

RESPUESTA DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE *Ficus lyrata* Warb. PORTADORAS DEL GEN QUIMÉRICO P_{SAG12:ipt} A DIFERENTES AMBIENTES DE CULTIVO

Jhonathan Torres Amaro¹, Jesús Sangronis Herrera¹ y Alexander Hernández¹

RESUMEN

Ficus lyrata es una importante especie ornamental para interiores y paisajismo. Se evaluó el comportamiento de cuatro líneas transgénicas (tg) portadoras del gen P_{SAG12:ipt} y el testigo sin transformar (wt), ante cuatro ambientes de cultivo: 1) 78 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 30 °C; 2) 42 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 27 °C; 3) 36 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 32 °C; 4) 18 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 27 °C. Se emplearon vitroplantas en potes con sustrato, cultivadas en umbráculo durante 270 días antes de ser sometidas a los tratamientos. Las líneas transgénicas presentaron menor contenido relativo de clorofila que el testigo sin transformar, pero mayor altura de planta y número de hojas. Entre las líneas transgénicas, la tg19 fue más alta, con hojas más grandes y menor número de ellas, mientras que la tg25 se mostró como una planta de porte bajo con gran cantidad de hojas pequeñas. En términos generales, el efecto de la expresión del transgen fue similar en todos los ambientes y consistió en incremento de la altura de las plantas y número de hojas, y reducción del contenido relativo de clorofila. Con base en el tamaño de la planta, número de hojas y coloración del follaje, el ambiente 3 puede considerarse el más adecuado para el cultivo de esta especie con fines ornamentales.

Palabras clave adicionales: Biotecnología, crecimiento y desarrollo, irradiancia, plantas transgénicas

ABSTRACT

Response of transgenic lines of *Ficus lyrata* Warb. carrying P_{SAG12:ipt} chimeric gene under different growing environments
Ficus lyrata is an important ornamental species as interior plant and for landscaping. In the present work there was evaluated the behavior of four transgenic lines (tg) harboring the P_{SAG12:ipt} gene and the wild type, without transforming (wt), exposed to different culture environments: 1) 78 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and 30 °C; 2) 42 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and 27 °C; 3) 36 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and 32 °C; 4) 18 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and 27 °C. Vitroplants in pots with substrate were cultivated in a shadehouse for 270 days before submitting them to the treatments. The transgenic lines had lower relative chlorophyll content than the control, but they were taller with higher leaf number. Among the transgenic lines, the tg19 was higher, with larger leaves, and fewer number of them, while the tg25 showed as a low growing plant with many small leaves. In general terms, the effect of the expression of the quimeric gene was similar in the four environments and promoted the increase of plant height and number of leaves, and reduction of chlorophyll content. Based on plant height, leaves number and coloration of the foliage, the environment 3 can be considered to be most suitable for the culture of this species for ornamental purposes.

Additional key words: Biotechnology, growth and development, irradiance, transgenic plants

INTRODUCCIÓN

Ficus lyrata, de la familia Moraceae, es una planta empleada como follaje para interiores debido al atractivo que presentan sus hojas y a la alta capacidad de adaptación a la luminosidad y humedad que existe en dichos lugares (Joiner, 1981). También es muy utilizada en paisajismo. Entre los principales aspectos que requieren mejoramiento genético destacan la fuerte dominancia apical de los juveniles, la tendencia a la defoliación en condiciones de baja luminosidad

y la poca variabilidad en su aspecto (Poole y Conover, 1988). Las particularidades de su biología reproductiva hacen difícil el mejoramiento genético clásico, por lo que se ha planteado la transformación genética como una alternativa de introducción de caracteres de interés (Torres, 2005). Entre las posibilidades de modificación del aspecto externo y la tolerancia a estreses ambientales se encuentra la introducción de genes foráneos tal como la integración del gen ipt al genoma vegetal (Khodakovskaya et al., 2009).

Recibido: Enero 24, 2011

Aceptado: Octubre 24, 2011

¹ Posgrado de Agronomía, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela. e-mail: jhonathantorres@ucla.edu.ve

Se ha descrito que su introducción en el genoma incrementa los niveles endógenos de citocininas en los tejidos (McKenzie et al., 1994), con efectos de reducción de la dominancia apical, retraso de la senescencia y estímulo a la expresión de genes relacionados con la tolerancia a estreses ambientales (Brzobohaty et al., 1994). En el presente trabajo se evaluó el comportamiento de cuatro líneas transgénicas portadoras del gen $P_{SAG12}:ipt$ y el testigo sin transformar de *F. lyrata*, ante diferentes ambientes de cultivo. Esto puede contribuir a determinar las posibilidades de emplear la metodología de la transformación genética como herramienta para el mejoramiento de especies en condiciones de baja irradiancia, a la vez que se describe la expresión de dicho transgén ante diferentes condiciones de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron vitroplantas de seis semanas de edad, obtenidas a partir de la elongación y el enraizamiento de brotes axilares tomados de material vegetal proveniente de la fase de multiplicación de cuatro líneas transgénicas de *F. lyrata* (tg19, tg23, tg25 y tg109) portadoras del gen quimérico $P_{SAG12}:ipt$, y plantas sin transformar (wt). Las transformaciones habían sido realizadas en el Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos Vegetales del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC) en Valencia, España. Las vitroplantas fueron propagadas bajo idénticas condiciones ambientales (temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperiodo de 16 horas, irradiancia de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), durante ocho semanas después del sub-cultivo, en medio de Murashige-Skoog, sin reguladores de crecimiento. Se sometieron a un proceso de aclimatización en cámara húmeda, y luego de seis semanas fueron plantadas en recipientes con sustrato compuesto por suelo, arena y cascarilla de arroz (1:1:1 v/v) en el umbráculo del Posgrado de Horticultura de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", en Tarabana ($10^{\circ} 05' \text{ N}$ y 510 msnm), estado Lara, Venezuela, bajo una irradiancia máxima de $78 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, temperatura media de 30 °C y humedad relativa media de 71 %, durante 270 días. A lo largo de este tiempo se les aplicó fertirrigación mensual con $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fertilizante soluble 20-20-20, más oligoelementos quelatados).

El crecimiento de las plantas fue evaluado mediante cuatro ensayos en los siguientes

ambientes de cultivo: 1) Umbráculo con irradiancia promedio a mediodía de $78 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y temperatura diurna promedio de 30 °C. 2) Laboratorio con iluminación artificial de $42 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 27 °C. 3) Cámara de crecimiento (Lab Line Environ. Chamber), con $36 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 32 °C. 4) Similar cámara de crecimiento, con $18 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 27 °C. Los experimentos se condujeron bajo un diseño completamente al azar con cinco tratamientos (las cuatro líneas tg más el testigo wt) y cuatro repeticiones.

A los 90 días se midió, tanto en las líneas transgénicas como en el testigo sin transformar, la altura de planta y el número, ancho y longitud de la hoja adulta más reciente. También el contenido relativo o índice de clorofila utilizando un medidor SPAD-502 Minolta.

Se aplicó un análisis combinado por ambiente a la serie de experimentos con tratamientos comunes e igual número de repeticiones. Los resultados fueron comparados mediante análisis de varianza y prueba de medias de Tukey utilizando el programa SAS 7.02 (Cary, NC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Cuadro 1 muestra los resultados del análisis conjunto de los cinco genotipos, en promedio de los cuatro ambientes. La tg19 se destacó por las mayores alturas de planta y dimensiones de las hojas ($P \leq 0,05$), tanto en longitud como en anchura de la lámina foliar. Por el contrario, esta línea fue la que mostró menor número de hojas entre las plantas transgénicas. La tg25 resultó la línea transgénica de menor altura, y con las hojas más pequeñas, incluso menores que las del testigo ($P \leq 0,05$); en concordancia con esto, fue la planta que presentó el mayor número de hojas.

Las tg23 y tg109 mostraron un crecimiento intermedio entre los dos genotipos anteriores en cuanto a la altura de planta y número de hojas, mientras que las dimensiones de sus hojas fueron iguales entre sí ($P > 0,05$). La diferencia existente entre las líneas transgénicas puede atribuirse a la presencia del gen *ipt* el cual puede conferir alteraciones en el desarrollo y estructura de la planta (Smigocki, 1995).

El testigo sin transformar fue la planta que mostró la menor altura y menor número de hojas ($P \leq 0,05$) entre todos los materiales evaluados.

Todas las líneas transgénicas presentaron contenidos relativos de clorofila notoriamente

inferiores al testigo. Esto se corresponde con los resultados de Torres (2005), quien encontró que las plantas transgénicas de *F. lyrata* portadoras de gen quimérico PSAG12:ipt presentaban una coloración foliar más amarilla que el testigo sin transformar. Esta reducción en la intensidad del color en las líneas transgénicas podría ser explicado por la reducción de la movilización de nitrógeno hacia puntos de consumo, tal como ha sido descrito por Jordi et al. (2000) en tabaco.

El comportamiento promedio de los materiales en los cuatro ambientes se presenta en el Cuadro 2. Se observa que en el ambiente 2 las plantas tuvieron menor altura y menor número de hojas ($P \leq 0,05$), pero al mismo tiempo éstas mostraron mayor longitud. Asimismo, las plantas de los ambientes 3 y 4 (cámaras de crecimiento) presentaron mayor altura que en los ambientes 1 y 2 ($P \leq 0,05$), como una posible consecuencia de la menor irradiancia que allí existió.

Cuadro 1. Variables vegetativas de la planta e índice de clorofila a los 90 días en cuatro líneas transgénicas (tg) de *F. lyrata* y el testigo sin transformar (wt) cultivadas en cuatro ambientes

Material	Altura de planta (cm)	Número de hojas	Longitud de hoja (cm)	Ancho de hoja (cm)	Índice de clorofila (SPAD)
Wt	5,03 d	5,56 d	7,93 c	4,20 b	41,89 a
Tg19	11,66 a	20,19 c	10,21 a	4,91 a	23,29 b
Tg23	8,34 b	26,63 b	8,89 b	4,48 b	21,12 c
Tg25	6,86 c	32,63 a	5,99 d	3,19 c	23,06 bc
Tg109	6,60 c	22,31 c	9,32 b	4,20 b	24,18 b

Valores con la misma letra no difieren, de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

Cuadro 2. Efecto de cuatro ambientes de cultivo sobre variables vegetativas de la planta e índice de clorofila a los 90 días en las cuatro líneas transgénicas de *F. lyrata* y el testigo sin transformar

Ambiente	Altura de planta (cm)	Número de hojas	Longitud de hoja (cm)	Ancho de hoja (cm)	Índice de clorofila (SPAD)
Ambiente 1	7,63 b	22,40 a	7,84 c	3,59 b	15,68 d
Ambiente 2	7,66 b	17,00 b	9,23 a	4,42 a	28,16 b
Ambiente 3	8,46 a	21,85 a	8,42 b	4,45 a	37,63 a
Ambiente 4	8,64 a	24,60 a	8,39 b	4,32 a	25,35 c

Valores con la misma letra no difieren de acuerdo a la prueba de Tukey. ($P \leq 0,05$). Ambiente 1= $78 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 30°C ; Ambiente 2= $42 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 27°C ; Ambiente 3 = $36 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 32°C ; Ambiente 4= $18 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 27°C

Las plantas en el ambiente 1 presentaron menor altura y menores dimensiones de las hojas, y fueron las de menor contenido de clorofila ($P \leq 0,05$). Lo anterior podría atribuirse al nivel relativamente alto de irradiancia ($78 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) que allí existió. Joiner (1981) señala un valor de $67 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ como la irradiancia máxima para la producción de *Ficus* en potes, y se ha encontrado que valores menores ocasionan mayores valores de altura de planta, área foliar e índice de clorofila en *Pinus halepensis* (Puértolas et al., 2009) y *Tabebuia chrysotricha* (Endres et al., 2010).

Por su parte, en los ambientes 3 y 4 (cámaras de crecimiento) las plantas resultaron muy parecidas entre sí en relación a su altura y al número y dimensiones de las hojas; pero en el ambiente 4 las plantas mostraron menor contenido de clorofila ($P \leq 0,05$). Esto se atribuye al muy bajo nivel de irradiancia ($18 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) que existió

en este ambiente.

En el ambiente 2 las plantas superaron a las cultivadas en el ambiente 3 sólo en la longitud de la hoja pero fueron inferiores en cuanto a la altura de la planta, número de hojas y contenido de clorofila ($P \leq 0,05$), lo que le confiere ventajas al ambiente 3. Es decir, si se considera el aspecto general de las plantas, con base en el tamaño de la planta, el número de hojas y la intensidad de la coloración del follaje, el ambiente 3 podría considerarse el más adecuado para el cultivo de esta especie con fines ornamentales. Aunque Joiner (1981) señala un valor de $54 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ como la irradiancia mínima para la producción de *Ficus* en potes, el autor recalca que las exigencias son variables para las diferentes especies.

Con respecto de la respuesta general de las vitroplantas de *Ficus lyrata* ante los diferentes ambientes de cultivo se encontró una mayor altura

de planta y número de hojas en las dos condiciones de menor irradiancia, es decir, en las cámaras de crecimiento. Por su parte, la mayor intensidad de verdor del follaje se observó en los ambientes de baja irradiancia.

Dado que el rango de variación de la temperatura entre los cuatro ambientes fue muy estrecho (27-32 °C), el efecto de ésta sobre las plantas habría sido pequeño; de hecho, se observaron diferencias significativas en las respuestas de las plantas cultivadas en ambientes con igual temperatura (ambientes 2 y 4), y alta similitud de ellas en ambientes con la mayor diferencia en temperatura (ambientes 3 y 4).

En general, hubo diferencias más marcadas sobre la morfología de las plantas por efecto de las diferencias entre el material genético que por efecto de los diferentes ambientes estudiados. Tal parece que el efecto morfológico producto de la expresión del gen quimérico no está ligado directamente a la exposición a condiciones ambientales o que la intensidad del estrés en los diferentes ambientes no fue suficiente para desencadenar una respuesta claramente perceptible en las variables estudiadas.

Las diferencias morfológicas detectadas entre las líneas transgénicas y el testigo sin transformar indican que la expresión del gen quimérico pSAG12:ipt confirió determinadas características a las líneas, lo que podría ser potencialmente considerado como una referencia para el desarrollo de aplicaciones en horticultura.

CONCLUSIONES

Las líneas transgénicas presentaron contenidos relativo de clorofila considerablemente inferiores al testigo sin transformar, pero mayores dimensiones de sus características morfológicas. Entre las líneas transgénicas, la tg19 fue más alta, con hojas más grandes y menor número de ellas, mientras que lo opuesto se observó en la tg25. En general, el efecto de la expresión del gen quimérico P_{SAG12}:ipt consistió en incremento de la altura de las plantas y del número de hojas, así como la reducción de intensidad del color del follaje. En promedio, el ambiente 3 lució como el más adecuado para el cultivo de esta especie.

LITERATURA CITADA

1. Brzobohaty, B., I. Moore y K. Palme. 1994.

Cytokinin metabolism: implications for regulation of plant growth and development. *Plant Molecular Biology* 26: 1483-1497.

2. Endres, L., C. Camara, V. Ferreira y J. Silva. 2010. Morphological and photosynthetic alterations in the Yelliw-ipe, *Tabebuia chrysostricha* (Mart. Ex DC.) Standll., under nursery shading and gas exchange after being transferred to full sunlight. *Agroforest Syst.* 78: 287-298.
3. Joiner, J. 1981. *Foliage Plant Production*. Prentice-Hall. Upper Saddle River, N.J.
4. Jordi, W., A. Schapendonk, E. Davelaar, G. Stoop, C. Pot, R. Visser, J. Van Rhijn, S. Gan y R. Amasino. 2000. Increased cytokinin levels in transgenic P_{SAG12}:ipt tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant, Cell and Environment* 23: 279-289.
5. Khodakovskaya, M., R. Vanková, J. Malbeck, A. Li, Y. Li y R. McAvoy. 2009. Enhancement of flowering and branching phenotype in chrysanthemum by expression of *ipt* under the control of a 0,821 kb fragment of the LEACO1 gene promoter. *Plant Cell Rep.* 28:1351-1362.
6. McKenzie, M., P. Jameson y R. Poulter. 1994. Cloning an *ipt* gene from *Agrobacterium tumefaciens*: characterization of cytokinins in derivative transgenic plant tissue. *Plant Growth Regulation* 14: 217-228.
7. Poole, R. y C. Conover. 1988. Influence of paclobutrazol on foliage plants. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 101: 319-320.
8. Puértolas, J., L. Benito y J. Peñuelas. 2009. Effects of nursery shading on seedling quality and post-planting performance in two Mediterranean species with contrasting shade tolerance. *New Forests* 38: 295-308.
9. Smigocki, A. 1995. Phenotype modification and enhanced tolerance to insect pest by regulated expression of a cytokinin biosynthesis gene. *HortScience* 30(5): 967-969.
10. Torres, J. 2005. Transformación genética de *Ficus lyrata* Warb. con el gen P_{SAG12}:ipt. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. España. 203 p.