

Evaluación en condiciones de aclimatización de la resistencia a *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica* y al herbicida FINALE en plantas transgénicas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr)*

M. Arbola (1), P. Espinosa (1), L. Yabor (1), A. Iglesias (1), J. C. Lorenzo (1) y A. Arencibia (2).

(1) Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila (UNICA), Ciego de Ávila, Cuba.

(2) Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA).

RESUMEN. La piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) es el cultivo de mayor importancia comercial en la familia Bromeliaceae. Sus rendimientos anuales son seriamente afectados por la incidencia de enfermedades, entre ellas las más importantes son la fusariosis, que provoca el hongo *Fusarium subglutinans* y la pudrición del corazón que la causa el hongo *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. La obtención de variedades resistentes sería una solución a estos problemas, pero los métodos tradicionales de mejoramiento consumen mucho tiempo, es por ello que las técnicas de Ingeniería Genética contribuyen en gran medida a resolver este problema. Se obtuvieron vitroplantas de piña genéticamente modificadas a partir del protocolo de transformación genética propuesto por Espinosa *et al.* (2001). A los tres meses de adaptadas las plantas putativamente transgénicas en casas solares se realizó el experimento de reto frente al patógeno (*Phytophthora nicotiana* var. *parasitica*). De 40 líneas de plantas transgénicas que se consideraron eventos de transformación independiente, en seis se observó más de un 66 % de supervivencia frente al patógeno. En las plantas que se utilizaron como control positivo, plantas de piña sin transformar, hubo 100 % de mortalidad, contrario a lo que sucedió con el control resistente, plantas de *Bromelia pinguin*, donde no se observó ninguna planta muerta. Cuando se evaluó la resistencia de las líneas transgénicas de piña frente al herbicida Glufosinato de amonio, a una concentración de 2 % v/v, se obtuvo que seis líneas de plantas transgénicas mostraron la mayor resistencia, donde el 70 % de las hojas de las plantas tenían un daño menor, inverso a lo que sucedió en las plantas de piña sin transformar, las cuales no sobrevivieron a la concentración del herbicida que se aplicó.

Palabras clave: *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica*, transgénesis, piña, FINALE.

ABSTRACT. The pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) is the principal crop in the family Bromeliaceae. Its yield per year are seriously affected by the incidence of many diseases; among them the wilt caused by *Fusarium subglutinans* and the heart rot caused by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. The principal control measures against them is the use of resistant varieties obtained by breeding, but these techniques consume a lot of time and many resources. The employ of engineering techniques were obtained pineapple vitroplants genetically modified from a protocol proposed by Espinosa *et al.* (2001). After three months the adapted plants were inoculated with *P. nicotianae* var. *parasitica*. From 40 independent transformed lines, was observed more than 66 % of healthy plants from six of them. The check plants showed 100 % of mortality and the resistant plant control *Bromelia pinguin* no dead plants were observed. Also a resistance against the herbicide FINALE (Glufosinate of ammonium at 2 %) was observed in 6 lines of transgenic plants, where 70 % of the leaves no symptoms showed, contrary to the non-transformed plants, which no survived after the application of the herbicide.

Key words: *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica*, transgenesis, pineapple, FINALE.

INTRODUCCIÓN

Bialafos es un antibiótico tripéptido natural producido por las bacterias del suelo Gram negativas *Streptomyces hygroscopicus* y *S. viridochromogenes*, el cual se usa como herbicida no selectivo. La mitad activa de este herbicida es la fosfotricina (PPT), y es un

análogo del L-glutámico con dos residuos de L-alanina (Keller *et al.*, 1997). El PPT es también sintetizado químicamente como glufosinato de amonio, se conoce de manera comercial como BASTA, FINALE, entre otros. Este producto es un inhibidor irreversible de la glutamina sintetasa, la única enzima que detoxifica el amonio que se produce durante la reducción del

* IX Simposio de Sanidad Vegetal en la Agricultura Tropical

nitrito, fotorrespiración y degradación de aminoácidos en las células vegetales (D'Halluin *et al.*, 1992).

Cuando se aplica PPT a las plantas se acumula el amonio a concentraciones fitotóxicas y por eso el tejido vegetal se daña hasta provocar la muerte de la planta. Por otra parte, las especies de *Streptomyces* que producen bialafos tienen a su vez mecanismos para neutralizar la toxicidad de sus productos metabólicos, ventaja esta que se aprovechó para aislar de *S. hygroscopicus* el gen de resistencia a bialafos, *bar*. (Thompson *et al.*, 1987).

Por otra parte, los métodos de selección *in vitro* a las enfermedades reducen el tiempo de respuesta y permiten la selección sobre un gran número de genotipos en un espacio reducido de tiempo. También, para el éxito de los mismos se debe tener en cuenta el agente de selección (microorganismo, filtrado tóxico, toxina, marcadores estructurales, fisiológicos, bioquímicos o moleculares); niveles de selección (plantas, vitroplántulas, callos, suspensiones celulares, protoplastos) y variantes genéticas (recombinación somática, variación somaclonal, inducción de mutaciones y transformación), que permitan en un tiempo breve conocer si una planta es resistente o susceptible, aspectos que no cumplen los sistemas de selección de resistencia tradicionales, los cuales son lentos, poco precisos y difíciles de controlar ante las condiciones ambientales (Jones, 1990).

La piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) es una de las frutas tropicales de mayor importancia (Duval *et al.*, 2001). El mejoramiento por técnicas tradicionales es muy laborioso y consume mucho tiempo (Botella *et al.*, 2000), es por esto que la ingeniería genética pudiera ser una herramienta muy útil para resolver algunos de los problemas que afectan a este cultivo.

Por ello, el objetivo propuesto fue evaluar en condiciones de casas solares la resistencia al herbicida FINALE (agente de selección) y a *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica* de las diferentes líneas transgénicas de piña que mostraron resistencia al agente de selección en condiciones *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de la resistencia a *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica* en líneas transgénicas de piña en condiciones de aclimatización

Se utilizaron líneas transgénicas de piña de tres meses de adaptación. Se adaptaron 40 líneas transgénicas (15 plantas por cada línea). Para la inoculación del hongo se empleó la técnica de inoculación por punción, donde las plantas una vez dañadas con la aguja fueron sumergidas en una solución del hongo a una concentración de 10^8 zoosporas/mL y se colocaron nuevamente en las bandejas. A los 30 días se evaluó el porcentaje de supervivencia de las plantas.

La cepa de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* se aisló de las áreas de la Empresa Piña. Se tomaron hojas que presentaban los síntomas típicos de la enfermedad como: cambio de coloración en las hojas y olor fétido; en algunos casos el síntoma solo se hace visible cuando las hojas son desprendidas fácilmente (Pegg, 1993).

Las hojas con las lesiones se lavaron en agua corriente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1 %, durante tres minutos, luego se pasaron por alcohol al 70 % y se lavaron en agua destilada estéril. Las muestras se colocaron en agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 28 °C durante 48 horas a la oscuridad; el micelio que se observó se transfirió a placas con PDA para obtener un cultivo puro del hongo.

Como tratamientos control se utilizaron hojas de *Bromelia pinguin* (control positivo) y de cayena lisa (control negativo).

Evaluación de la resistencia al herbicida BASTA en líneas transgénicas de piña en condiciones de aclimatización

Se adaptaron en condiciones de casas solares 45 líneas transgénicas de piña (10 plantas por cada línea) en bandejas de 40 orificios. El sustrato utilizado fue zeolita más cachaza en una proporción de 1:1. Se mantuvieron en el área

protegida para las plantas transgénicas (Licencia de Bioseguridad 65/02). Como control negativo se utilizaron plantas sin transformar de cayena lisa serrana. A los tres meses de permanecer las plantas en estas condiciones se les aplicó la dosis del 2 % v/v de la solución acuosa del producto comercial FINALE (150 mg/L), que tiene como producto activo el glufosinato de amonio, esta dosis representa la proporción de 12 L/ha. A los 30 días se observaron los síntomas en las hojas y se estableció la escala de evaluación siguiente:

- muy dañadas: toda la planta necrosada.
- medianamente dañadas: se necrosó la parte apical.
- poco dañadas: aparecen pocas manchas foliares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la resistencia a *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica* en líneas transgénicas de piña en condiciones de aclimatación

La expresión de genes heterólogos en plantas es un paso muy importante en un programa de mejoramiento de cultivos por ingeniería genética, para esto, los genes clonados han de transferirse a la planta deseada por medio de algunos de los sistemas especializados desarrollados *ex profeso* para este propósito. Esto último es de suma importancia, ya que con frecuencia, los genes con los que se busca conferir a una planta un nuevo rasgo de valor agronómico, como el de mayor resistencia al ataque de insectos, tolerancia a herbicidas de amplio espectro o a toxinas producidas por fitopatógenos, provienen de bacterias o de otros eucariontes no vegetales, y pueden carecer de las “señales” apropiadas para ser transcritos o traducidos eficientemente en la planta huésped (Kingsman y Kingsman, 1988; Mantell *et al.*, 1985).

En la tabla 1 se observa un 100 % de mortalidad en las vitroplantas que se utilizaron como control negativo (cayena lisa). En la *Bromelia pinguin* (control positivo) no se observó ninguna planta muerta. Este microorganismo provocó cambio de coloración en las hojas y olor fétido, en algunos casos el síntoma se hizo visible

cuando las hojas fueron desprendidas fácilmente de las plantas. Similares síntomas describió Pegg (1993) en el caso específico de la piña.

De las 40 líneas de plantas transgénicas que se evaluaron en cinco se observó una supervivencia mayor del 66,6 %. Las líneas 1 y 20 no difirieron significativamente entre ellas, pero sí hubo diferencia estadística entre estas y las líneas 41, 48 y 79. Aunque todas las líneas transgénicas difieren significativamente del control positivo, es importante señalar que el ensayo frente al hongo se considera fuerte a partir de que se utiliza una solución del hongo, no un filtrado del mismo.

Tabla 1. Porcentaje de supervivencia en líneas transgénicas de piña en condiciones de aclimatación que se inocularon con *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica*. Medias con letras iguales no difieren (One-way ANOVA, Duncan, $p < 0,05$). Los datos se transformaron para el análisis según $x' = 2 \arcseno(x/100)$ 0,5.

Línea	Porcentaje de plantas muy dañadas (%)
1	66,6 c
20	66,6 c
41	72 c
48	83,3 b
79	72,7 b
<i>Bromelia pinguin</i>	100 a
Cayena lisa	0 c

Los genes de resistencia que presentan los vectores binarios que se emplearon en los experimentos son los que codifican para la enzima quitinasa, glucanasa y la proteína ap24. Los genes que codifican para la quitinasa se han introducido a las plantas mediante ingeniería genética en los programas de desarrollo para la resistencia a enfermedades (Terakawa *et al.*, 1997). Estos genes provienen de bacterias (Jones, 1986) o plantas (Broglie *et al.*, 1986; Shinshi *et al.*, 1987; Gaynor, 1988; Nishizawa y Hibi, 1991). El gen de la quitinasa que se aisló a partir de *Serratia marcescens* (*chi-A*) se transfirió a plantas de tabaco por Jones (1988) y Suslow *et al.*, (1988), las plantas que se

transformaron mostraron un significativo incremento de la actividad quitinasa y fueron más resistentes a *Alternaria longipes* que las plantas no transformadas.

Terakawa *et al.* (1997) transformaron plantas de tabaco mediante *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA404 plásmido pBI121CH y comprobaron la integración del gen *chi1* mediante el análisis Western blot. También infectaron plantas transformadas (Tch1-1) y no transformadas (SR-1) con *S. sclerotiorum* y *B. cinerea*. Con *S. sclerotiorum* a los tres días después de la inoculación las hojas de SR-1 expresaron los síntomas de la enfermedad y a los siete días tenía un desarrollo completo. En el caso de las plantas transformadas, los síntomas se desarrollaron muy tenues. Cuando utilizaron *B. cinerea* los síntomas típicos se observaron y se desarrolló una lesión definida en las plantas no transformadas luego de siete días posteriores a la inoculación. En Tch1-1 se redujo la lesión. Estos resultados indican que la quitinasa I de *R. oligosporus* confiere resistencia fungosa en plantas transgénicas de tabaco.

En plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) que fueron transformadas mediante *Agrobacterium tumefaciens* con un plásmido que contiene el gen de la quitinasa del arroz, Tabei *et al.*, (1998) demostraron la presencia del gen en las plantas transformadas mediante PCR-Southern hibridación y ciertos niveles de resistencia a la infección de *Botrytis cinerea*.

Evaluación de la resistencia al herbicida FINALE en líneas transgénicas de piña en condiciones de aclimatización

El herbicida FINALE tiene como compuesto activo la fosfinotricina. Este producto interfiere en la síntesis de aminoácidos a través de la inhibición de la glutamina sintetasa. Cuando se inhibe esta enzima la acumulación de amonio alcanza niveles muy altos y como resultado se afecta la fotosíntesis y la estructura de los cloroplastos (Metz *et al.*, 1998).

En la tabla 2 se muestran las líneas de plantas transgénicas de piña que expresaron resistencia al herbicida FINALE en condiciones de

aclimatización a los 30 días de aplicado el producto. De las 45 líneas transformadas que se evaluaron se observaron en cinco de ellas (líneas 27, 40, 44, 46 y 79) los mayores porcentajes de resistencia. Las líneas 70, 90, 90, 70 y 100 no mostraron efectos o daños visibles marcados, las mismas continuaron su normal crecimiento y desarrollo. Las plantas no transformadas mostraron necrosis completa de las hojas, inhibición del crecimiento y la muerte de la planta completa.

Tabla 2. Efecto del herbicida FINALE en el crecimiento y desarrollo de líneas transgénicas de piña. Medias con letras iguales no difieren (One-way ANOVA, Duncan, $p < 0,05$). Los datos se transformaron para el análisis según $x' = 2 \arcseno(x/100)$ 0,5.

Línea	Porcentaje de plantas muy dañadas (%).	Porcentaje de plantas medianamente dañadas (%).	Porcentaje de plantas poco dañadas (%).
27	10 c	20 a	70 b
40	0 c	10 a	90 a
44	0 c	10 a	90 a
46	10 c	20 a	70 b
79	0 c	0 b	100 a
90	30 b	10 a	60 b
Cayena lisa	100 a	0 b	0 c

Confalonieri *et al.* (2000) realizaron el ensayo de resistencia *in vivo* en plantas de *Pupulus alba* (L.) en cuatro líneas transgénicas independientes y en plantas no transformadas. Utilizaron dos plantas por cada línea, estas fueron asperjadas con una solución del producto comercial a 6 L/ha primero y a los 15 días hicieron otra aplicación pero a la dosis de 12 L/ha. Dos semanas después de la primera aplicación no se observaron síntomas en ninguna de las líneas transgénicas tratadas con 6 L/ha, todas continuaron su crecimiento y desarrollo normal, excepto el tratamiento control que fueron plantas no transformadas. Las que fueron tratadas con la dosis de 12 L/ha mostraron después de dos semanas áreas necrosadas en algunas de las hojas (13 % del total de hojas transgénicas). Todas las plantas transformadas sobrevivieron, continuaron creciendo y formaron nuevas hojas.

Las plantas control 30 días después de la aplicación mostraron necrosis total, atrofia del meristemo apical, la inhibición del crecimiento y finalmente la muerte.

En las plantas transgénicas de piña se pudo apreciar que la aplicación del herbicida causó daño a casi la totalidad de las mismas. Se presentó clorosis en las hojas y a medida que pasaron los días los síntomas se incrementaron. Una semana después de la aplicación del herbicida las plantas transgénicas se fueron recobrando, sin embargo el control no transformado murió. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Hoeven *et al.* (1994), donde evaluaron la resistencia al herbicida BASTA en plantas transgénicas de tabaco.

En *Arabidopsis thaliana* también se evaluó la resistencia de plantas transgénicas y no transgénicas, ambas fueron asperjadas con una solución de BASTA 20 % (v/v); las plantas controles sufrieron daños foliares intensos y a la semana de aplicado el producto murieron. En contraste con las plantas transgénicas que aunque en algunas se afectó el crecimiento se recuperaron del daño en pocas semanas (Akama *et al.*, 1995).

Poblaciones transgénicas de caña de azúcar se evaluaron con el objetivo de conocer la resistencia que presentaban al herbicida BASTA luego de comprobar la inserción del gen *bar* por Southern blot. Las plantas se asperjaron con una solución de 2,5 g/L y a las cuatro semanas se evaluó el daño que causó este producto. Las plantas control (no transgénicas) se necrosaron y murieron a la semana de aplicado. Las plantas transgénicas mostraron síntomas del efecto tóxico que causa este herbicida, pero se seleccionaron cualitativamente aquellas que presentaron afectaciones menores (Enriquez-Obregón *et al.*, 1998).

CONCLUSIONES

1. La selección de plantas transgénicas de piña en condiciones de aclimatización frente al hongo *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica* evidenció que cinco líneas

mostraron niveles de supervivencia mayor del 66,6 %.

2. La selección de las plantas transgénicas en condiciones de aclimatización frente al herbicida FINALE mostró diferentes niveles de resistencia en cinco líneas transgénicas de piña.

RECOMENDACIONES

1. Realizar la prueba de selección en las líneas transgénicas de piña en condiciones de campo frente a *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica* y al herbicida FINALE.
2. Analizar algunos marcadores bioquímicos relacionados con la respuesta de las líneas transgénicas de piña ante el efecto del hongo *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica* y el herbicida FINALE.

BIBLIOGRAFÍA

- Akama, K.; H. Puchta and B. Hohn (1995): "Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the *bar* gene as selectable marker". *Plant Cell Rep.* (14): 450-454.
- Botella, J. R.; A. S. Cavallaro and C. I. Cazzonelli (2000): Towards the production of transgenic pineapple to control flowering and ripening. In Subhadrabandhy, S. and P. Chairidchai (eds) Proc 3rd Int Pineapple Symp. *Acta Hort.* (529):115-122.
- Brogli, K. E.; J. J. Gaynor and R. M. Brogli (1986): "Ethylene-regulated gene expression: molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (83): 6820-6824.
- Confalonieri, M.; B. Belenghi; A. Balestrazzi *et al.* (2000): "Transformation of elite white poplar (*Populus alba* L.) cv. 'Villafranca' and evaluation of herbicide resistance". *Plant Cell Reports* (19): 978-982.

- D'Halluin K.; M. De Block; J. Denecke *et al.* (1992): "The *bar* gene as selectable and screenable marker in plant genetic engineering". *Methods Enzymology* (216): 415-426.

- Duval, M. F.; J. L. Noyer and X. Perrier *et al.* (2001): "Molecular diversity in pineapple assessed by AFLP markers". *Theor Appl Genet* (102): 83-90.
- Enriquez-Obregón, G. A.; R. I. Vázquez-Padrón; D. L. Prieto-Samsonov *et al.* (1998): "Herbicide-resistance sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation". *Planta* (206): 20-27.
- Gaynor, J. J. (1988): "Primary structure of an endochitinase mRNA from *Solanum tuberosum*". *Nucleic Acids Res.* (16): 5210.
- Hoeven, C.; A. Dietz and J. Landsmann (1994): "Expression of phosphinothricin acetyltransferase from the root specific par promoter in transgenic tobacco plants is sufficient for herbicide tolerance". *Plant Cell Reports* (14): 165-170.
- Jones, J. D. G. (1986): "Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*". *EMBOJ* (5): 467-473.
- _____ (1988): "Expression of bacterial chitinase protein in tobacco leaves using two photosynthetic gene promoters". *Mol. Gen. Genet.* (212): 536-542.
- Jones, W. P. (1990): *In vitro* selection for disease resistance. en *Plant cell line selection*. J. P. Dix (Ed.). Netherlands Editions, pp. 113-142.
- Kingsman, S. M. and A. J. Kingsman (1988): *Genetic engineering, an introduction to gene analysis and exploitation in eukaryotes*. Blackwell Scientific Publications. USA, 522 pp.
- Mantell, S. H.; J. A. Matthews and R. A. MacKee (1985): *Principles of plant biotechnology, an introduction to genetic engineering in plants*. Blackwell, Oxford, 269 pp.
- Metz, P. L. J.; W. J. Stiekema; J. P. Nap (1998): "A transgene-centered approach to the biosafety of transgenic phosphinothricin-tolerant plants". *Molecular Breeding* (4): 335-341.
- Nishizawa, Y. and T. Hibi (1991): "Rice chitinase gene: cDNA cloning and stress-induced expression". *Plant Sci.* (76): 211-218.
- Pegg, K. G. (1993): *Diseases. Pineapple pest and disorders*. (Eds.) R. H Broadley, R. C. Wassman, E. Sinclair, pp. 11-13.
- Shinishi, H.; D. Mohnen and F. Meins (1987): "Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme. Inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissue by auxin and cytokinin". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (84): 89-93.
- Sripaoraya, S. (2000): "Osmoticum pretreatment enhances transformation of pineapple". *Agricell Repor* (34): 44-45.
- Suslow, T. V.; D. Matsubara; J. Jones *et al.* (1988): "Effect of expression of bacterial chitinase on tobacco susceptibility to leaf brow spot". *Phytopathology* (78): 1556.
- Tabei, Y.; S. Kitade; Y. Nishizawa *et al.* (1998): "Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*)".
- Terakawa, T.; N. Takaya; H. Horiuchi *et al.* (1997): "A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco". *Plant Cell Reports* (16): 439-443.
- Thompson, C. J.; N. R. Movva; R. Tizard *et al.* (1987): "Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces higroscopicus*". *The EMBO Journal* 6 (9): 2523-2527.