomyces hygrosopicus* y codifica para la fosfinotricina acetil transferasa (PAT) (De Block *et al.*, 1987).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar la dosis letal mínima del agente selectivo fosfinotricina, para establecer las condiciones adecuadas de selección de los agregados celulares embriogénicos de banano transformados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron agregados celulares embriogénicos obtenidos a partir de flores masculinas inmaduras de inflorescencias del cultivar 'Grande naine' (*Musa AAA*), siguiendo la metodología propuesta por Kosky *et al.* (1999), con cinco días después de subcultivadas (Sági *et al.*, 1995). Se ajustó la concentración de la suspensión celular en un tubo cónico de 15 ml de capacidad, a 33% del volumen

de células sedimentadas. Con la ayuda de una micropipeta (SOCOREX) de 1 000  $\mu$ l se homogeneizó la suspensión celular y se tomaron 200  $\mu$ l de agregados celulares.

### Determinación de la dosis letal mínima de fosfinotricina

Se empleó el medio de cultivo Schenk y Hildebrandt (1972), modificado por Bieberach (1995) al que se adicionaron diferentes concentraciones fosfinotricina (0, 3, 6, 9 y 12  $\text{mg.l}^{-1}$ ). La solución inicial de este agente selectivo se preparó a una concentración de 20  $\text{mg. ml}^{-1}$ , se esterilizó por filtración y fue añadido al medio de cultivo en la cabina de flujo laminar después que este alcanzó una temperatura de aproximadamente 45°C.

Se utilizaron 10 placas de Petri de 9.0 cm de diámetro por cada tratamiento, con cuatro mallas de *nylon* de 2.0  $\text{cm}^2$ , a las cuales se les adicionaron 200  $\mu$ l de agregados celulares al 33 % del volumen de células sedimentadas. Estas placas fueron selladas con *Parafilm* y colocadas en la oscuridad total a una temperatura de  $27 \pm 2.0$  °C por 30 días.

La evaluación del número de explantes muertos se realizó de forma visual a los 30 días de cultivo mediante la escala de grados que se muestra en la tabla 1.

### Determinación de la vitalidad celular de los agregados celulares

Los agregados celulares expuestos a las diferentes concentraciones del agente selectivo fueron observados al microscopio óptico OPTON (Axioskop) con una cámara digital OLYMPUS DP 70 acoplada, instalada sobre Windows XP para determinar la vitalidad celular, la misma se realizó a los 30 días por tinción con Diacetato de Fluoresceína (DAF).

Los datos se analizaron a través de la Prueba de Chi-Cuadrado sobre el paquete estadístico STATGRAFICS Versión 4.1 sobre Windows.

Tabla 1. Escala de grados de afectación de los agregados celulares embriogénicos de banano cultivar 'Grande naine' (*Musa AAA*) para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de fosfinotricina.

Grado	Descripción
1	100%-75% de los agregados celulares muertos
2	75%-49% de los agregados celulares muertos
3	50%-26% de los agregados celulares muertos
4	25%-1% de los agregados celulares muertos
5	0% de los agregados celulares muertos

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación de la dosis letal mínima de fosfinitricina

En todas las concentraciones del agente selectivo estudiadas se observó oscurecimiento de los agregados celulares embriogénicos, después de una semana de cultivo. Este efecto se incrementó al aumentar la concentración y el tiempo de exposición del material vegetal al medio de cultivo con la fosfinitricina (incremento de la toxicidad). Después de 30 días de cultivo se obtuvo una necrosis total de los agregados celulares cultivados en las concentraciones de 6, 9 y 12 mg.l<sup>-1</sup>. El control se mantuvo sin cambio de coloración y con multiplicación celular durante todo el tiempo evaluado (Figura 1). La utilización de agregados celulares embriogénicos para iniciar el proceso de selección facilita los resultados ya que según, Abreu *et al.* (2005) las células menos desarrolladas son menos tolerantes y van manifestando rasgos de necrosis paulatina en presencia del agente de selección.

Bui (1994) obtuvo resultados similares en agregados celulares provenientes de suspensiones celulares de *Musa acuminata* ssp. *burmannica* tipo Long Tavoy (AA), banksii (AA), malaciensis (AA) y Matavia (cv. Inconnu) (ABB).

En la figura 2 se muestran los porcentajes de mortalidad de los agregados celulares en función de las diferentes concentraciones del agente selectivo,

basados en los grados de afectación según la escala propuesta. Mediante la prueba Chi-cuadrado se encontró significación en la interacción de la concentración del agente selectivo fosfinitricina con los grados de afectación de los agregados celulares.

Fue mayor la frecuencia de aparición del grado de afectación 1 (agregados celulares muertos), en las mayores concentraciones de 6, 9 y 12 mg.l<sup>-1</sup> de fosfinitricina, razón por la cual se seleccionó a partir de la concentración 6 mg.l<sup>-1</sup>, por ser esta la mínima concentración que logró el 100 % de mortalidad de los agregados celulares.

Daniels (2003) obtuvo esta misma concentración de fosfinitricina como la dosis letal mínima en suspensiones celulares embriogénicas de plátano cultivar 'FHIA-21' (*Musa AAAB*), lo cual coincide con los resultados del presente trabajo.

Los resultados fueron corroborados mediante la tinción con DAF. Cuando se observó al microscopio óptico con lámpara ultravioleta la vitalidad de los agregados celulares sometidos al agente selectivo a una concentración de 6 mg.l<sup>-1</sup>, se observó la necrosis total y muerte de las células y agregados de células, lo cual no ocurrió en los agregados celulares con la concentración de 3 mg.l<sup>-1</sup> en que aún con la presencia del agente selectivo aparecían algunos con señales de vitalidad celular (débil fluorescencia) y en los utilizados como control, en la que se mantenían viables las células (Figura 3).

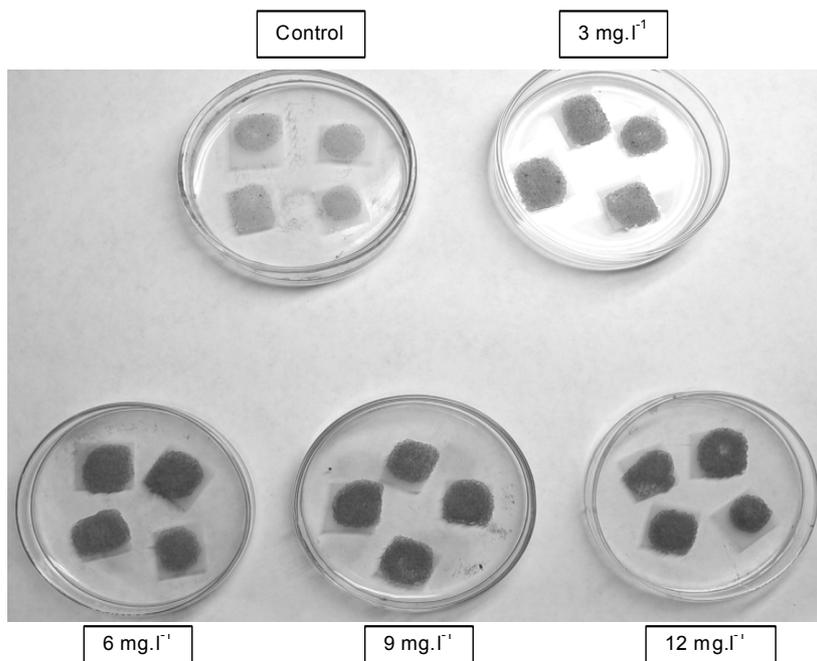


Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones del agente selectivo 'fosfinitricina' sobre el crecimiento de agregados celulares en el cultivar 'Grande naine' (*Musa AAA*) a los 30 días de cultivo.

El modo de acción del herbicida comercial Finalé® consiste en que su ingrediente activo la fosfotricina (PPT), también conocido como glufosinato de amonio, es análogo al glutamato, el sustrato de la enzima glutamina sintetasa. Esta enzima cataliza la conversión de glutamato a glutamina y elimina el amonio tóxico de las células. Cuando se inhibe esta enzima, se produce la acumulación de amonio y la disrupción de la estructura del cloroplasto (Brasileiro y Aragão, 2001). Por lo anteriormente expuesto es que los agregados celulares no transformados, es decir los que no tengan incorporados el gen *bar* que confiere resistencia a la fosfotricina, mueren en presencia de este agente selectivo.

La concentración de la fosfotricina para el proceso de selección varía entre 1 y 100 mg.l<sup>-1</sup>, la cual depende del tejido vegetal y la composición del medio de cultivo (Enríquez, 2002). Este autor regeneró plantas transgénicas de papa y caña de azúcar resistentes al herbicida Finalé® con concentraciones de 2.0 y 4.0 mg.l<sup>-1</sup> respectivamente. Gallardo-Colina *et al.* (2005) sugirieron como la dosis letal mínima de este mismo herbicida, para la selección de plantas *in vitro* de papaya, la de 10 mg.l<sup>-1</sup> por ser la concentración con que se logró el 100% de mortalidad de las plantas *in vitro*.

De acuerdo con Hadi *et al.* (2002) en cualquier procedimiento de transformación genética solo una

pequeña fracción del tejido blanco es transformada, mientras que la mayoría resulta no transformada, por lo cual los sistemas de selección son necesariamente para identificar las células transformadas. La selección involucra usualmente el crecimiento de posibles transformantes en un compuesto químico que inhibirá el crecimiento de las células no transformadas mientras que las células transformadas seguirán creciendo.

A nivel mundial se está tratando de evitar el uso de antibióticos como agentes selectivos, en los protocolos de transformación genética, ya que una de las mayores preocupaciones de los cultivos modificados genéticamente es la presencia de genes que confieren resistencia a antibióticos de importancia clínica. Estos en las plantas transgénicas podrían inactivar las dosis orales de estos antibióticos en los animales y el hombre (Daniell, 1999). Otro aspecto importante es que los genes de resistencia a antibióticos pueden ser transferidos a microbios patógenos del tracto gastrointestinal y al ser vertidos al suelo, ellos resisten el tratamiento con tales antibióticos (Daniell, 2001). Es por ello que estos genes marcadores de selección deben ser eliminados y sustituidos por otros alternativos como es el caso de los herbicidas o la ingeniería genética nuclear (Puchta, 2000).

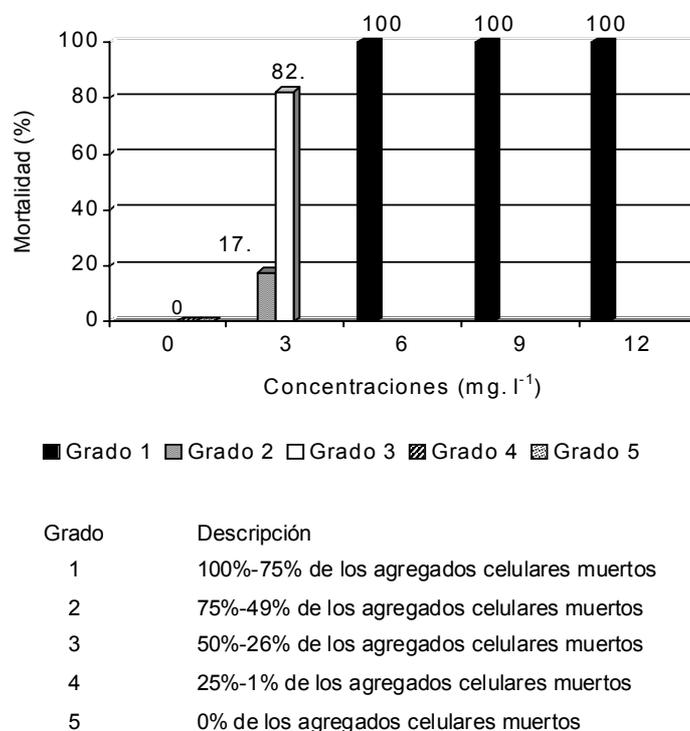


Figura 2. Porcentaje de mortalidad de agregados celulares de banano cultivar 'Grande naine' (*Musa AAA*) en las diferentes concentraciones del agente selectivo fosfotricina.

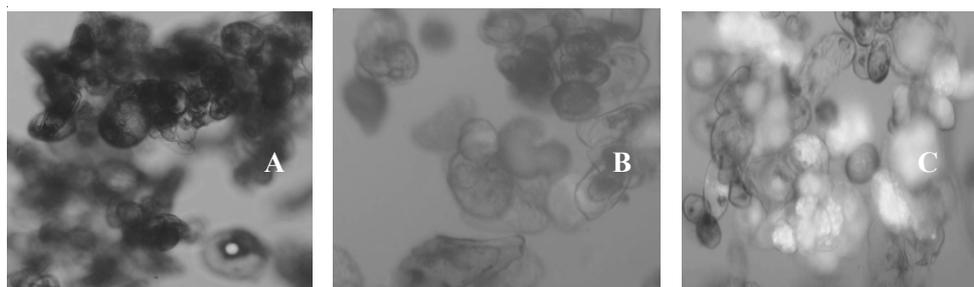


Figura 3. Efecto de la fosfotricina sobre la vitalidad de los agregados celulares embriogénicos en el cultivar de banano Grande naine a los 30 días de cultivo. (A) Efecto del agente selectivo a la concentración de 6 mg.l<sup>-1</sup> (B) Efecto del agente selectivo a la concentración de 3 mg.l<sup>-1</sup> (C) Control no tratado (Aumento 200 x).

## CONCLUSIONES

Se logró la muerte de los agregados celulares de banano cultivar Grande naine (*Musa AAA*), con una dosis letal mínima de 6 mg.l<sup>-1</sup> del agente selectivo fosfotricina, por lo que pudiera ser utilizada en los experimentos de transformación genética en el cultivar de banano 'Grande naine'.

## REFERENCIAS

- Abreu, D, Pérez M, González A, Alfonso J, Valdivia O, Hernández C, Armas R (2005) Evaluación de tolerancia a Finalé® en la germinación y regeneración *in vitro* de dos variedades cubanas de arroz (IACuba – 17 e Incuba – 19). *Biotecnología Vegetal* 5 (1):33-37
- Bevan, M, Flavell RB, Chilton MD (1983) A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 394: 184-187
- Bieberach, C (1995) Embriogénesis somática y regeneración de plantas en cultivares de *Musa spp.* Tesis para optar al grado de *Magister Scientiae*. CATIE, Turrialba, Costa Rica
- Bowen, BA (1993) Markers for plant gene transfer. En: Kung SD y Wu R (Eds). *Transgenic Plants. Volume I. Engineering and Utilization*, pp. 89-123. Academic Press Limited, London
- Brasileiro, ACM, Aragão FJL (2001) Marker genes for *in vitro* selection of transgenic plants. *Journal of Plant Biotechnology* 3 (3). 113-121
- Bui, TV (1994) Utilisation de systemes cellulaires en vue de l'introgression de genes d'intérêt agronomique pour l'amélioration des bananiers. These présentée pour obtenir le grade de Docteur en Sciences. Université de Paris XI. Orsay. France
- Daniell, H (1999) GM crops: Public perception and scientific solutions. *Trends Plant Sci.* 4: 467-469
- Daniell, H, Muthukumar B, Lee SB (2001) Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr Genet* 39: 109-116
- Daniels, DD (2003) Desarrollo de la embriogénesis somática y su empleo en la transformación genética por Biobalística en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa spp.* AAAB). Ph. D. Tesis, Instituto de Biotecnología de las Plantas, UCLV. Santa Clara
- De Block, M, Boterman J, Vandewiele M, Van Montagu M, Leemans J (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* 6: 2513-2518
- Enríquez, GO (2002) Evaluation of *bar* as a selectable marker and production of herbicide resistant plants. En: Resúmenes. VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. IBP. UCLV. Santa Clara. Villa Clara, Cuba
- FAOSTAT (2004) <http://apps.fao.org> (Consultado 1 junio 2005)
- Gallardo-Colina, JC, Gómez RK, Tejeda MF, Posada PL, Herrera IO, Reyes MV, García LA, Freire MS (2005) Dosis letal mínima del herbicida BASTA® en plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99. *Biotecnología Vegetal* 5 (1):51-53
- Kosky, RG (1998) Cultivo de células y tejidos. En: Pérez JN (Ed) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*, pp. 25-44. IBP, Santa Clara
- Kosky, RG, Escalant JV, Reyes MV, Posada LP, Freire MS (1999) Embriogénesis somática en medio líquido en el cv. Gran Enano (*Musa AAA*). *CORBANA* 25 (52): 143-154
- Hadi, MZ, Kemper E, Wendeler E, Reiss B (2002) Simple and versatile selection of *Arabidopsis* transformants. *Plant Cell Reports* 21: 130-135
- Pérez, JB (2000) Development and application of *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation to increase fungus resistance in banana (*Musa spp.*). Ph. D. Thesis, K. U. Leuven, Belgium
- Puchta, H (2000) Removing selectable marker genes: taking the shortcut. *Trends Plant Sci.* 5: 273-274
- Sági, L, Remy S, Panis B, Swennen R, Volckaert G (1994) Transient gene expression in electroporated banana (*Musa spp.*, cv. 'Bluggoe' ABB group) protoplasts isolated from regenerable embryogenic cell suspensions. *Plant Cell Reports* 13 (5): 262-266
- Sági, L, Panis B, Remy S, Schoofs H, De Smet K, Swennen R, Cammue BPA (1995) Genetic transformation of banana and plantain (*Musa spp.*) via particle bombardment. *Bio/Technology* 13: 481-485
- Schenk, RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204
- Schrott, M (1995) Selectable maker and reporter genes. En: Potryjusz I y Spangenberg G (Eds). *Gene Transfer to Plants*. pp. 325-336. Springer-Verlag, Berlín
- Waldrom, C, Murphy EB, Roberts JL, Gustafson GD, Arnour SL, Malcolm SK (1985) Resistance to hygromycin B: A new marker for plant transformation studies. *Plant Mol. Biol.* 5: 103-108