

Empleo de los agentes selectivos Geneticina G-418 e Higromicina B para la transformación genética en *Phaseolus vulgaris* variedad CIAP 72-47

I. Bermúdez-Carabaloso^{1*}, R. Collado¹, L. R. García¹, N. Veitía¹, D. Torres¹, C. Romero¹, G. Angenon² *Autor para correspondencia.

¹Instituto 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

²Laboratory of Plant Genetics. Vrije Universiteit Brussel. Belgium

RESUMEN

Las leguminosas son una fuente de proteína muy importante en la dieta tanto humana como animal y de estas las del género *Phaseolus* son las más empleadas en la nutrición. La mayoría de los sistemas de transformación genética descritos hasta el momento requieren seleccionar las plantas que contengan el transgen introducido mediante un marcador de selección. La utilización de uno u otro, requiere que primero se determinen las concentraciones adecuadas de este y su efecto inhibitorio en el crecimiento de los explantes. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos Geneticina G-418 e Higromicina B que inhibieran el crecimiento de explantes de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 72-47. Como material vegetal se utilizaron segmentos de tallo de 5-6 mm de longitud que contenían el nudo cotiledonal y habían sido obtenidos a partir de semillas maduras. Para la selección se empleó el medio de cultivo de inducción de brotes al que se adicionaron diferentes concentraciones de Geneticina G-418 (0, 20, 30, 40, 50 y 60 mg.l⁻¹) o Higromicina-B (0, 10, 15, 20 y 25 mg.l⁻¹). Las evaluaciones se realizaron a las ocho semanas y se determinó el número de explantes con yemas múltiples regeneradas, así como el número de explantes necrosados. Se encontró que el antibiótico Geneticina G-418 inhibió totalmente el desarrollo de las yemas múltiples y el tejido se necrosó (100%) a partir de la concentración de 50 mg.l⁻¹. No se logró la regeneración de yemas en el segmento de tallo, y esto difirió estadísticamente del resto de los tratamientos, por lo que se seleccionó como la concentración mínima inhibitoria. Para el caso del antibiótico Higromicina-B, se logró la inhibición del desarrollo de las yemas múltiples a concentraciones por encima de 20 mg.l⁻¹, el explante se tornó necrótico y no fue posible la regeneración de yemas múltiples, por esta razón se seleccionó como la mínima concentración inhibitoria de este agente selectivo para ser utilizada en los experimentos de transformación genética de *Phaseolus vulgaris* variedad CIAP 72-47.

Palabras clave: frijol, transformación genética, yemas múltiples

ABSTRACT

Leguminous are a very important source of protein in the diet of human and animal. *Phaseolus* gender is the most used in the nutrition among them. Most of the systems for genetic transformation described up to the moment require selecting the plants that contain the transgen introduced by means of a selection marker. The selection of the system requires determining first their appropriate concentrations and inhibitory effect in the growth of the explants. Therefore, the objective of the present work was to determine the minimal inhibitory concentration of the antibiotics Geneticin G-418. Also the Hygromycin B that inhibited the growth of the explants of *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 72-47. Stem segments of 5-6 mm with the cotyledonal nude obtained from mature seeds were used as plant material. Culture medium for buds induction with different concentrations of Geneticin G-418 (0, 20, 30, 40, 50 and 60 mg.l⁻¹) and Hygromycin B (0, 10, 15, 20 and 25 mg.l⁻¹) was used for the selection. Evaluations were carried out after eight weeks. Explants number with multiple buds, as well as number of necrotic explants were determined. Antibiotic Geneticin G-418 inhibited development of multiple buds. Explants were totally necrosed (100%) starting from concentration of 50 mg.l⁻¹. Formation of buds in the stem segment was not achieved. This differed statistically from the rest of treatments. According to results these one was selected as the minimal inhibitory concentration. Development of multiple buds was reached at a concentration superior to 20 mg.l⁻¹ of antibiotic Hygromycin B. Explants turned necrosed and regeneration of multiple buds was not possible. That is why it was selected to be used in the experiments of genetic transformation of *Phaseolus vulgaris* variety CIAP 72-47 as minimal inhibitory concentration of this selective agent.

Keywords: beans, genetic transformations, multiple buds

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas son una fuente de proteína muy importante en la dieta tanto humana como animal y

de estas, las del género *Phaseolus* son las más empleadas en la nutrición (Singh, 1999). Según Zambre *et al.* (2005) *Phaseolus vulgaris* es la segunda legumbre más importante en el mundo.

Las especies de *Phaseolus* han sido transformadas genéticamente con resultados limitados (Christon, 1997) con la mayoría de los esfuerzos concentrados en la transformación de *Phaseolus vulgaris* (Nagl *et al.*, 1997). El sistema de transformación genética mediante el bombardeo de partículas ha sido desarrollado (Russell *et al.*, 1993; Aragao *et al.*, 1996) para obtener plantas transgénicas de *P. vulgaris*, sin embargo, las frecuencias de transformación obtenidas han sido muy bajas (Christon, 1997). La transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* en *P. vulgaris* ha sido inútil (Franklin *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1997). Hasta el presente solo ha sido desarrollado un método reproducible para la obtención de plantas transgénicas mediante *A. tumefaciens* en *Phaseolus* (Dillen *et al.*, 1997). Este procedimiento fue mejorado por De Clercq *et al.* (2002) pero solo restringido al genotipo silvestre *Phaseolus acutifolius* y más recientemente Zambre *et al.* (2005) han trabajado en la obtención de un método de transformación genética en *Phaseolus* más reproducible y eficiente para obtener plantas morfológicamente normales, fértiles y estables genéticamente en el mismo cultivar.

La gran mayoría de los sistemas de transformación genética descritos hasta el momento requieren seleccionar las plantas que contengan el transgen introducido mediante un agente de selección. Los marcadores de selección o agentes de selección son de gran utilidad en el estudio de la integración, expresión y herencia de genes foráneos en plantas.

Los genes marcadores más comúnmente usados son aquellos que confieren resistencia a antibióticos o herbicidas. De ellos los han sido usados el *neo* y *npt* que codifican para la enzima neomicina fosfotransferasa II (NPT II) y la higromicina fosfotransferasa (HPT) respectivamente y existe además el gen *bar* que codifica para la enzima fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) (D Halluin *et al.*, 1992).

La expresión de estos genes garantiza que las células transformadas crezcan en presencia del agente selectivo, mientras que las células no transformadas mueran durante el proceso de selección. Los artículos científicos que abordan la transformación en plantas revelan que tres de estos sistemas de selección fueron usados en más del 90% de los casos. Estos fueron, los genes que confieren resistencia a los antibióticos kanamicina, higromicina, geneticina y al herbicida fosfinotricina (Miki y Hugh, 2004).

Para la selección eficiente en los experimentos de transformación genética es importante determinar la mínima concentración inhibitoria del agente selectivo que logre el máximo de células no transformadas muertas ya que a bajas concentraciones pueden aparecer quimeras y por

otro lado a altas concentraciones se podría inhibir el desarrollo de las células transformadas porque la resistencia conferida sea más baja que la concentración del agente selectivo usada (Screemanan *et al.*, 2006).

La utilización de uno u otro marcador de selección en experimentos de transformación genética de *Phaseolus vulgaris* requiere que primero se determinen las concentraciones adecuadas del agente selectivo y su efecto inhibitorio en el crecimiento de los explantes utilizados en el proceso de transformación genética. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos Geneticina G-418 e Higromicina B que inhibieran el crecimiento de los explantes de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 72-47, con el fin de usarlos como agentes selectivos en el proceso de transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* en esta variedad comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se utilizaron segmentos de tallo de 5-6 mm de longitud que contenían el nudo cotiledonal de *Phaseolus vulgaris* variedad CIAP 72-47. Los mismos fueron obtenidos a partir de semillas maduras germinadas durante tres días en un medio de cultivo de germinación compuesto por las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS) 100%, tiamina 1 ml.l⁻¹, 6- Bencilaminopurina (6-BAP) 1.13 mg.l⁻¹, sacarosa 45 g.l⁻¹ y Phytagel 2.5 g.l⁻¹. Posteriormente, fueron colocadas durante cinco días en el medio de cultivo de pretratamiento en estado líquido (Sales MS 100%, Vitamina Heinz 10 ml.l⁻¹, mio-inositol 100 mg.l⁻¹, tidiazuron (TDZ) 0.2 mg.l⁻¹ y sacarosa 30 g.l⁻¹). En todos los casos el pH fue ajustado a 5.7 y los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave.

Para el proceso de selección se empleó el medio de cultivo para la inducción de brotes (Sales MS 100%, Vitamina Heinz 10 ml.l⁻¹, mio-inositol 100 mg.l⁻¹, TDZ 1 mg.l⁻¹, sacarosa 30 g.l⁻¹ y Phytagel 2.5 g.l⁻¹) al que se adicionaron diferentes concentraciones de Geneticina G-418 (0, 20, 30, 40, 50 y 60 mg.l⁻¹) o Higromicina-B (0, 10, 15, 20 y 25 mg.l⁻¹). La solución inicial de los agentes selectivos se preparó a concentraciones de 50 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 cinco placas de Petri de 9.0 cm de diámetro por cada tratamiento, con cinco segmentos de tallo por placa. Las placas fueron selladas con *Parafilm* y colocadas en la cámara de luz solar por ocho semanas. Se realizaron cambios a medio de cultivo fresco cada dos semanas.

Las evaluaciones se efectuaron a las ocho semanas de cultivo y se determinó el número de explantes con yemas múltiples, así como el número de explantes necrosados por tratamiento.

El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó con la ayuda del Paquete estadístico SPSS versión 15.0 sobre Windows. Se utilizó un análisis de varianza simple y para detectar diferencias entre los porcentajes se empleó la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

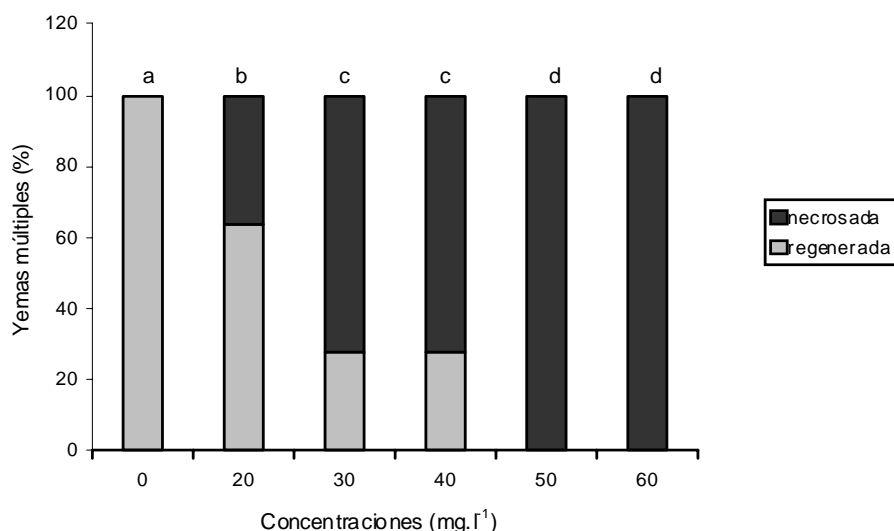
En los explantes evaluados se encontró que el antibiótico Geneticina G-418 inhibió totalmente el desarrollo de las yemas múltiples y el tejido se necrosó (100%) a partir de la concentración de 50 mg.l⁻¹ por lo cual no se logró la formación de estas, en el segmento de tallo y difirió estadísticamente del resto de los tratamientos a las ocho semanas de cultivo. Con concentraciones de 30 y 40 mg.l⁻¹ solo se alcanzó un 28% de formación de yemas múltiples en ambos casos con diferencias estadísticas significativas con respecto al control, además, se observó una marcada necrosis del explante, por encima del 70%. En la menor concentración evaluada (20 mg.l⁻¹) se logró un 64% de yemas regeneradas difiriendo también del control y del resto de los tratamientos (Figura 1).

Estos resultados coinciden con los obtenidos en otras especies donde se observa que el nivel de inhibición del crecimiento, así como la concentración del agente selectivo varía de acuerdo con el genotipo y al explante de la especie estudiada (Fernández y Menéndez, 2004).

Zambre *et al.* (2005) realizaron la selección en diferentes explantes de dos variedades de *Phaseolus acutifolius*, utilizando el mismo marcador de selección, es decir la geneticina G-418 y determinaron que la mínima concentración inhibitoria de este antibiótico para el eje embriogénico fue de 5 mg.l⁻¹ y para el caso de los callos nodulares verdes inhibió totalmente la proliferación de estos en el genotipo TB1 a 20 mg.l⁻¹ y a 15 mg.l⁻¹ para el genotipo PI440795.

La presencia del gen *NPT II* en la construcción genética utilizada en los experimentos de transformación provoca que se le confiera a los tejidos transformados la resistencia a antibióticos aminoglicósidos por fosforilación de un grupo hidroxil específico de este, esto sugirió la utilización de la geneticina G-418 a una concentración de 100 mg.l⁻¹ en medio de cultivo semisólido y de 50 mg.l⁻¹ en medio de cultivo líquido para la selección efectiva de yemas transformadas de banano (Screemanan *et al.*, 2006).

Finalmente, se seleccionó como la concentración mínima inhibitoria para este antibiótico 50 mg.l⁻¹ ya que provocó la necrosis y muerte total de los explantes. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados alcanzados por Zambre *et al.* (2005) se decidió reducir la presión de selección a partir de 30 mg.l⁻¹ de geneticina G-418 en el primer subcultivo después del cocultivo y luego se fue aumentando a 40 mg.l⁻¹ en el segundo y los dos últimos subcultivos en 50 mg.l⁻¹, ya que con la reducción de la presión de selección se evitarán los niveles altos de toxicidad para las células transformadas y la muerte excesiva de estos explantes lo que enmascararía los resultados finales del evento de transformación (Figura 2).



Barras con letras diferentes difieren significativamente ($P \leq 0.05$) por Prueba de comparación de Tukey.

Figura 1. Efecto de las diferentes concentraciones del antibiótico Geneticina G-418 en la regeneración de yemas múltiples y la necrosis de explantes de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 72-47 a las ocho semanas de cultivo.

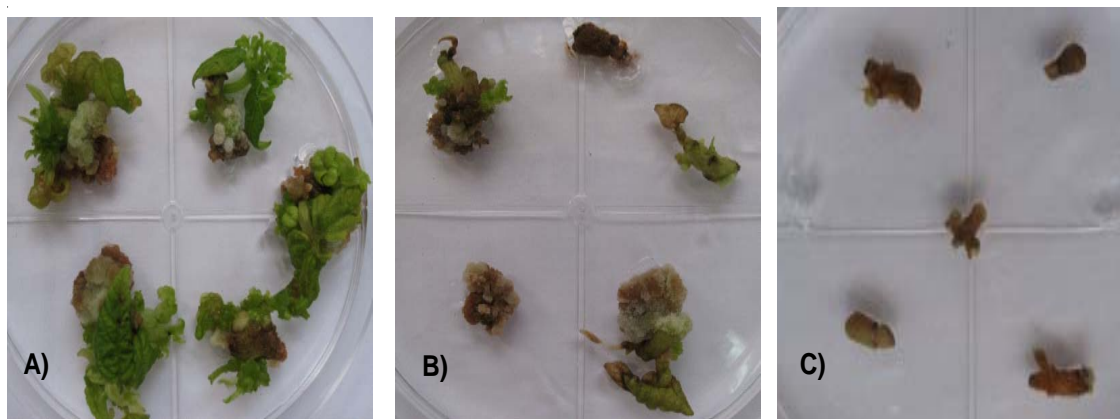


Figura 2. Explantos de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 72-47 con las diferentes concentraciones del agente selectivo Geneticina G-418. A- Medio de cultivo sin agente selectivo, B- Medio de cultivo con 30 mg.l⁻¹ de Geneticina G- 418, C- Medio de cultivo con 50 mg.l⁻¹ de Geneticina G-418.

Resultados similares obtuvieron Gurel y Gozukirmizi (2000) al utilizar este mismo antibiótico pero en cebada. Estos autores con las concentraciones letales de 80-100 mg.l⁻¹, lograron cinco plantas que fueron resistentes al antibiótico, sin embargo, en los análisis moleculares no se logró amplificar la secuencias de los genes introducidos. Por otra parte, de ocho plantas que crecieron en 40 mg.l⁻¹ de geneticina G-418, en una se logró la amplificación de los dos genes y en tres solo se detectó uno.

Tsakazaki *et al.* (2002) al realizar la selección a nivel de callos organogénicos provenientes de líneas doble haploides transformadas genéticamente de col (*Brassica oleraceae*), encontraron que reducir la presión de selección en los primeros subcultivos y al final aumentarla les permitió obtener un número de plantas transgénicas mayor que cuando utilizaron las concentraciones altas desde el inicio de la selección. Estos autores lograron gran cantidad de yemas múltiples regeneradas a partir de callos en un medio de cultivo de regeneración de yemas al que se le adicionaron 25 mg.l⁻¹ de kanamicina a los dos meses de cultivo. Sin embargo, las plantas tolerantes a Kanamicina se obtuvieron a los cuatro meses en un medio de cultivo de maduración de las yemas con 50 mg.l⁻¹ de este antibiótico.

Zambre *et al.* (2005) compararon dos esquemas en la selección de callos nodulares verdes de *Phaseolus acutifolius* frente al agente de selección geneticina G-418. En el primer esquema realizaron la selección directa al exponer los callos a la dosis letal de geneticina G-418 de 20 mg.l⁻¹ desde el primer subcultivo después del cocultivo y un segundo esquema cuando expusieron los callos a una concentración inicial del antibiótico más baja (5 mg.l⁻¹) y luego la incrementaron en los sucesivos subcultivos hasta la dosis letal. Ambos esquemas de selección

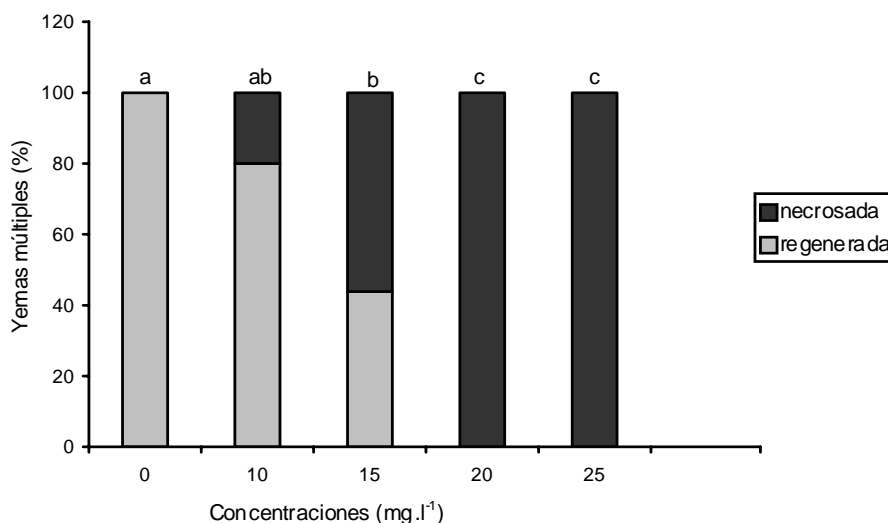
produjeron líneas transgénicas a partir de los callos transformados, sin embargo, el mayor número de líneas por callo se obtuvo usando el segundo esquema. Estos autores plantean que la reducción de la presión de selección es un factor que puede mejorar el procedimiento de transformación.

El antibiótico Higromicina-B, con la concentración de 15 mg.l⁻¹ solo logró inhibir la regeneración de las yemas múltiples alrededor del 50%, sin embargo, a concentraciones de 20 mg.l⁻¹ o más, el explante se tornó totalmente necrótico y no fue posible la regeneración, con diferencias estadísticas respecto a las concentraciones inferiores de 10 y 15 mg.l⁻¹. Por esta razón se seleccionó como la mínima concentración inhibitoria de este agente selectivo la de 20 mg.l⁻¹ (Figuras 3 y 4).

Resultados similares obtuvieron Sreeramanan *et al.* (2006) usando este antibiótico para la selección de yemas simples de banano cultivar Pisang Rastali (*Musa AAB*), donde la higromicina B a la concentración de 20 mg.l⁻¹ inhibió totalmente el crecimiento en medio de cultivo sólido, después de cuatro semanas en la selección. Así mismo, Men *et al.* (2003) encontraron que la higromicina B a concentraciones por encima de 30 mg.l⁻¹ inhibió completamente el crecimiento de las células de orquídea (*Dendrobium* spp.).

Por su parte, Hagio *et al.* (1995) en el cultivo del trigo encontraron que este antibiótico usado como agente selectivo no produjo albinismo en las plantas regeneradas. Sin embargo, Yu *et al.* (2003) al usar kanamicina encontraron un gran número de plantas albinas.

Igualmente, en el cultivo de la yuca (*Manihot sculenta*) se ha usado eficientemente este antibiótico para la selección de suspensiones celulares (Zhang *et al.*, 2000).



Barras con letras diferentes difieren significativamente ($P < 0.05$) por Prueba de comparación de Tukey.

Figura 3. Efecto de las diferentes concentraciones del antibiótico Higromicina B en la regeneración de yemas múltiples y la necrosis de los explantes de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 72-47 a las ocho semanas de cultivo.

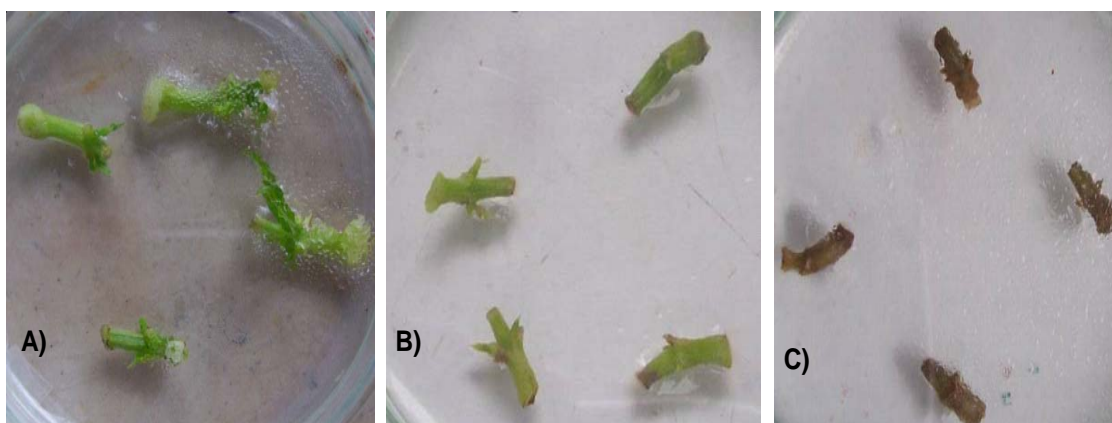


Figura 4. Explantes de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 72-47 con las diferentes concentraciones estudiadas del agente selectivo Higromicina B. A- Medio de cultivo sin agente selectivo, B- Medio de cultivo con 15 mg.l⁻¹ Higromicina B de, C- Medio de cultivo con 20 mg.l⁻¹ de Higromicina B.

CONCLUSIONES

Los resultados demostraron que ambos antibióticos son agentes selectivos que pueden ser utilizados en la transformación genética de *Phaseolus vulgaris* variedad CIAP 72-47, usando como tejido blanco los segmentos de tallo. Ambos mostraron signos rápidos de toxicidad e inhibición del crecimiento a bajas concentraciones, siendo 50 mg.l⁻¹ y 20 mg.l⁻¹ las mínimas concentraciones inhibitorias para la genética G-418 y la Higromicina B, respectivamente.

REFERENCIAS

Aragao, F.J, Barros LM, Brasileiro AC, Ribeiro SG, Smith FD, Sanford JC, Faria JC y Rech EL (1996) Inheritance of foreign

genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cotransformed via particle bombardment. Theor Appl Genet. 93: 142-150

Christou, P (1997) Biotechnology applied to grain legumes. Field Crops Res. 53: 83-97

De Clercq, J, Zambre M, Van Montagu M, Dillen W, Angenoon G (2002) An optimized *Agrobacterium*- mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray. Plant Cell Rep. 21: 333-340

D halluinK, De Block M, Denecke J, Janssens J, Leemans J, Reynaerts A, Botterman J (1992) The *bar* gene selectable and screenable marker in plant engineering. Meth Enzymol. 216: 415-426

Dillen, W, De Clercq J, Goossens A, Van Montagu M, Angenoon G (1997) *Agrobacterium* mediated transformation of *Phaseolus acutifolius* A. Gray. Theor Appl Genet 94: 151-158

- Fernández, R, Menéndez A (2004) Efecto del herbicida glufosinato de amonio en diferentes explantes de *Coffea arabica* cv. Catimor. Acta Científica Venezolana 55: 211-217
- Franklin, CI, Trieu TN, Cassidy BG, Dixon RA, Nelson RS (1993) Genetic transformation of green callus via *Agrobacterium tumefaciens* mediated DNA transfer. Plant Cell Rep. 12: 74-79
- Gurel, F, Gozukirmizi L (2000) Optimization of gene transfer into barley (*Hordeum vulgare* L.) mature embryos by tissue electroporation. Plant Cell Rep. 19: 787-791
- Hagio, T, Hirabayashi H, Machii H, Tomotsume H (1995) Production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plants using hygromycin resistance marker. Plant Cell Report 14: 329-334
- Men, S, Ming X, Wang Y, Liu R, Wei C, Li Y (2003) Genetic transformation of two species of orchid by biolistic bombardment. Plant Cell Report 21: 592-598
- Miki, B, Hugh SM (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. J. Biotech. 107: 193-232
- Nagl, W, Ignacimuthu S, Becker J (1997) Genetic engineering and regeneration of *Phaseolus* and *Vigna*. State of the art and new attempts. J Plant Physiol. 150: 625-644
- Russell, DR, Wallance KM, Bathe JH, Martinell BJ, McCabe DE (1993) Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric discharge mediated particle acceleration. Plant Cell Rep. 12: 165-169
- Singh, SP (1999) Integrated genetic improvement. En: Singh SP (Ed.) Common bean improvement in the twenty-first century. Developments in plant breeding, pp 133-165. Kluwer, Dordrecht
- Sreemanan, S, Maziah M, Abdullah MP, Rosli NM, Xavier R (2006) Potential selectable marker for genetic transformation in banana. Biotechnology 5 (2): 189-197
- Tsukazaki, H, Kuginuki Y, Aida R, Suzuki T (2002) *Agrobacterium*-mediated transformation of a doubled haploide line of Babbage. Plant Cell Report 21: 257-262
- Yu, TA, Yeh SD, Yang JS (2003) Comparison of the effects of kanamicina and geneticin on regeneration of papaya from root tissue. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 169: 174-178
- Zambre, M, Goossens A, Cardona C, Van Montagu M, Terryn N, Angenon G (2005) A reproducible genetic transformation system for cultivated *Phaseolus acutifolius* (teparay bean) and its use to assess the role of arcelins in resistance to the Mexican bean weevil. Theor Appl Genet. 110: 914-924
- Zhang, Z, Coyne DP, Mitra A (1997) Factors affecting *Agrobacterium*- mediated transformation of common bean. J Am Soc Hortic Sci. 122: 300-305
- Zhang, P, Potrykus I, Puonti-Kaerlas J (2000) Efficient production of transgenic cassava using negative and positive selection. Transgenic Res. 9: 405-415