

Dosis letal mínima del herbicida BASTA® en plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99

Jorge Gallardo Colina*, Rafael Gómez Kosky, Marisol Tejeda Fernández, Laisyn Posada Pérez, Idalia Herrera O'farill, Maritza Reyes Vega, Leyanis García Aguilar, Marisol Freire Seijo. * Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: gallardo05@ibp.co.cu, Jorge_gallardo2002@yahoo.es

RESUMEN

Todos los sistemas de transformación genética desarrollados hasta el momento requieren seleccionar aquellas plantas que contengan el transgén introducido y eliminar el resto. Una vía es utilizar como marcador un gen de resistencia a un herbicida. El objetivo de este trabajo se dirigió a determinar la dosis letal mínima del herbicida BASTA® en plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99 para estudios posteriores de transformación genética. Como material vegetal se utilizaron plantas *in vitro*, las cuales se encontraban en el 6^{to} subcultivo de multiplicación. Se empleó el medio de cultivo MS suplementado con 0.45 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 0.14 mg.l⁻¹ de ANA y 3% de sacarosa que fue solidificado con gelrite 2.5 g.l⁻¹, el pH siempre fue ajustado a 5.8 antes de ser autoclaveado. Se utilizaron las concentraciones siguientes del agente selectivo (0, 5, 10, 15 mg.l⁻¹). Se lograron los mejores resultados al utilizar 10 mg.l⁻¹ por ser el tratamiento donde se utilizó la menor concentración del herbicida que produjo el 100% de mortalidad en las plantas *in vitro*.

Palabras clave: biotecnología, *Carica papaya*, medio de cultivo, plantas *in vitro*, selección

ABSTRACT

All the transformation systems developed up to the moment need to select those plants that contain the transgene introduced and eliminate the rest. One way is to use as scoreboard a resistance gene to an herbicide. The main objective was to study the lethal minimal dose of the herbicide BASTA® in *in vitro* plants hybrid IBP 42-99. *In vitro* plants of the papaya hybrid IBP 42-99 were used as plant material, which were in 6th subculture. MS culture medium supplement with 6-BAP 0.45 mg.l⁻¹ and ANA 0.14 mg.l⁻¹, sucrose 3 % was used and hardened with gelrite 2.5 g.l⁻¹, the pH was always adjusted to 5.8 before autoclaved. (BASTA®) was used as selective agent in the following concentrations (0, 5, 10, 15 mg.l⁻¹). The best result were achieved when 10 mg.l⁻¹ were used since it was the treatment with minor concentration of the herbicide that produced the 100 % of mortality in the *in vitro* plants.

Key words: biotechnology, *Carica papaya*, *in vitro* plants, selection, culture medium

INTRODUCCIÓN

En el mejoramiento genético se trata de reunir una combinación de genes en una planta de cultivo que la hagan tan útil y productiva como sea posible (Mahan *et al.*, 1996). Combinar los mejores genes en una sola planta es un proceso largo y difícil, en especial cuando el mejoramiento tradicional se ha limitado al cruzamiento artificial de plantas dentro de la misma especie o entre especies estrechamente emparentadas para reunir diferentes genes. La tecnología de transformación genética permite a los fitomejoradores reunir en una sola planta genes útiles de una amplia gama de fuentes, no sólo de la misma especie de cultivo o de plantas muy emparentadas. Este poderoso instrumento permite a los mejoradores hacer lo que siempre han hecho, generar variedades de cultivos más útiles y productivas que contienen combinaciones nuevas de genes, y además ampliar las posibilidades más allá de las limitaciones impuestas por la polinización cruzada y las técnicas de selección tradicionales (Stewart *et al.*, 2001).

Todos los sistemas de transformación genética desarrollados hasta el momento requieren seleccionar aquellas plantas que contengan el transgén introducido y eliminar el resto. El sistema más sencillo es incorporar otro gen con resistencia a un antibiótico o a un herbicida, de forma que, al realizar el cultivo *in vitro* en presencia del agente de selección (antibiótico o herbicida), se garantiza que únicamente sobrevivirán aquellas que hayan sido transformadas (Wenqui *et al.*, 1999).

Los genes que confieren resistencia a los antibióticos se encuentran entre los marcadores de selección más utilizados en las construcciones genéticas. No obstante, los fitomejoradores, conscientes de los problemas que esto plantea, buscan activamente alternativas. La primera es utilizar como marcador un gen de resistencia a un herbicida. La segunda consiste en colocar un gen marcador y un gen de interés en dos fragmentos diferentes de ácido desoxirribonucleico (ADN) que pueden integrarse en dos sitios del genoma, y separarlos en la

descendencia de las plantas. Esta técnica es costosa y no puede aplicarse a las plantas que se reproducen por multiplicación vegetativa (esquejes o tubérculos) (Cabrera-Ponce *et al.*, 1996).

Teniendo en cuenta lo antes expuesto y ante el interés de transformar genéticamente el híbrido de papaya IBP 42-99 obtenido en el Instituto de Biotecnología de las Plantas este trabajo se trazó como objetivo determinar la dosis letal mínima del herbicida BASTA® en plantas *in vitro* de este genotipo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se utilizaron plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99, las cuales se encontraban en el 6^{to} subcultivo de la fase de multiplicación. Se empleó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 0.45 mg.l⁻¹ de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y 0.14 mg.l⁻¹ de Ácido Naftalenacético (ANA), 3% de sacarosa y solidificado con gelrite 2.5 g.l⁻¹, el pH siempre fue ajustado a 5.8 antes de ser autoclaveado.

El BASTA® utilizado se preparó a una concentración de 20 mg. l⁻¹, se esterilizó por filtración y fue añadido al medio de cultivo en la cabina de flujo laminar después que alcanzó una temperatura de 45°C. Se utilizaron frascos de vidrio con capacidad de 250 ml los cuales se esterilizaron vacíos y luego se les adicionó el medio de cultivo con el agente selectivo (BASTA®), en las concentraciones siguientes: 0, 5, 10 y 15 mg.l⁻¹.

Se cuantificó el número de plantas *in vitro* muertas y se calculó el porcentaje de mortalidad de las plantas

in vitro. Además, se describieron las principales afectaciones que aparecían.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró un 100 % de mortalidad de las plantas *in vitro* en los tratamientos donde se utilizaron 10 y 15 mg.l⁻¹ del agente selectivo (BASTA®), por lo que se determinó como la dosis letal mínima del herbicida 10 mg.l⁻¹, por ser el tratamiento donde se utilizó la menor concentración que produjo un 100% de mortalidad en las plantas *in vitro* (Tabla 1).

En las primeras 48 horas comenzaron a aparecer los primeros síntomas en las hojas adultas, con pequeñas zonas decoloradas en los bordes externos de la punta, pasadas las 72 horas esta decoloración se extendió por todo el borde de las hojas y en la base del tallo donde se le había realizado el corte durante el subcultivo, comenzó a observarse un anillo de color pardo en la zona de los haces vasculares (floema) o en el anillo de cambium que es donde se encuentran las células meristemáticas, ya a los 6 días las hojas más adultas se encontraban completamente cloróticas y con una apariencia putrefacta. Pasados 12 días la totalidad de las plantas *in vitro* se encontraban con las hojas de color blanco completamente decoloradas y cierta flacidez en el tallo y a los 30 días habían muerto. Ello debe estar dado por una hipoxia provocada por el estrés. Se observaron, además, las hojas más próximas a la base ya putrefactas debido a que al caer hacia abajo y tener contacto con el medio de cultivo este exceso de humedad le provocaba la putrefacción (Figura 1).

Tabla 1. Efecto de la concentración del herbicida BASTA® en la mortalidad de plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99.

Tratamientos	mortalidad (%)
1 (0 mg.l ⁻¹)	0
2 (5 mg.l ⁻¹)	80
3 (10 mg.l ⁻¹)	100
4 (15 mg.l ⁻¹)	100

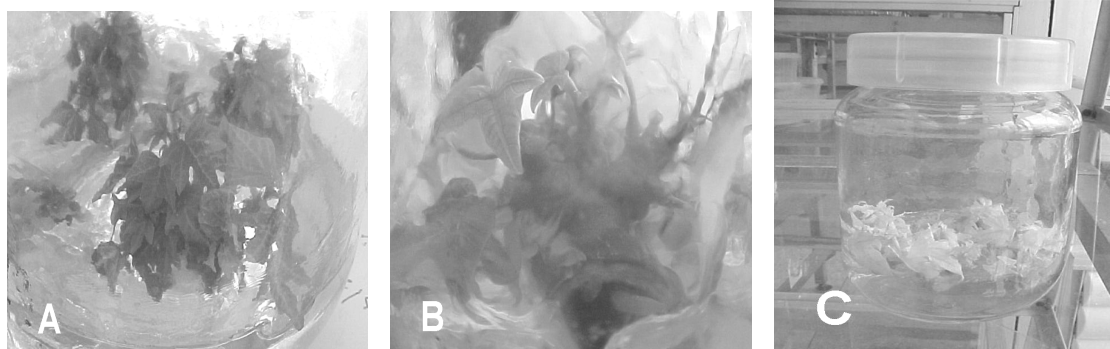


Figura 1. Plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99 pasados 30 días en medio de cultivo de selección con el herbicida BASTA®. A. plantas *in vitro* en medio de cultivo sin agente selectivo. B. Plantas *in vitro* en medio de cultivo con 5mg.l⁻¹ del agente selectivo. C. Plantas *in vitro* muertas en medio de cultivo con 10 y 15 mg.l⁻¹ del agente selectivo.

En los sistemas de transformación genética desarrollados solo la menor fracción de los tejidos es transformada, de esta forma los sistemas de selección son muy necesarios para identificar las células transformadas (Hadi *et al.*, 2002). El marcador de selección más ampliamente utilizado en plantas es el gen que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II (*npt II*), el cual confiere resistencia a los antibióticos aminoglucósidos Kanamicina, neomicina y G418 (Beck *et al.*, 1982; Herrera *et al.*, 1983). Por otra parte, se ha empleado en la selección de plantas transformadas el gen *bar* que confiere resistencia a la fosfotricina, que es el principio activo del herbicida BASTA® (De Block *et al.*, 1987). Su empleo resulta más económico que los anteriores, además del primer método de selección ha provocado el rechazo por parte de ciertos sectores de la opinión con el argumento de que su uso haría proliferar la presencia en la Naturaleza de genes de resistencia a antibióticos (FAO, 2004).

CONCLUSIONES

Fue posible utilizar el herbicida BASTA® para ocasionar mortalidad en plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99. Ello permitirá su uso como agente selectivo en la transformación genética de este material vegetal. Se seleccionó como la dosis letal mínima a 10 mg.l⁻¹, por ser la menor concentración con que se logró el 100% de mortalidad de las plantas *in vitro*.

REFERENCIAS

- Beck, E, Ludwing A, Auerswold EA, Reiss B, Schaller H (1982) Nucleotide sequence and exact localisation of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19: 327 – 336.
- Cabrera-Ponce, JL, Vegas-García A, Herrera –Estrella L (1996) Regeneration of transgenic papaya plants via somatic embryogenesis induced by *Agrobacterium rhizogenes*. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 32: 86 - 90.
- Daniell, H, Muthukumar B, Lee SB (2001) Marker free transgenic plants: engeneering the chloroplast genome without theuse of antibiotic selection. *Curr Genet* 39: 109 - 116
- De Black, M, Boterman J, Vondewiele M, Van montagu M, Leemans J (1987) Engeneering herbicide resistance in plants by expresión of a detoxifying enzyme. *EMBOS* 6: 2513 – 2518.
- Hadi, MZ, Kemper E, Wendeler E, Reiss B (2002) Simple and versatile selection of *Arabidopsis* Transformations. *Plant Cell Rep* 21: 130 – 135.
- FAO (2004) Plantas y alimentos transgénicos [en Línea] En: <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2004/41714/index.html>. [Consultada el 7 junio del 2005].
- Mahan, RE, Bateson MF, Chamberlain DA, Higgins CM, Drew RA, Dale JL (1996) Transformation of an Australian variety of *Carica papaya* L. using microprojectile bombardment. *Aust. Plant Physiol* 23: 679 - 685.
- Stewart, CN (2001) The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Rep* 20: 376 – 382
- Wenqui, C, Gonsalves C, Tennant TP, Fermin G, Souza M Jr, Sarindu N, Jan FJ, Zhu HY, Gonsalves D (1999) A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 35: 61 - 69.