

Sensibilidad de plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. 'CIAP 7247F' al herbicida Glufosinato de amonio en casa de cultivo

Idalmis Bermúdez-Caraballoso*, Raúl Collado, Lourdes R. García, Novisel Veitía, Amanda Martirena, Damaris Torres, Carlos Romero *Autora para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas (UCLV). Carretera a Camajuní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: idalmis@ibp.co.cu

RESUMEN

El mejoramiento genético en *Phaseolus* mediante transformación genética requiere de un sistema de selección eficiente. La presente investigación tuvo como objetivo determinar la concentración mínima letal de Glufosinato de amonio (Finale®) en plantas de frijol cv. 'CIAP 7247F' en casa de cultivo. Se utilizaron diferentes concentraciones de este herbicida aplicado al follaje de las plantas (20, 30 y 40 mg l⁻¹) y el control. Se determinó que la concentración mínima letal en plantas en casa de cultivo fue de 30 mg l⁻¹. Los resultados demostraron que es posible utilizar este herbicida como agente selectivo en futuros trabajos para comprobar la resistencia de plantas transformadas de frijol cv. 'CIAP 7247F' seleccionadas *in vitro* que porten el gen *bar*.

Palabras clave: agente selectivo, cultivo de tejidos, herbicida, transformación genética

Sensitivity of *Phaseolus vulgaris* cv. 'CIAP 7247F' plants to Glufosinate ammonium herbicide in greenhouse

ABSTRACT

Genetic breeding in *Phaseolus* by genetic transformation requires an efficient selection system. The present investigation was aimed to determine the minimum lethal concentration of glufosinate-ammonium (Finale®) in beans plants cv. 'CIAP 7247F' grown in greenhouse. Different concentrations of the herbicide were applied to the foliage of plants in acclimatization phase (20, 30 y 40 mg l⁻¹) and the control. Results showed that the minimum lethal concentration in plants in acclimatization phase was 30 mg l⁻¹. Results also demonstrated that is possible the use of the herbicide as a selective agent of beans transformants cv. 'CIAP 7247F' carrying the *bar* gene.

Keywords: genetic transformation, herbicide, selective agent, tissue culture

Los frijoles (*Phaseolus vulgaris* L.) son considerados como el alimento perfecto por presentar un alto contenido de nutrientes entre ellos: proteínas, vitaminas, fibra dietética, micronutrientes y además poseen un bajo índice de glucosa (Nzungize *et al.*, 2011). Para lograr eventos de transformación genética estables es muy importante lograr un proceso de selección efectivo. Cuando el tejido contiene el meristemo, el gen *bar* y el *npt II* pueden ser los marcadores de selección más eficientes (Mukeshimana *et al.*, 2013).

Los métodos de mejoramiento genético convencionales han contribuido significativamente a la mejora de caracteres importantes en *P. vulgaris*. Sin embargo, estas técnicas de mejoramiento tradicional están limitados por el bajo potencial de recombinación, las barreras sexuales y el aborto de embriones en híbridos interespecíficos (Aragao *et al.*, 2002).

La transformación genética constituye una alternativa que permite a los mejoradores introducir nuevos tratamientos para incrementar la tolerancia a estreses provocados por factores abióticos y bióticos (Tollefson 2011). La principal deficiencia de los protocolos de transformación genética descritos para especies leguminosas radica en la producción de transformantes quiméricos y el escape de material no transgénico que sobrevive a la selección (Angenon y Thu, 2011). Este fenómeno puede manejarse con un adecuado sistema de regeneración de plantas, y un sistema de selección estricto basado, en la determinación correcta de la concentración y tipo de agente selectivo en las diferentes etapas de desarrollo vegetativo de la planta.

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la concentración mínima letal de Glufosinato de amonio (Finale®) en plantas de

frijol cv. 'CIAP 7247F' en casa de cultivo para emplearlo como agente selectivo de plantas transformadas genéticamente. Se utilizaron plantas obtenidas a partir de semillas de frijol cv. 'CIAP 7247F' germinadas en macetas de 500 ml de capacidad. El sustrato que se utilizó estaba compuesto por una mezcla de materia orgánica y zeolita (80:20). El riego tuvo una frecuencia de cinco veces al día por 2 minutos cada uno.

Los experimentos se realizaron en la casa de cultivo, durante los meses de enero a marzo, con temperatura media durante el día de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y la humedad relativa del $84 \pm 5\%$. El flujo de los fotones fotosintéticos osciló entre 280 y $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (medido con un luxómetro EXTECH Light meter 401025).

La solución inicial del agente selectivo se preparó a 15 mg ml^{-1} . Se estudiaron diferentes concentraciones del herbicida Glufosinato de Amonio (20, 30 y 40 mg l^{-1}) y un control sin tratar. En cada tratamiento se emplearon 10 plantas con al menos dos hojas trifoliadas completamente expandidas. La solución de Glufosinato de Amonio se

aplicó por ambos lados de la hoja con la ayuda de un pincel. A los 10 días se evaluó la aparición de afectaciones en las plantas ocasionadas por el agente selectivo, se describieron y se confeccionó una escala de grados de afectación.

El análisis estadístico del grado de afectación provocado por el agente selectivo se realizó con la ayuda del Paquete estadístico *Statistic Packaged for Social Science (SPSS)* versión 18.0 sobre Windows. Se utilizó la prueba de *Kruskall Wallis* previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

En todas las concentraciones de Glufosinato de amonio aplicadas se observaron síntomas de necrosis de los tejidos en las plantas de *P. vulgaris* cv. 'CIAP 7247F'. Tomando en consideración los resultados de las afectaciones provocadas por el agente selectivo estudiado, se elaboró una escala descriptiva de cinco grados de afectación donde el grado 1 se refiere a las plantas sin afectaciones y el cinco a las plantas con necrosis total (Tabla 1).

Tabla 1. Escala de grados de afectación del herbicida Glufosinato de amonio en plantas de frijol cv. 'CIAP 7247F' en casa de cultivo.

Grados de afectación	Descripción	
1	Planta sin afectación	
2	25% de hojas con necrosis	
3	50% de hojas con necrosis	
4	75% de hojas con necrosis	
5	Plantas con necrosis total	

La frecuencia de aparición de plantas con síntomas, según los grados de afectación de la escala propuesta, variaron de acuerdo con la concentración del herbicida empleada (Figura 1).

Se observó que las concentraciones de 30 mg l⁻¹ y 40 mg l⁻¹ del agente selectivo produjeron los mayores valores en el grado de afectación, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla 2).

De acuerdo con los resultados alcanzados se seleccionó la concentración de 30 mg l⁻¹ de Glufosinato de amonio como la mínima letal, ya que a los diez días de inoculadas las plantas, se observó predominio del grado de afectación cinco, que corresponde a la necrosis total de la planta.

En otra investigación realizada Kwapata *et al.* (2012) seleccionaron líneas transgénicas de frijol de los cultivares: 'Condor', 'Matterhorn', 'Montcalm'

y 'Sedoma', al aplicar una concentración de Glufosinato de amonio de 150 mg l⁻¹ en plantas regeneradas *in vitro* durante la aclimatización. Estos autores observaron respuestas diferentes en dependencia del cultivar, 'Matterhorn' mostró mayor grado de resistencia al herbicida. Este resultado confirma la condición genotipo dependiente de este cultivo, lo que indica que estos estudios son necesarios para cada genotipo, en este caso el cv. 'CIAP7247F' puede seleccionarse a una concentración mínima letal de 30 mg l⁻¹ del herbicida.

El uso de kanamicina o Glufosinato de amonio para seleccionar plantas transgénicas estable de frijol se describió por Espinosa-Huerta *et al.* (2013). Este herbicida ha sido efectivo para la selección de plantas transgénicas en frijol y otras especies leguminosas y la eficiencia de transformación ha variado atendiendo al cultivar o especie estudiada, entre 3.9 y 8.4% y en *Vigna mungo* 7.6% (Muruganathan *et al.*, 2007).

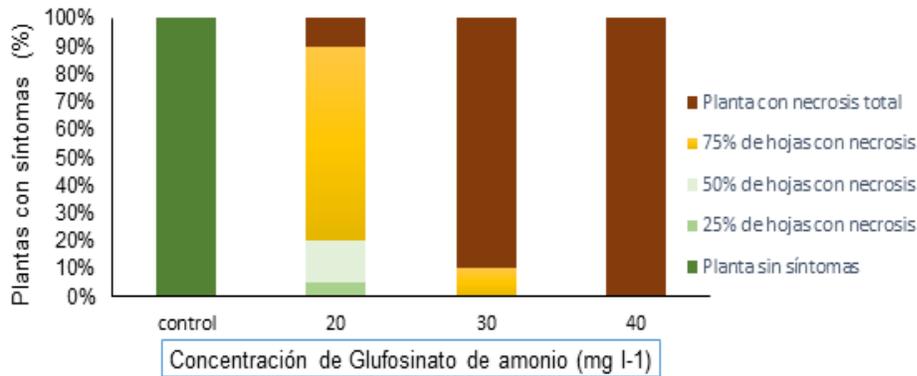


Figura 1. Efecto de la concentración de Glufosinato de amonio sobre plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. 'CIAP7247F', en casa de cultivo.

Tabla 2. Efecto de las diferentes concentraciones del herbicida Glufosinato de amonio sobre plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. 'CIAP 7247F' en casa de cultivo.

Concentración de Glufosinato de Amonio (mg l ⁻¹)	Grados de afectación	
	Medias	Rangos medios
20	4.00	6.60 b
30	4.92	13.00 a
40	5.00	14.00 a
Control	1.00	8.00 c

Rangos medios con letras diferentes en una misma columna difieren significativamente para $p < 0.05$ según la prueba de Kruskal Wallis.

CONCLUSIONES

Los resultados demostraron que es posible utilizar el herbicida Glufosinato de amonio una concentración de 30 mg l⁻¹ para comprobar la resistencia de plantas transformadas y seleccionadas *in vitro* de frijol cv. 'CIAP 7247F'.

REFERENCIAS

- Angenon G, Thu TT (2011) Chapter 12 Genetic Transformation. En: A Pratap, J Kumar (Eds.). Biology and Breeding of Food Legumes, pp: 178-192. CAB International. London
- Aragao, FJL, Vianna GR, Albino MMC, Rech EL (2002) Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. *Crop Science* 42: 1298–1302
- Espinosa-Huerta, E, Quintero-Jiménez A, Cabrera-Becerra V, Mora-Avilés MA (2013) Stable and efficient *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Phaseolus vulgaris*. *Agrociencia* 47: 319-333
- Kwapata, K, Nguyen T, Sticklen M (2012) Genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with the *GUS* Color Marker, the *bar* herbicide resistance, and the Barley (*Hordeum vulgare*) *HVA1* drought Tolerance Genes. *International Journal of Agronomy* 2012: 1-8
- Nzungize, J, Gepts P, Buruchara R, Male A, TRagama P, Busogoro JP, Bando JP (2011) Introgression of *Phythium* root resistance gene into Rwandan susceptible common bean cultivars. *African Journal of Plant Science* 5(3): 193-200
- Mukeshimana G, Ma Y, Walworth AE, Song G, Kelly JD (2013) Factors influencing regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Biotechnol Rep* 7: 59-70
- Murugananthan M, Amutha S, Selvaraj N, Vengadesa G, Ganapathi A (2007) Efficient *Agrobacterium* mediated transformation of *Vigna mungo* using immature cotyledonary-node explant and phosphinothicin as the selection agent. *In vitro Cell Dev. Biol-Planta* 43:550-557
- Tollefson, J (2011) Brazil cooks up transgenic bean. *Nature* 478:168

Recibido: 24-10-2013
Aceptado: 10-12-2013