

Avances en la transgénesis de plátano (*Musa* AAB cv. Hartón): Transformación para resistencia al herbicida BASTA

Progress on plantain (*Musa* AAB cv. Hartón) ransgenesis: Transformation for resistance to herbicide BASTA

E.C. de García¹, C. Villarroel¹ y M. Oropeza¹

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Caracas. Instituto de Biología Experimental. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela (UCV).

Resumen

En Venezuela, el plátano cv. Hartón, es uno de los rubros más importantes socio económicamente. Para obtener una mayor rentabilidad del cultivo, es necesario entre otros aspectos, desarrollar un eficiente método de control de malezas. En la presente investigación se establecen los parámetros para obtener plantas resistentes al herbicida BASTA. Para ello, se estableció el siguiente protocolo: aislamiento de meristemas e incubación en medio Murashige y Skoog por 3 días en oscuridad, pretratamiento con tres lavados de 1 hora en buffer a pH 7,6; incubación en buffer pH 7,6 con el plásmido pCAMBIA 3201; aplicación de una descarga de 200 V cm⁻¹ desde un capacitor de 1000 µF. Este protocolo asegura mayor eficiencia en la electroporación, menor tiempo de recuperación del tejido y mayor porcentaje de regeneración de plantas. La incorporación del plásmido se evidencia mediante el gen reportero de la b-glucuronidasa (GUS). La concentración mínima inhibitoria del herbicida BASTA fue la de 1 mg.ml⁻¹.

Palabras clave: BASTA, electroporación, meristema, plátano Hartón, transgénesis.

Recibido el 6-7-2004 ● Aceptado el 15-9-2004

¹Autor para correspondencia correo electronico: egarcia@reacciun.ve; carmery02@hotmail.com; moropeza@strix.ciens.ucv.ve

Abstract

Hartón plantain represents one of the most socio- economically important crops in Venezuela. In order to improve the crop profitability, it is necessary, among other things, to develop an efficient weed control method. In this research suitable parameters to obtain BASTA (herbicide) resistant plants are established. Meristems were isolated and incubated in the Murashige and Skoog culture medium for 3 days under dark conditions, the tissue was pretreated with three hourly washes using buffer at pH 7, 6, and then it was incubated along with plasmid pCAMBIA 3201 on the same buffer. Electroporation was performed applying 200 V/cm/cm^{-1} discharged from a $1000\mu\text{F}$ capacitor. This protocol ensures high electroporation efficiency, less tissue recuperation time and greater percent of regenerated plants. Plasmid incorporation was traced using GUS as reporter gene. The minimal inhibitory concentration of BASTA was 1 mg.ml^{-1} .

Key words: BASTA, electroporation, meristem, Hartón plantain, transgenic.

Introducción

El cultivo de las musáceas, representa uno de los rubros más importantes para nuestro país, siendo Venezuela, uno de los principales exportadores de plátano para Europa, USA y las islas del Caribe. Es difícil estimar las áreas sembradas de plátano en el país pero se calcula que la distribución de las siembras más importantes con cultivos semitecnificados, se encuentran al Sur del Lago de Maracaibo (40.000 ha), Barinas (5.000 ha), y Oriente (500 ha) (1). Sin embargo, existen problemas que limitan su producción eficiente, por lo que es necesario realizar prácticas de labores culturales y fitosanitarias.

Otro aspecto que se debe tomar en cuenta es el control mecánico ó químico, de malezas. El control químico permite un mejor y más rápido desarrollo del cultivo, menor incidencia de enfermedades (ataque de hon-

gos y bacterias) y la reducción de los ataques de plagas, nematodos y virus.

Uno de los productos utilizados en el control de malezas a parte de los tradicionales Roundoup y el Gramoxone, es el BASTA o Finale, el cual es un herbicida de contacto, que tiene un amplio espectro contra malezas de hoja ancha y gramíneas, tanto anuales como perennes en post emergencia. Las malezas deben haber desarrollado suficiente follaje para permitir la absorción del producto. Dado su característica de no selectivo, BASTA es ampliamente usado a nivel mundial para el control de malezas en plantaciones de frutales y áreas comunes. Su ingrediente activo, el glufosinato de amonio, es utilizado en la mayoría de los cultivos, el plátano y el cambur son tolerantes a concentraciones entre 0,5–1% v/v de este producto.

Con el fin de evitar futuro posi-

bles riesgos de la incidencia del BASTA sobre el cultivo de plátano se desarrolla esta investigación, cuyo objeti-

vo es obtener plantas de plátano cv. Hartón resistentes a este herbicida.

Materiales y métodos

Material vegetal. El material utilizado provino de plantas de plátano cv. Hartón (AAB), obtenidas del cultivo de yemas apicales *in vitro*, en un medio de multiplicación de Banano (4). Los tejidos fueron incubados en cámaras de crecimiento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, a una intensidad lumínica de $56 \mu\text{M}/\text{m}^2/\text{seg.}$ de radiación fotosintética activa (RFA) por un período de seis semanas.

A partir de vitro plantas de Hartón de 2 meses, se aislaron meristemas de 0,2 a 0,4 cm los cuales se colocaron en una solución de cisteína ($100 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) por espacio de una hora, luego se sembraron en el medio de multiplicación de Banano (4). El material se incubó de 3 a 4 días en cámara de oscuridad y posteriormente fue electroporado.

Plásmido. Para la electroporación se utilizó el vector p CAMBIA 3201 de 11450 Kpb, producido en el Laboratorio de Biología Molecular del "Medical Council", Cambridge, Inglaterra. La construcción tiene el sitio múltiple de clonamiento pUC18, el gen de resistencia al cloranfenicol para la selección en bacterias, el gen reportero GUS y el gen de selección BAR que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio (BASTA).

Transformación por electroporación. Los meristemas obtenidos previamente fueron colocados en tu-

bos eppendorf, y lavados con $500 \mu\text{l}$ de buffer de electroporación a diferentes tiempos :2 lavados de hora y media cada uno, y 3 lavados de una hora cada uno .

El buffer de electroporación usado (ASPm), modificación del ASP (11), contiene 10 mM de HEPES (pH 7,6). Se utilizaron 26 meristemas ya pretratados y se incubaron en micro cubetas estériles de 0,4 cm, 2 meristemas con $500\mu\text{l}$ de buffer y $20 \mu\text{l}$ de plásmido, por una hora a temperatura ambiente para luego ser electroporados en un equipo de pulso exponencial (Gene Pulser® II, BIORAD) a 200V cm^{-1} y capacitancia de $1000\mu\text{F}$. Luego los meristemas se colocaron por 10 minutos a temperatura de 4°C y después de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se cultivaron en el medio MS, inicialmente descrito. Se dejaron en oscuridad de 2 días para evitar la oxidación del material, y posteriormente se transfieren a condiciones de luz en cámaras de crecimiento.

Prueba de GUS. Se realizaron ensayos histoquímicos de b-glucoronidasa de acuerdo a Jefferson *et al.* (7), los meristemas electroporados se colocaron en tubos eppendorf con 500 ml de la solución Gus y se incubaron por 24–48 horas a 37°C .

Prueba de selección (BASTA). El gen de selección BAR aislado del *Streptomyces hygroscopicus*, codi-

fica para la enzima fosfinotricin acetil transferasa, y otorga resistencia a la fosfinotricina, ingrediente activo del herbicida BASTA. Este compuesto es un análogo del ácido glutámico e inhibe la enzima glutamina sintetasa, bloqueando la síntesis de glutamina. Esto produce una acumulación de amonio que provoca la muerte de la planta. Es a través de la expresión de este gen que podemos seleccionar las plantas transgénicas.

Se tomaron 64 meristemas de plátano Hartón y se colocaron en medio MS suplementado con 30 g de azúcar, 10 ml de Vitaminas de Morel, 0,5 mg.L⁻¹ de bencil amino-purina (BAP), 60 mg de cisterna y 8 g.L⁻¹ de agar, conteniendo diferentes concentraciones del herbicida BASTA (T1: control, T2: 1 mg.L⁻¹, T3: 2 mg.L⁻¹, T4: 5 mg.L⁻¹). Se evaluó el desarrollo y necrosis de los meristemas durante 30 días, en condiciones de luz.

Resultados y discusión

En el análisis de las condiciones de electroporación se observó que con el lavado de los explantes a diferentes pH (7,6; 7,0 y 5,8) y tiempos, se controló la oxidación, obteniéndose el mejor resultado con 3 lavados, en cualquiera de los pH probados. En relación al voltaje se observó que la mayor regeneración se daba a 200 V cm⁻¹ después de experimentar con varios voltajes. Sobre la base de estas observaciones las experiencias posteriores se diseñaron a 200 V cm⁻¹.

En el cuadro 1 se observan los

resultados obtenidos en los diferentes pretratamientos con respecto al tiempo, porcentaje de regeneración, y la verificación de la presencia del gen GUS en los meristemas tratados. Los pretratamientos con tres lavados controlaron la oxidación lo que permitió una regeneración de 100%. La regeneración se consideró lenta cuando ocurrió después de los 15 días de bombardeado el tejido, e inmediata cuando ocurría entre 3 y 6 días.

Estos resultados coinciden con los de Muñiz *et al.* (8) donde el pH 7,6

Cuadro 1. Porcentajes de Regeneración de meristemas y resultados de la prueba GUS en los diferentes tratamientos.

| Tratamientos No. de Buffer ASPm +lavados pCAMBIA a diferentes pH | Tiempo de regeneración | % de regeneración | Prueba de GUS | |
|--|------------------------|-------------------|---------------|---|
| 7.6 | 2 | Lento | 50 | + |
| | 3 | Inmediato | 100 | + |
| 7 | 2 | Lento | 50 | + |
| | 3 | Inmediato | 100 | + |
| 5.8 | 2 | Lento | 50 | + |
| | 3 | inmediato | 100 | + |

es el más adecuado para obtener buenos resultados de tratamientos de electroporación para la transformación, este mismo autor reporta que la electroporación la realiza a 220 V cm^{-1} desde un capacitor de $900 \mu\text{F}$, se observan condiciones muy parecidas a las nuestras 200 V cm^{-1} y $1000 \mu\text{F}$.

Con relación al tiempo de incubación con el plásmido se realizó por un período de 1 hora a temperatura ambiente dando buenos resultados. Un tiempo prolongado de incubación de los explantes en el amortiguador, favorece la difusión del DNA al interior celular, sin necesidad de tratamiento enzimático (10). El lapso de tiempo puede variar de 30 a 60 minutos a temperatura ambiente, previo a la aplicación del pulso eléctrico (6). Así la incubación favorece que el DNA pase a través de los espacios intercelulares y/o penetre a través de las paredes celulares, permitiendo que se ubique cerca de la membrana plasmática, entrando al interior celular luego de la descarga del pulso eléctrico (3).

Al realizar las pruebas de determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) con BASTA en meristemas de plátano Hartón, se observó que a los 7 días de haber iniciado la experiencia todos los meristemas se mantenían vivos, pero sólo se observó crecimiento en los meristemas cultivados en los tratamientos T1 (control) y T2 (1 mg.L^{-1} BASTA) (figura 1). A los 14 días, los meristemas colocados en el tratamiento T2 estaban vivos. De los colocados en el tratamiento T3 (2 mg.L^{-1} BASTA) solo el 50% estaban vivos y los del tratamiento T4 (5 mg.L^{-1} BASTA) se murieron en su totalidad. Los meristemas del T1 se mantuvieron en continuo desarrollo. A los 21 días se incrementó el número de meristemas muertos en T2 y T3, con valores de 50% y 85% respectivamente. Las observaciones finalizaron a los 30 días, arrojando como resultado una necrosis del 100% en T4, 95% para T3, 80% para T2 (figura 2). En el control las plantas se desarrollaron normalmente.

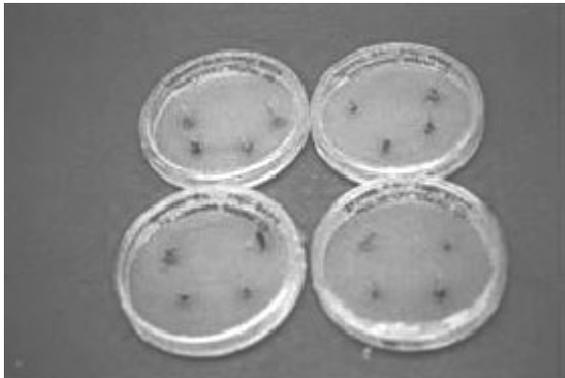


Figura. 1. Meristemas de plátano Hartón sembrados en medio MS con 1 mg.L^{-1} del herbicida BASTA a los 7 días de cultivo.

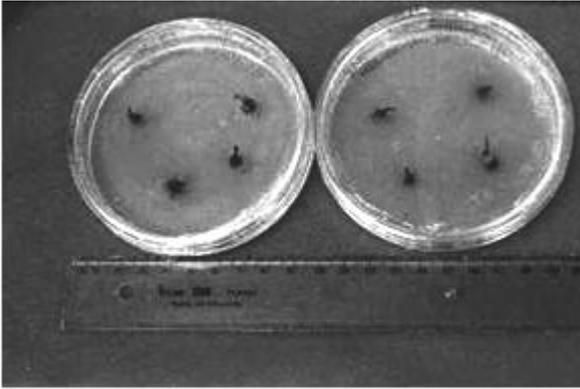


Figura. 2. Meristemas de Plátano Hartón sembrados en medio MS con 1 mg.L^{-1} de BASTA a los 30 días de cultivo.

Con base a estos resultados se seleccionó la concentración de 1 mg.L^{-1} de BASTA para los ensayos de selección. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por algunos investigadores en experimentos realizados con

otras monocotiledóneas, entre ellas suspensiones celulares de caña de azúcar de la variedad SC88 donde la CMI fue de 1 mg.L^{-1} (2), y en maíz donde la CMI fue de $1\text{-}3 \text{ mg.L}^{-1}$ (5).

Conclusiones

Estas experiencias permitieron establecer un protocolo adecuado de electroporación y selección de plantas de plátano cv. Hartón (AAB). Hasta el momento se ha demostrado la transformación de las mismas mediante el gen Reportero GUS. Estas plantas serán sometidas al proceso de

selección con BASTA y posteriormente, las que sobrevivan se someterán a análisis molecular mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa y el Análisis Southern Blot usando Digoxigenina (DIG), para el marcaje de la sonda.

Agradecimiento

Las autoras agradecen al FONACIT por el financiamiento a esta investigación a través del Proyecto de Grupo G-9 7000 700. Igualmente al personal del Laboratorio de

Biotecnología Vegetal del IBE, Facultad de Ciencias, de la Universidad Central de Venezuela, por su colaboración en el desarrollo de esta investigación.

Literatura citada

1. Aventis. 2002. Cultivos: Banano/
Plátano. http://www.aventiscs.com/ve/03_Og_cultivos_plátano.htm.
2. Chowdhury, M. y I. Vasil. 1992. Stably transformed herbicide resistant callus of sugarcane via micro projectile bombardment of cell suspension cultures and electroporation of protoplasts. *Plant Cell Rep.* 11:494-498.
3. Dekeyser, R.A., B. Claes, R.M.U. De Rycke, M.E. Habets, M.C. Van Montagu y A.B. Caplan. 1990. Transient gene expression in intact and organized rice tissues. *Plant Cell Rep.* 2: 591-602.
4. Gómez, I. y E. de García. 1994. Micropropagación de bananos (*Musa AAA*) del subgrupo Cavendish. *Phyton* 55:31-41.
5. Gordon-Kamm, W.J., T.M. Spencer y M.L. Mangano. 1990. *The Plant Cell* 2:603-618.
6. Gürel, F. y N. Gözükmizi. 2000. Optimization of gene transfer into BARley (*Hordeun vulgare L.*) mature embryos by tissue electroporation. *Plant Cell Rep.* 19:787-791.
7. Jefferson, R., T. Kavanagh y M. Bevan. 1987. GUS fusions: b glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6(13):3901-3907.
8. Muñiz, V., R. Ferreira, L. Meneses, N. Uchoa, M. Margis y E. Mansur. 2001. Transformation of brazilian elite *Indica*-type rice (*Oryza Sativa L.*) by electroporation of shoot apex Explants. *Plant Molecular Biology Rep.* 19:55-64.
10. Pesticelli, S.M. y K. Sukhapinda. 1995. Stable transformation via electroporation into maize type II callus and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 14:712-716.
11. Tada, Y., M. Sakamoto y T. Fujimura. 1990. Efficient gene introduction into rice by eletroporation and analysis transgenic plants – use of electroporation buffer lacking chloride-ions. *Theor. Appl. Genet.* 80(40):475-480.