

## Determinación de la concentración mínima letal de glufosinato de amonio en diferentes materiales vegetales de banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*)

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

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54 830 \*e-mail: kosky@ibp.co.cu

### RESUMEN

La mejora genética de bananos mediante transformación genética requiere de un sistema de selección eficiente. Uno de los marcadores de selección más utilizados es el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*, el cual codifica para la fosfotricina acetil transferasa y confiere resistencia a la fosfotricina y al glufosinato de amonio. Estos son ingredientes activos en varios herbicidas comerciales como el Basta®, Finale® y Liberty®. La presente investigación tuvo como objetivo determinar la concentración mínima letal de glufosinato de amonio (Finale®) sobre agregados celulares embriogénicos, brotes cultivados *in vitro* y plantas cultivadas en casa de cultivo de banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*). Se utilizaron diferentes concentraciones de este herbicida en el cultivo de agregados celulares embriogénicos (5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 mg l<sup>-1</sup>), brotes cultivados *in vitro* (0, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 mg l<sup>-1</sup>) y fue aplicado al follaje de plantas en casa de cultivo (0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 g l<sup>-1</sup>). Se determinó que la concentración mínima letal en agregados celulares embriogénicos fue 20.0 mg l<sup>-1</sup>, en brotes *in vitro* de 3.0 mg l<sup>-1</sup> y en plantas en casa de cultivo 30.0 g l<sup>-1</sup> de glufosinato de amonio. Los resultados demostraron que es posible utilizar el glufosinato de amonio como agente selectivo de transformantes que porten el gen *bar*.

Palabras clave: agente selectivo, Finale®, cultivo de tejidos, transformación genética

### ABSTRACT

Genetic breeding of bananas by genetic transformation requires an efficient selection system. One of the selection markers most widely used is the *bar* gene from *Streptomyces hygroscopicus*, which encodes phosphinothricin acetyltransferase and confers resistance to phosphinothricin and glufosinate-ammonium, the active ingredients in several commercial herbicides such as BASTA®, Finale® and Liberty®. The present investigation was aimed to determine the minimum lethal concentration of glufosinate-ammonium (Finale®) on embryogenic cell aggregates, *in vitro* cultured shoots and plants grown in greenhouse of banana cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*). Different concentrations of this herbicide were used in the culture embryogenic cell clusters (5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 mg l<sup>-1</sup>), *in vitro* cultured shoots (0, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 mg l<sup>-1</sup>). This was also applied to the foliage of plants in greenhouse (0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 g l<sup>-1</sup>). Results showed that the minimum lethal concentration in embryogenic cell clusters was 20.0 mg l<sup>-1</sup> glufosinate ammonium, in *in vitro* shoots 3.0 mg l<sup>-1</sup> and in plants in greenhouse 30.0 g l<sup>-1</sup>. Results also demonstrated that the use of glufosinate ammonium as a selective agent of transformants carrying the *bar* gene is possible.

Keywords: selective agent, Finale®, genetic transformation

### INTRODUCCIÓN

Los bananos y plátanos se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo y son un componente importante en la alimentación de millones de personas. La producción mundial de musáceas (banano y plátano) alcanza hasta 108 millones de toneladas métricas por año y de ellas el 68% corresponde a banano, según la Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA, 2007). Sin

embargo, son afectados por varias enfermedades fúngicas dentro de las cuales se destaca como la más nociva la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). Esta ha tenido un serio impacto en la producción de bananos especialmente sobre el cultivar 'Grande naine' (*Musa AAA*; Cavendish) que es el más comercializado a nivel mundial. Es por ello, que la búsqueda de alternativas para desarrollar nuevas variedades resistentes a esta enfermedad es una necesidad.

La ingeniería genética aparece como una vía para superar las limitaciones que presentan los métodos convencionales de mejoramiento genético en el género *Musa*, gracias a la posibilidad de introducir cambios genéticos específicos en un corto período de tiempo (Sagi *et al.*, 1994).

En la transformación genética de bananos los dos métodos más utilizados han sido el bombardeo de partículas (Becker *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2005) y la mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Ganapathi *et al.*, 2001; Khana *et al.*, 2004; Remy *et al.*, 2005).

El establecimiento de un sistema de transformación genética requiere que la construcción que se introduce tenga genes marcadores que permitan la selección de los tejidos transformados. Dentro de estos, los más utilizados son *neo* y *hpt* que confieren resistencia a los antibióticos kanamicina e higromicina, respectivamente y el gen *bar* o *pat* a los herbicidas que tienen como ingrediente activo fosfotricina (Miki y McHug, 2004).

El glufosinato de amonio es un compuesto que se usa como herbicida no selectivo, de gran aceptación en la agricultura moderna ya que solo actúa sobre las partes verdes de la planta (Bayer CropScience, 2005). Contiene intrínsecamente al isómero L- de la fosfotricina, responsable de la actividad herbicida, que inhibe la actividad de la enzima glutamina sintetasa, la cual interviene en la asimilación del nitrógeno y como resultado se alcanzan niveles tóxicos de amonio en las células de la planta. Está registrado en más de 80 países bajo diferentes nombres tales como: BASTA®, Liberty®, Finale® y Rely® (Bayer CropScience, 2005). La resistencia a este herbicida ha sido desarrollada a través de un sistema de detoxificación. La enzima fosfotricina acetil transferasa (PAT) codificada por el gen *bar* de *Streptomyces hygrosopicus* o el gen *pat* de *Streptomyces viridochromogenes* convierten el glufosinato de amonio en N-acetil glufosinato que es un compuesto no fitotóxico para la planta.

Varios autores han utilizado el glufosinato de amonio para la selección de plantas transformadas en diferentes cultivos (Yoon *et al.*, 2002; Shu *et al.*, 2005). Sin embargo, en el género *Musa* existen pocos trabajos que describan la utilización del glufosinato de

amonio para la selección de plantas transformadas (Sreeramanan *et al.*, 2006). La mayoría de las investigaciones refieren el empleo de la higromicina B (Sági *et al.*, 1995; Tripathi *et al.*, 2005; Sreeramanan *et al.*, 2006), genética o kanamicina (Khana *et al.*, 2004; Remy *et al.*, 2005).

En Cuba se han desarrollado protocolos de transformación genética en bananos y plátanos (Daniels *et al.*, 2001) en el híbrido 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) y en el cultivar 'Grande naine' (Busot *et al.*, 1999; Bermúdez-Carabaloso, 2006), pero no se ha informado el uso del herbicida comercial Finale® (15%) como agente selectivo. El empleo de este último pudiera hacer que el proceso de selección fuera menos costoso, por la fácil adquisición del producto ya que este se aplica a los cultivos para el control de malezas.

La selección de células transformadas es uno de los factores clave en el desarrollo de un método exitoso de transformación genética y en ello el tipo de explante es un factor a valorar para evitar falsos positivos. De forma general, en plátanos y bananos la selección se ha realizado en agregados celulares embriogénicos, protoplastos, yemas simples y meristemas apicales (Sági *et al.*, 1995; Tripathi *et al.*, 2005; Sreeramanan *et al.*, 2006).

Sobre la base de lo planteado anteriormente se requiere estudiar el empleo del glufosinato de amonio como marcador de selección. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la concentración mínima letal de glufosinato de amonio (Finale®) sobre agregados celulares embriogénicos, brotes cultivados *in vitro* y plantas cultivadas en casa de cultivo de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA).

Con este trabajo se presenta, por primera vez, el efecto del glufosinato de amonio (Finale®) en diferentes niveles celulares del cultivo del banano. Estos resultados posibilitarán realizar la selección del máximo de líneas transformadas genéticamente en este cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Glufosinato de amonio*

A partir del herbicida comercial Finale® en solución (15%) (Bayer CropScience, 2005) se

prepararon las concentraciones deseadas en agua o medio de cultivo, para cada ensayo.

### **Determinación de la concentración mínima letal de glufosinato de amonio**

#### *Agregados celulares embriogénicos*

Con los objetivos de describir el efecto y determinar la concentración mínima letal de glufosinato de amonio sobre agregados celulares se incluyeron en este estudio cinco concentraciones (5.0, 10.0, 15.0, 20.0 y 25.0 mg l<sup>-1</sup>) en el medio de cultivo.

Los agregados celulares de banano cultivar 'Grande naine' (*Musa* spp. AAA) fueron tomados de suspensiones celulares embriogénicas con ocho a diez meses de cultivo. Estas habían sido establecidas a partir de embriones somáticos obtenidos del cultivo *in vitro* de flores masculinas inmaduras. Para la multiplicación de las suspensiones celulares se utilizó una densidad celular de cultivo inicial de 3.0% del volumen de células sedimentadas (VCS) según la metodología propuesta por Kosky *et al.* (1999).

Se utilizaron cinco placas Petri (5.0 cm de diámetro) por cada tratamiento que contenían 10.0 ml de medio de cultivo descrito por Bieberach (1995) [Sales y vitaminas Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), 1.0 mg l<sup>-1</sup> de biotina, 100.0 mg l<sup>-1</sup> de extracto de malta, 1.0 mg l<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D), 45.0 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y 3.0 g l<sup>-1</sup> Gelrite® (SIGMA)]. El pH fue ajustado a 5.6 antes de la esterilización por autoclave. Después fue añadido el glufosinato de amonio al medio de cultivo en la cabina de flujo laminar cuando este tenía aproximadamente 45°C, sin modificar el pH del medio de cultivo.

En tubos cónicos de 15.0 ml de capacidad se ajustó el volumen de células sedimentadas al 33.0% y luego, con una micropipeta (GILSON) de 1 000 µl con la punta cortada, se homogenizó la suspensión celular. Posteriormente, sobre papel de filtro se ubicaron mallas de poliestireno de 1.0 cm<sup>2</sup>. Sobre cada una de ellas se depositaron 150 µl de la suspensión celular y se determinó la masa fresca inicial. Las mallas retienen las células y el papel de filtro absorbe el exceso de medio de cultivo. Finalmente, en las

placas Petri que contenían el medio de cultivo más el agente selectivo, fueron colocadas las mallas, se sellaron con Parafilm® y se colocaron a la oscuridad a 27 ± 2°C. Cada 15 días durante dos meses fueron realizados subcultivos a medio de cultivo fresco que contenía el agente selectivo. Se incluyó un control sobre medio de cultivo sin agente selectivo. Este experimento se repitió dos veces en el tiempo.

Las evaluaciones se realizaron en el momento de cada subcultivo y consistieron en determinar la masa fresca y el incremento en peso respecto al control. Se calculó, además, el índice medio (Im) según Labrada (1999):

$$Im = 100 (li / lc)$$

Donde: li = Valor de masa fresca en el tratamiento con el agente selectivo

lc = Valor de masa fresca en el control

Además, a las cuatro y ocho semanas de cultivo se determinó la mortalidad celular en los agregados celulares embriogénicos cultivados en las diferentes concentraciones del agente selectivo, de forma visual y con el empleo del microscopio óptico OPTON (Axioskop). Para esto último se tomó una muestra representativa de agregados celulares y fueron teñidos con 10.0 µl de diacetato de fluoresceína (0.1% v/v en acetona).

A las ocho semanas de cultivo se determinó la masa seca de los agregados celulares en cada tratamiento. Para ello, se separaron los agregados celulares de las mallas y del medio de cultivo de cada una de las placas, con una espátula metálica y se vertieron en papel de filtro (Whatman de 125mm Ø). Luego se desecaron en estufa a 60°C hasta mantener un peso constante.

Los datos de masa fresca y masa seca se analizaron estadísticamente mediante la prueba de Duncan, previa comprobación de los supuestos de normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas. Se empleó el paquete estadístico SPSS versión 15.0 sobre Windows

#### *Brotos in vitro*

Se emplearon brotes *in vitro* de banano cultivar 'Grande naine' provenientes subcultivo de multiplicación por organogénesis.

Estos brotes tenían una altura de 4.0 cm y cuatro hojas completamente abiertas. Se procedió a decapitar los brotes entre 2.0 y 5.0 mm por encima del microcormo (Orellana 1994). A los frascos de vidrio utilizados (250 ml de capacidad), se le adicionaron 30.0 ml de medio de cultivo de multiplicación descrito por Orellana (1994). Este estaba formado por sales MS, 4.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (6-BAP), 0.65 mg l<sup>-1</sup> de ácido indol acético (AIA), 30.0 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa, 1.0 mg l<sup>-1</sup> de tiamina y se le adicionó glufosinato de amonio a las concentraciones 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 y 4.0 mg l<sup>-1</sup>. Se incluyó un control sin agente selectivo. El pH fue ajustado a 5.6 previo a la esterilización por autoclave.

En el medio de cultivo se colocaron cuatro brotes por frasco de vidrio utilizado y se hicieron cinco repeticiones por cada concentración de glufosinato de amonio.

Los frascos con los brotes fueron colocados en cámaras de crecimiento con luz solar a 25 ± 2°C y una densidad de flujo de fotones fotosintéticas (FFF) de aproximadamente 50 – 62.5 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

A los 30 días de cultivo se midió la altura de las plantas (cm) y la longitud de las raíces (cm). Además se cuantificó el número de hojas y raíces por planta.

A partir de la descripción de los daños ocasionados por el agente selectivo se confeccionó una escala cualitativa y con el empleo de esta se compararon los diferentes tratamientos.

Los datos de crecimiento de las plantas así como los grados de afectación presentados por las plantas fueron procesados estadísticamente por la prueba de Kruskal Wallis previa comprobación de los supuestos de normalidad de los datos y heterogeneidad de varianza.

#### *Plantas en casa de cultivo*

Como materia vegetal se utilizaron plantas de banano cultivar 'Grande naine' crecidas en bolsas de polietileno (25.0 x 12.5 cm con capacidad de 3 785.44 cm<sup>3</sup>), las cuales provenían de la fase de aclimatización con 60 días, altura promedio de 15.0 cm, diámetro del pseudotallo de 1.8 cm y al menos seis hojas

activas. Estas plantas previamente habían sido plantadas en bandejas de polietileno (70 alveolos) con sustrato compuesto por una mezcla de 50% de casting, 30% de compost y 20% de zeolita, en casa de cultivo donde permanecieron durante 45 días.

El cultivo se realizó a 32-34°C durante el día y 22-24°C durante la noche. El riego se realizó manual una vez al día hasta lograr la humedad del suelo.

El glufosinato de amonio se aplicó con la ayuda de un pincel a todas las hojas de las plantas por ambos lados (abaxial y adaxial), a las siguientes concentraciones (5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 g l<sup>-1</sup>). Se utilizaron ocho plantas por tratamiento. La evaluación cualitativa del material vegetal basada en la descripción de los daños provocados por el glufosinato de amonio, se realizó a los 30 y 45 días. A partir de las observaciones realizadas se elaboró una escala cualitativa de evaluación.

Los grados de afectación mostrados por las plantas en cada una de las concentraciones de glufosinato de amonio estudiadas, fueron analizados mediante la prueba de Kruskal Wallis previa comprobación de los supuestos de normalidad de los datos y heterogeneidad de varianza.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Determinación de la concentración mínima de glufosinato de amonio**

#### *Agregados celulares embriogénicos*

A través de las semanas de cultivo el crecimiento de los agregados celulares embriogénicos fue afectado por las concentraciones de glufosinato de amonio empleadas. Los mayores valores en el índice medio de crecimiento se alcanzaron en el tratamiento control y con las concentraciones de 5.0 y 10.0 mg l<sup>-1</sup> de glufosinato de amonio, sin diferencias significativas entre ellos. Mientras, con las concentraciones de 15.0, 20.0 y 25.0 mg l<sup>-1</sup> del agente selectivo se produjeron los menores valores en el índice medio de crecimiento, los cuales difirieron significativamente con el control y las concentraciones anteriormente mencionadas. Sin embargo, estas altas concentraciones no mostraron diferencias significativas entre ellas (Figura 1 A y B).

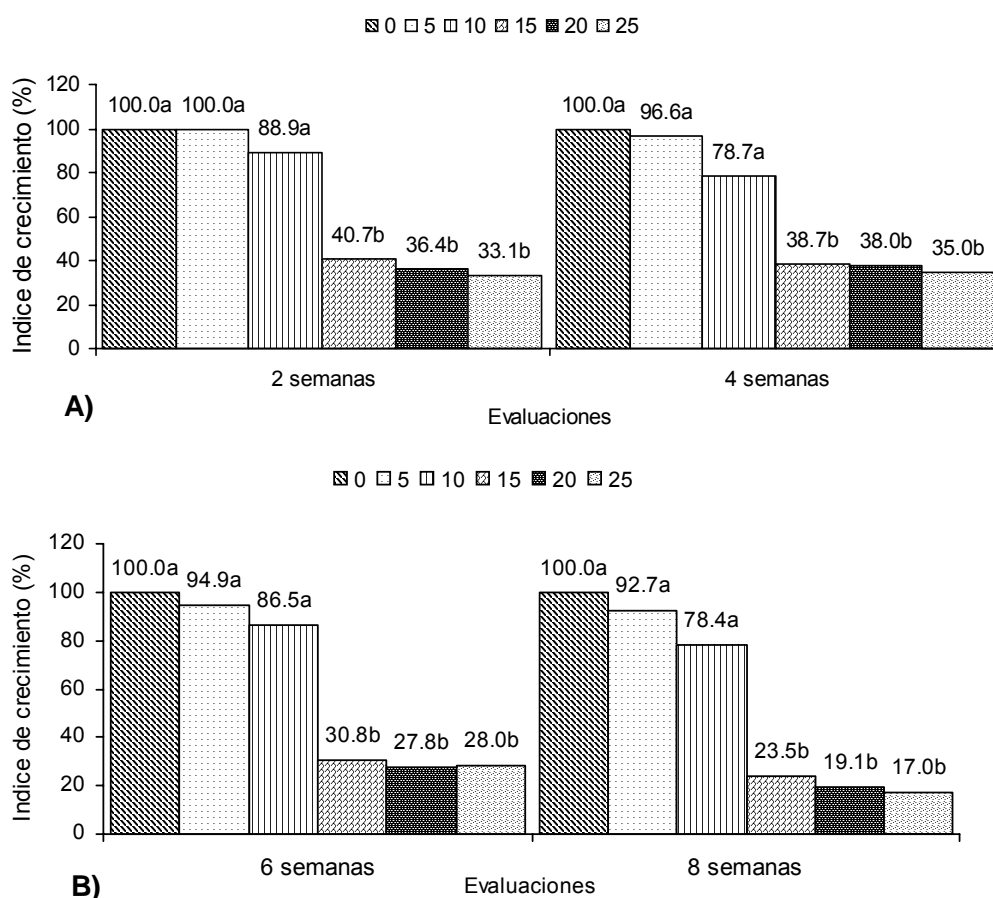


Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones de glufosinato de amonio sobre el crecimiento en agregados celulares embriogénicos del cultivar de banano ‘Grande naine’ (*Musa* spp. AAA). A) dos y cuatro semanas de cultivo. B) seis y ocho semanas de cultivo.

La limitación en el crecimiento de los agregados celulares embriogénicos provocadas por las diferentes concentraciones de glufosinato de amonio se hizo más notable a medida que aumentaron las semanas de cultivo (Figura 1 A y B). Así a las seis y ocho semanas de cultivo se registraron los menores valores en el índice medio de crecimiento en los agregados celulares embriogénicos ya que con las concentraciones de 15.0, 20.0 y 25.0 mg l<sup>-1</sup> de glufosinato de amonio se produjo inhibió el crecimiento entre 76.4 y 81.2%. Estos resultados indicaron que la selección a este nivel celular debe realizarse a las ocho semanas de cultivo ya que en este tiempo se produjo mayor inhibición del crecimiento celular con las concentraciones más altas de glufosinato de amonio. De forma general, a las ocho semanas de cultivo todas las concentraciones de glufosinato de amonio

como produjeron necrosis del tejido celular como principal afectación (Figura 2).

Por otro lado, al analizar los valores de masa seca de los agregados celulares embriogénicos a las ocho semanas de cultivo se encontró, que estos disminuyeron en la medida que se incrementaron las concentraciones del agente selectivo. Los valores más bajos se registraron con 15.0, 20.0 y 25.0 mg l<sup>-1</sup> las cuales mostraron una reducción de la masa seca entre 2.1 y 2.5 veces respecto a los valores alcanzados por el control. Estas tres concentraciones del agente selectivo difirieron significativamente con el control y con 5.0 y 10.0 mg l<sup>-1</sup>, sin embargo no difirieron entre ellas (Tabla 1). Estos resultados se corresponden con los obtenidos en el índice medio de crecimiento descritos anteriormente donde los menores valores coincidieron con las concentraciones de 15.0, 20.0 y 25.0 mg l<sup>-1</sup> de glufosinato de amonio.

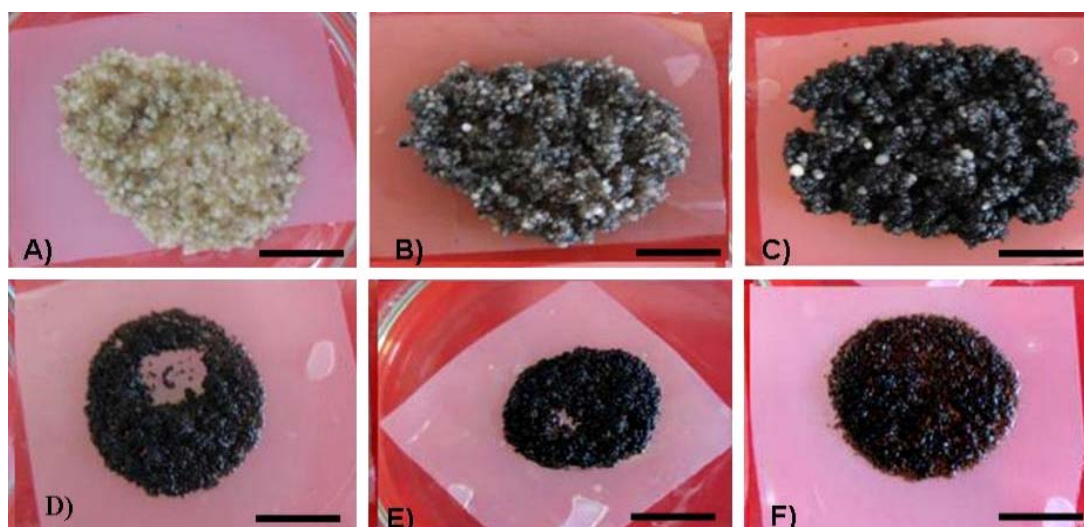


Figura 2. Afectaciones provocadas en agregados celulares embriogénicos de banano cv. "Grande naine" (*Musa AAA*) a las ocho semanas de cultivo por diferentes concentraciones de glufosinato de amonio. A) control (sin glufosinato de amonio), B) 5.0 mg l<sup>-1</sup>, C) 10.0 mg l<sup>-1</sup>, D) 15.0 mg l<sup>-1</sup>, E) 20.0 mg l<sup>-1</sup> y F) 25.0 mg l<sup>-1</sup>. (Bar = 1.0 cm).

Tabla 1. Efecto de las distintas concentraciones de glufosinato de amonio sobre la masa seca (g) en agregados celulares embriogénicos del cultivar de banano 'Grande naine' a las ocho semanas de cultivo.

Glufosinato de amonio (mg l <sup>-1</sup> )	Masa seca (g)
0.0	0.036 b
5.0	0.034 b
10.0	0.033 b
15.0	0.017 a
20.0	0.015 a
25.0	0.014 a
E. estándar	±0.00203

Medias con letras distintas en una misma columna difieren según la prueba de Duncan para  $p \leq 0.05$ .

Igual resultado se obtuvo en el análisis de la viabilidad de los agregados embriogénicos donde a las ocho semanas de cultivo en las concentraciones más altas del herbicida (15.0, 20.0 y 25.0 mg l<sup>-1</sup>) se observó un 100% de mortalidad.

Estos resultados coinciden con lo informado por Sreeramanan *et al.* (2006), quienes emplearon en el cultivar de banano 'Pisang Rastali' (*Musa AAB*), similares concentraciones de glufosinato de amonio (0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 mg l<sup>-1</sup>) y utilizaron yemas como explante vegetal para la transformación genética en este cultivo. Estos autores seleccionaron como mejor concentración

mínima inhibitoria 15.0, 20.0 y 25.0 mg l<sup>-1</sup> sin diferencias significativas entre ellas. En este trabajo los autores ensayaron además concentraciones superiores de glufosinato de amonio (50.0, 100.0, 150.0, 200.0, 250.0 y 300.0 mg l<sup>-1</sup>) y en todos estos casos obtuvieron una mortalidad total de las yemas *in vitro*. Además, estudiaron el efecto de otros cuatro posibles agentes de selección (Geneticina, Kanamicina, Higromicina, Paromomicin) y concluyeron que el glufosinato de amonio a partir del herbicida BASTA® e higromicina mostraron ser los mejores agentes selectivos para banano.

Distintos autores informan también el uso del herbicida glufosinato de amonio como agente

selectivo para la transformación genética de bananos y plátanos, pero utilizando su compuesto activo (fosfotricina). Busot *et al.* (1999) señalaron como la mejor concentración inhibitoria para agregados embriogénicos del cultivar de banano 'Grande naine' 6.0 mg l<sup>-1</sup> de fosfotricina. Iguales resultados obtuvieron al utilizar el mismo material vegetal y cultivar, Bermúdez-Carabaloso (2006) con 6.0 mg l<sup>-1</sup> de fosfotricina, por ser ésta la mínima concentración que produjo mortalidad en el 100% de los agregados celulares.

Similares resultados obtuvo Daniels (2003) al emplear suspensiones celulares embriogénicas de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*). También de García *et al.* (2004) utilizaron fosfotricina para la selección de meristemas del cultivar de plátano vianda Hartón (*Musa* spp. AAB) a la concentración de 5.0 mg l<sup>-1</sup>. El uso de menores concentraciones para la selección se basa en que todos los autores emplearon como agente selectivo la fosfotricina reactivo, en estado puro sin los aditivos que conforman la formulación de un herbicida comercial.

En tejidos con metabolismo activo el glufosinato de amonio puede ser dañino, ya que las células transformadas que puedan dar lugar a un tejido quimérico no tienen la fuerza o el poder para continuar desarrollándose, debido a la acumulación de amonio en las células no transformadas (Sreeramanan *et al.*, 2006).

La selección de células transformadas es el factor clave en el desarrollo de un método exitoso de transformación genética.

Para lograr una efectiva selección en un experimento de transformación es importante determinar la mínima concentración del agente requerido para eliminar el máximo de células no transformadas porque una muy baja concentración pudiera seguir a cambios que lleven a la obtención de quimeras o falsos positivos. Sin embargo una concentración inhibitoria muy alta podría inhibir las células transformadas, porque la resistencia conferida a la célula transformada es mucho más baja que la concentración del agente selectivo usada (Parveez *et al.*, 1996).

Además, el uso de una concentración mínima del agente selectivo puede hacer al sistema de

transformación más económico si se tiene en cuenta que este representa casi la mitad del costo de la transformación (Parveez *et al.*, 1996).

Se ha informado que la concentración de fosfotricina para el proceso de selección puede variar entre 1.0 y 100.0 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 BASTA® con concentraciones de 2.0 y 4.0 mg l<sup>-1</sup>, respectivamente.

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 ello los sistemas de selección son necesariamente para identificar las células transformadas. La selección usualmente involucra el crecimiento de posibles transformantes en presencia de un compuesto químico que inhibirá el crecimiento de las células no transformadas. El más ampliamente usado como gen marcador de selección en plantas es la neomicin fosfotransferasa II (*npt II*) (Beck *et al.*, 1982; Bevan *et al.*, 1983; Herrera *et al.*, 1983) el cual confiere resistencia a antibióticos como kanamicina, neomicina, G 418 y a la higromicina (Waldron *et al.*, 1985).

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 ya que podrían inactivar las dosis orales de estos antibióticos en los animales y el hombre. 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). Estos hechos aun no han podido ser probados, pero sí tienen una gran influencia en los organismos regulatorios y en la percepción y aceptación de los organismos transgénicos por la opinión pública (Darbani *et al.*, 2007). En el caso de los marcadores de selección que confieren resistencia a herbicidas, se ha estudiado la transferencia de

estos genes por polinización cruzada a especies relacionadas (Stewart *et al.*, 2003; Hails y Morley, 2005; Andow y Zwahlen, 2006; Zapiola *et al.*, 2007), en el caso de los bananos debido a su esterilidad este riesgo es poco probable.

#### Brotos *in vitro*

Como resultado se encontró que todas las concentraciones de glufosinato de amonio afectaron el crecimiento en los brotes *in vitro* del cv. 'Grande naine'. Estas provocaron clorosis y necrosis así como limitaron el crecimiento de las raíces. Tomando en cuenta los resultados de la evaluación visual realizada se elaboró una escala descriptiva de grados para la evaluación del efecto de las diferentes concentraciones de glufosinato de amonio sobre brotes *in vitro* del cultivar 'Grande naine' (Tabla 2).

Al analizar el efecto del glufosinato de amonio sobre los brotes *in vitro* se encontró que en la medida que aumentaron las concentraciones del agente selectivo se incrementaron los valores en el grado de afectación. Las

concentraciones de 3.0 y 4.0 mg l<sup>-1</sup> de glufosinato de amonio produjeron los mayores valores, sin diferencias significativas entre ellas pero sí con el resto de los tratamientos (Tabla 3).

Es importante destacar que en los brotes *in vitro*, las concentraciones de glufosinato de amonio estudiadas afectaron el crecimiento tanto en la parte aérea de la planta como de las raíces. A medida que se incrementó la concentración del agente selectivo se produjo una disminución en la altura, número de hojas, número y largo de las raíces.

Los menores valores mostrados por los brotes *in vitro* en las cuatro variables mencionadas anteriormente se observaron en las concentraciones de 3.0 y 4.0 mg l<sup>-1</sup> de glufosinato de amonio, las cuales difirieron significativamente del control y de las demás concentraciones estudiadas (Tabla 4). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre estas dos concentraciones en las cuatro variables analizadas en brotes *in vitro* del cv. 'Grande naine'.

Tabla 2. Escala descriptiva propuesta para determinar el efecto del glufosinato de amonio sobre brotes *in vitro* de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* spp. AAA) a los 30 días de cultivo.





Grado	Descripción	
1	Planta similar al control	
2	Planta con clorosis en las hojas y presencia de raíces.	
3	Planta con clorosis en las hojas, necrosis en la hoja cigarro e inhibición del crecimiento de las raíces	
4	Planta con necrosis total	



Tabla 3. Efecto del glufosinato de amonio sobre brotes *in vitro* de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* spp. AAA) a los 30 días de cultivo de acuerdo con la escala de evaluación cualitativa propuesta (Tabla 2).

Glufosinato de amonio (mg l <sup>-1</sup> )	Grado	Rangos Medios
Control	1.00	8.50 d
1.0	1.51	32.72 c
1.5	2.18	38.91 b
2.0	2.75	50.38 b
3.0	4.00	72.00 a
4.0	3.95	72.12 a

Rangos medios con letras desiguales en la misma columna difieren según la prueba de Kruskal Wallis para  $p \leq 0.05$ .

Tabla 4. Efecto de glufosinato de amonio sobre el crecimiento de brotes *in vitro* de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) a los 30 días de cultivo.

Glufosinato de amonio (mg l <sup>-1</sup> )	Altura (cm)		Longitud de raíces (cm)		Número de raíces (cm)		Número de hojas (u)	
	Medi	Rangos	Media	Rangos	Media	Rangos	Media	Rangos
	a	medios		medios		medios		medios
1.0	2.14	49.06 b	1.44	46.38 b	2.93	52.09 b	3.50	58.13 a
1.5	1.94	44.13 b	1.36	45.41 b	2.50	42.50 b	2.68	41.69 b
2.0	1.48	25.84 c	0.71	29.72 c	1.87	31.81 c	1.93	28.91 c
3.0	1.09	11.16 d	0.00	8.50 d	0.00	8.50 d	0.00	8.50 d
4.0	1.08	11.08 d	0.00	8.50 d	0.00	8.50 d	0.00	8.50 d
Control	3.78	72.31 a	5.26	72.50 a	3.81	67.59 a	3.87	65.28 a

Medias de rango con letras distintas en la misma columna difieren según la prueba de Kruskal Wallis para  $p < 0.05$ .

Además de esta limitación del crecimiento con las concentraciones más elevadas de glufosinato 3.0 y 4.0 mg l<sup>-1</sup> también se observaron los mayores valores en el grado de afectación.

Al respecto no se dispone de referencias bibliográficas que informen sobre la utilización de glufosinato de amonio como agente selectivo de brotes *in vitro* de plátanos y bananos. En trigo (*Triticum aestivum* L), Weeks *et al.* (1993) realizaron la selección a nivel de brotes *in vitro* y de callos in medio de cultivo semisólido con una concentración de 1.0 mg l<sup>-1</sup> de fosfotricina. Los resultados del presente trabajo coinciden con lo descrito por estos autores, quienes obtuvieron como mejor criterio de selección para plantas transgénicas 'el desarrollo' de las raíces ante la presencia del agente selectivo.

#### Plantas en casa de cultivo

Se observó que el glufosinato de amonio afectó el crecimiento de las plantas de banano cv. 'Grande naine'. A partir del tercer día después de la aplicación del herbicida, las concentraciones más altas produjeron clorosis en las hojas de las plantas, sin embargo a los 30 días estas afectaciones fueron mayores con todas las concentraciones del agente selectivo que fueron aplicadas. Como principales daños se encontraron hojas con el borde o la totalidad de estas con necrosis y plantas con necrosis total. De acuerdo con los daños provocados a las plantas por las diferentes concentraciones de glufosinato de amonio, se elaboró la siguiente escala de evaluación (Tabla 5).

Tabla 5. Escala descriptiva propuesta para determinar el efecto del glufosinato de amonio sobre plantas del cultivar de banano 'Grande naine' (*Musa* spp. AAA) en fase de aclimatización a los 30 días de cultivo.

Grado	Descripción	
1	Planta similar al control	
2	Planta con necrosis en el borde de las hojas y pseudotallo verde	
3	Planta con el 90% de las hojas con necrosis, hoja cigarro con punta necrótica y pseudotallo verde	
4	Planta con necrosis total	

Tabla 6. Efecto del glufosinato de amonio sobre plantas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* spp. AAA) a los 30 días de crecimiento en casa de cultivo de acuerdo con la escala de evaluación propuesta (Tabla 5).

Glufosinato de amonio (g l <sup>-1</sup> )	Grado	
	Media	Rangos medios
Control	1.0	4.50 d
5.0	2.0	15.0 c
10.0	2.4	18.0 bc
20.0	3.6	33.5 b
30.0	4.0	38.0 a
40.0	4.0	38.0 a

De forma general se comprobó que el glufosinato de amonio afectó el crecimiento de las plantas en la casa de cultivo, sin embargo con la aplicación de 30.0 y 40.0 g l<sup>-1</sup> se ocasionó la muerte total de las plantas a los 30 días de cultivo, sin diferencias significativas entre ellas. Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó la concentración de 30.0 g l<sup>-1</sup> (3%) de glufosinato de amonio para la futura selección de plantas transgénicas.

En relación con la selección con glufosinato de amonio en plantas de banano crecidas en casa de cultivo no se dispone de referencias bibliográficas. Sin embargo, en el cultivo del arroz (*Oriza sativa* L.) con menores concentraciones del herbicida (0.25 al 1.0%) se provocó la muerte de las plantas (Toki *et al.*, 1992). Estas concentraciones son inferiores a las empleadas en el presente trabajo, lo cual pudiera estar relacionado en que el glufosinato de amonio se

considera un herbicida de contacto con un efecto sistémico vía floema. Es absorbido por las hojas y en menor medida por los tallos verdes, según Labrada *et al.* (1996). Esto puede ser una explicación de la mayor resistencia del cultivo del banano a este herbicida. Lo descrito anteriormente se corresponde con que su efecto es más tardío ya que a los 30 días es que se observaron los mayores daños para las plantas crecidas en casa de cultivo. Ello no se asemeja a los resultados descritos en otros cultivos donde a partir de los tres días ya es posible realizar la selección de posibles resistentes (Toki *et al.*, 1992).

Por ejemplo, en *Leymus chinensis* (Trin) Tzvel (pasto perenne) Shu *et al.* (2005) realizaron la aplicación del herbicida BASTA® en casa de cultivo a las plantas de líneas transgénicas a las concentraciones de 100, 300, 600, 800 y 1400 mg l<sup>-1</sup> de fosfinotricina para la selección de aquellas que expresaran el gen *pat*. Las evaluaciones se realizaron después de cinco días de aplicado a las plantas. Se observó la muerte total de las plantas no transformadas después de tres semanas.

## CONCLUSIONES

Se comprobó que el glufosinato de amonio a partir del herbicida comercial Finale® (15%), puede emplearse para la selección de agregados celulares embriogénicos, brotes *in vitro* y plantas en casa de cultivo de banano cv. 'Grande naine'. Este agente selectivo inhibió el crecimiento y produjo clorosis y necrosis en estos materiales vegetales. La concentración mínima inhibitoria para agregados celulares embriogénicos fue de 20.0 mg l<sup>-1</sup>, para brotes de 3.0 mg l<sup>-1</sup> y para plantas en casa de cultivo de 30 g l<sup>-1</sup>. A partir de los resultados se elaboraron escalas descriptivas para determinar su efecto que pueden ser aplicadas en estudios de transformación genética.

## REFERENCIAS

- Andow DA and Zwahlen C (2006) Assessing environmental risks of transgenic plants. *Ecology Letters* 9: 196–214
- Bayer CropScience (2005) Technical information Glufosinate-ammonium. CropScience.
- Beck E, Ludwig A, Anerswald E, Reiss B, Achaller H (1982) Nucleotide sequence and exact localisation of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn 5. *Gene* 19: 327-336
- Becker D, Dugdale B, Smith M, Harding R, Dale J (2000) Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. 'Grande naine' via microprojectile bombardment. *Plant Cell Report* 19: 229-234
- Bermúdez-Carabaloso I, Kosky RG, Reyes M, Chong-Pérez B (2006) Determinación de la dosis letal mínima de fosfinotricina para la selección de transformantes de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA). *Biotecnología vegetal* 6 (3): 32-36
- 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
- Busot GG, Kosky RG, Reyes M, de la Riva G, Más L, Vázquez R (1999) Expresión del gen *uidA* en suspensiones celulares de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano) empleando *Agrobacterium tumefaciens*, pp. 228-230. Reportes cortos 5<sup>to</sup> Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. IBP. Junio 16-19 de 1999. Cuba
- 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). Tesis, de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las Plantas, UCLV. Santa Clara. Cuba
- Darbani B, Eimanifar A, Neal C, Camargo W (2007) Methods to produce marker-free transgenic plants. *Biotechnol J.* 2: 83-90
- 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
- Ganapathi TR, Higgs NS, Balint-Kurti PJ, Artzen CJ, May GD, Van Eck JM (2001) *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspension of the banana cultivar Rasthali (AAB). *Plant Cell Report* 20: 157-162
- García E C, Villarroel C, Oropeza M (2004) Progress on plantain (*Musa* AAB cv. Hartón) transgenesis: Transformation for resistance to herbicide BASTA. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 1: 8-14
- García EA, Mejías TE, Vargas A R (2004) Morfoanatomical and molecular aspects of *in vitro*

- infection of plantain cv. Harton, by the fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. XVI Reunión Internacional ACORBAT, 26 de septiembre al 1ro de octubre de 2004. Oaxaca. México
- Kosky RG, Escalant JV, Reyes MV, Posada-Pérez L, Freire-Seijo M (1999) Embriogénesis somática em medio líquido en el cv. Gran Enano (*Musa* AAA). CORBANA 25 (52): 143-154
- Kosky RG, De Fera M, Posada-Pérez L, Gilliard T, Martínez FB, Reyes M, Chávez M, Quiala E (2002) Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor. Plant Cell Tissue Organ Culture 68: 21-26
- Hadi MZ, Kemper E, Wendeler E, Reiss B (2002) Simple and versatile selection of *Arabidopsis* transformants. Plant Cell Reports 21: 130-135
- Hails S R, Morley K (2005) Genes invading new populations: a risk assessment perspective. Trends in Ecology & Evolution 20 (5): 245-252
- Herrera-Estrella L, De Block M, Messens E, Hernalsteen JP, Van Montagne M, Schell J (1983) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. EMBO J. 2: 987-995
- Khanna H, Becker D, Kleidon J, Dale J (2004) Centrifugation assisted *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (CAAT) of embryogenic cell suspensions of banana (*Musa* spp. Cavendish AAA and Lady Finger AAB). Molecular Breeding 14: 239-252
- Labrada R, Panker C, Caseley J (1996) Manejo de malezas para países en desarrollo (Estudio FAO Producción y Protección Vegetal –120). FAO. Roma
- Matsumoto K, Cunha NB, Morais LS, Aragao FJL (2005) Instability of transgenes in *in vitro*-maintained banana plants. Acta Hort. 738: 529-533
- Miki B, McHugo S (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. J. Biotech. 107: 193–232
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15: 473-497
- Orellana P (1994) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis de Doctorado. UCLV. IBP. Santa Clara. Cuba
- Parveez GKA, Chowdhury MKU, Saleh NM (1996) Determination of minimal inhibitory concentration of selection agents for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Transformation Asia Pac. J. Mol. Biotechnol. 4: 219-228
- Remy S, Thiry E, Coemans B, Windelinckx S, Swennen R, Sagi L (2005) Improved T-DNA vector for tagging plant promoters via high-throughput luciferase screening. BioTechniques 38: 763-770
- Sagi L, Remy S, Panis B, Swennen R, Volckaert G (1994) Transient gene expression in electroporated banana (*Musa* spp., cultivar 'Bluggoe', ABB group) protoplast isolated from regenerable embryogenic cell suspension. Plant Cell Reports 13: 262-266
- Sagi L, Panis B, Remy S, Schoofs H, De Smet K, Swennen R, Cammue BP (1995) Genetic transformation of banana and plantain (*Musa*) via particle bombardment. Biotechnology 13: 481-485
- Shu QY, Liu GS, Xu SX, Li XF, Li HJ (2005) Genetic transformation of *Leymus chinensis* with the PAT gene through microprojectile bombardment to improve resistance to the herbicide BASTA. Plant Cell Rep. 24: 36-44
- Sreeramanan S, Maziah M, Abdullah MP, Rosli NM, Xavier R (2006) Potential selectable marker for genetic transformation in banana. Biotechnology 5 (2): 189-197
- Steward CN, Halfhill MD, Warwick SI (2003) Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. Nature Rev. Genet. 4: 806-817
- Toki S, Takamatsu S, Nojiri CH, Ooba S, Anzai H, Iwata M, Christensen AH, Quail PH, Uchimiya H (1992) Expression of a maize Ubiquitin gene promoter-bar chimeric gene in transgenic rice plants. Plant Physiol. 100: 1503-1507
- Triparthi L, Triparthi JN, Hughes JDA (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of plantain (*Musa* sp.) cv. Agbagba. African Journal of Biotechnology 4(12): 1378-1383
- 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
- Yoon ES, Jeong JH, Choj YE (2002) Recovery of BASTA resistant *Sedum erythrostichum* via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. Plant Cell Rep. 21: 70-75
- Zapiola L M, Campbell C K, Butler D M, Mallory-Smith CA (2007) Escape and establishment of transgenic glyphosate-resistant creeping bentgrass *Agrostis stolonifera* in Oregon, USA: a 4-year study. Journal of Applied Ecology 45 (2): 486-494