

Universidad de Ciego de Ávila  
Centro de Bioplantas

**Plantas transgénicas de piña (*Ananas comosus* (L.)  
Merril) transformadas mediante *Agrobacterium  
tumefaciens* con tolerancia al herbicida FINALE® y  
resistencia a *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*.**

Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas

Autora: M. Sc. Lourdes Yabor Cabrera

Ciego de Ávila, Cuba  
2009

Universidad de Ciego de Ávila  
Centro de Bioplantas

**Plantas transgénicas de piña (*Ananas comosus* (L.)  
Merril) transformadas mediante *Agrobacterium  
tumefaciens* con tolerancia al herbicida FINALE<sup>®</sup> y  
resistencia a *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*.**

Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas

Autor: M. Sc. Lourdes Yabor Cabrera.  
Tutores: Dr. José Carlos Lorenzo Feijoo.  
Dr. Ariel Arencibia Rodríguez.

Ciego de Ávila, Cuba  
2009

*A mis tres soles, Ana Cecilia, José Miguel y  
Diego que iluminan a diario mis penumbras.*

*A Ary por ayudarme a cumplir otra más de  
mis promesas. Por la fortuna de todo lo fundado.*

*A la dirección del Centro de Bioplantas por conferirme este proyecto y creer que sí era posible.*

*A mis tutores Dr. José Carlos Lorenzo y Dr. Ariel Arencibia por ayudarme a apoderarme del reto, manejar las fuerzas y disolver las resistencias.*

*A mis amigos del laboratorio: Julia y Alitza por sus excelentes manos, a Marcos "el crío" por allanar el camino tantas veces, Baby Valle por la savia que hizo crecer las plantas, Rayza por tensar nuevamente mis cuerdas y a Mayda, la mejor de las escuderas, por enseñarme el valor de las pequeñas cosas.*

*A Liuba, Leya, Carol, con su entrega moví mejor la roldada, si no, ¡qué difícil hubiera sido!*

*A Carlito porque su huella en esta tesis también ha sido como la del Quijote.*

*A Maritza por involucrarse de manera especial y hacer más fácil la marcha.*

*A Justo por sus consejos oportunos y el aliento.*

*A mi amiga "Gota" por compartir nuevamente el "pan" y las penurias, por vencer otra batalla nuestra.*

*A Martha, Saro y Karel porque en los días más oscuros hicieron que llovieran cronopios, por hacer suya también esta tesis y "dejarme entrar".*

*A papi por su apoyo permanente, por no fallarme.*

*A mami por creer siempre que podía, a su luz alentadora.*

*A Gadlys y Martín que siempre estudiaron cuando más los necesité.*

*A mi hermana Anais una vez más y siempre... por su alegría mía y por mi alegría suya.*

*A mis otras hermanas Janet, Iris, Zoila, Leyda y Mily que siempre están.*

*...y benditas sean las manos que rectificaron nuestros errores.*

## Abreviaturas:

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADN- T</b>	ADN de transferencia
<b>EDTA</b>	Ácido etilén-diamino-tetracético (de sus siglas en inglés "Ethylene diamine tetra-acetic acid")
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>RCP</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (de sus siglas en inglés "Polymerase chain reaction")
<b>r.p.m.</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio (de sus siglas en inglés "Sodium dodecyl sulfate")
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil)-metilamina
<b>U</b>	Unidad
<b>FAA</b>	Formaldehído- Alcohol- Acido acético
<b>PAT</b>	Fosfinotricina acetil transferasa
<b>TCA</b>	Ácido tricloro acético
<b>PVPP</b>	Polivinil polipirrolidon
<b>ME</b>	$\beta$ -mercapto-etanol
<b>ATB</b>	Acido tiobarbitúrico
<b>DTT</b>	Ditio-treitol
<b>Km</b>	Antibiótico kanamicina
<b>Hgm</b>	Antibiótico higromicina
<b>PPT</b>	Fosfinotricina
<b>BIT</b>	Biorreactores de Inmersión Temporal
<b>LB</b>	Medio de cultivo Luria Bertani
<b>MS</b>	Medio de cultivo Murashige y Skoog
<b>PDA</b>	Medio de cultivo agar papa- dextrosa
<b>h</b>	Horas
<b>d</b>	días
<b>min</b>	minutos
<b>ANA</b>	Acido naftalen acético
<b>BAP</b>	Benzil amino purina
<b>Dicamba</b>	Acido 3.6-dicloro-2-methoxibenzoico
<b>BIT</b>	Biorreactores de inmersión temporal
<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>CAM</b>	Metabolismo ácido de las crasulacias

## SÍNTESIS

Mundialmente, la piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) es la especie económica más importante de la familia *Bromeliaceae*. La producción anual del 2006 alcanzó 18.2 millones de toneladas. Por lo tanto, programas de mejoramiento encaminados a perfeccionar el comportamiento agrícola general están justificados. Esta investigación se enfocó en el establecimiento de una metodología para la transformación genética del cv. Cayena lisa Serrana, mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Se demostró la factibilidad del uso de los Biorreactores de Inmersión Temporal para la selección de líneas transgénicas resistentes a fosfinotricina. El agente de selección fue efectivo a concentraciones menores en comparación con los frascos convencionales de micropropagación. Por otra parte, se evaluó la tolerancia de líneas transgénicas (*bar*, *quitinasa*, *AP24*) ante el herbicida FINALE® y la resistencia a *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. Se identificaron en aclimatización las líneas 90, 40, 44, 46 y 27 con tolerancia al herbicida; mientras las líneas 90, 79, 41, 1 y 20 mostraron protección frente al ataque del patógeno. Adicionalmente, se evaluó en campo la primera generación vegetativa de la línea promisoría 90. Se analizó su perfil proteómico, indicadores bioquímicos y caracteres agronómicos. En comparación con los testigos, las proteínas mayoritarias del proteoma de la línea 90 no variaron, y se mantuvo con 50 cromosomas. Se observaron diferencias estadísticas en cuanto a niveles de fenoles, clorofilas, proteínas; actividad fenilalanina amonio liasa, superóxido dismutasa, glutamina sintetasa; masa del fruto sin corona; altura de la corona; y altura y diámetro de la planta. Sin embargo, tales variaciones inesperadas no justifican el rechazo de la transgénesis como una herramienta importante para el mejoramiento genético de la piña.

## ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	4
2.1 Generalidades del cultivo de la piña.	4
2.2 Métodos para la transformación genética de plantas.	8
2.2.1 Transformación genética para la tolerancia a herbicidas.	16
2.2.2 Transformación genética para incrementar la resistencia patógenos.	19
2.3 Evaluaciones fenotípicas de plantas transgénicas y estudios de riesgos.	22
3. MATERIALES Y METODOS	26
3.0 Generalidades.	26
3.1 Desarrollo de una metodología para la transformación genética de la piña (cv. Cayena lisa Serrana) con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y un sistema de micropropagación por inmersión temporal.	26
3.1.1 Determinación del agente de selección.	27
3.1.2 Efecto de la cepa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y el tiempo de cocultivo en la actividad del gen reportero en callos embriogénicos de piña.	28
3.1.3 Evaluación de la cefotaxima en el control del <i>Agrobacterium tumefaciens</i> durante la regeneración de plantas de piña.	29
3.1.4 Producción de plantas transgénicas de piña que portan genes de interés agrícola.	30
3.2 Evaluación de la tolerancia al herbicida FINALE <sup>®</sup> y la actividad antipatogénica	32
3.2.1 Tolerancia al herbicida FINALE <sup>®</sup> en líneas transgénicas de piña en condiciones de aclimatización.	32
3.2.2 Actividad antipatogénica en la interacción piña- <i>Phytophthora</i> en condiciones de aclimatización.	33
3.3 Caracterización de plantas transgénicas.	34
3.3.1 Efectos secundarios bioquímicos de la transformación genética en plantas de piña en fase de aclimatización.	34
3.3.2 Efectos secundarios bioquímicos de la aplicación del herbicida FINALE <sup>®</sup> en plantas transgénicas de piña en fase de aclimatización.	36
3.3.3 Tolerancia al herbicida FINALE <sup>®</sup> , perfil proteómico, el número de cromosomas e indicadores bioquímicos y agronómicos en plantas transgénicas de piña en condiciones de campo.	37
4. RESULTADOS Y DISCUSION	45
4.1 Desarrollo de una metodología para la transformación genética de la piña (cv. Cayena lisa Serrana) con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y un sistema de micropropagación por inmersión temporal.	45
4.1.1 Determinación del agente de selección.	45
4.1.2 Efecto de la cepa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y el tiempo de cocultivo en la actividad del gen reportero en callos embriogénicos de piña.	48
4.1.3 Evaluación de la cefotaxima en el control del <i>Agrobacterium tumefaciens</i> durante la regeneración de plantas de piña.	51
4.1.4 Producción de plantas transgénicas de piña que portan genes de interés agrícola.	53

4.2	Evaluación de la tolerancia al herbicida FINALE <sup>®</sup> y la actividad antipatogénica.	60
4.2.1	Tolerancia al herbicida FINALE <sup>®</sup> en líneas transgénicas de piña en condiciones de aclimatización.	60
4.2.2	Actividad antipatogénica en la interacción piña- <i>Phytophthora</i> en condiciones de aclimatización.	64
4.3	Caracterización de plantas transgénicas.	69
4.3.1	Efectos secundarios bioquímicos de la transformación genética en plantas de piña en fase de aclimatización.	69
4.3.2	Efectos secundarios bioquímicos de la aplicación del herbicida FINALE <sup>®</sup> en plantas transgénicas de piña en fase de aclimatización.	73
4.3.3	Tolerancia al herbicida FINALE <sup>®</sup> , perfil proteómico, el número de cromosomas e indicadores bioquímicos y agronómicos en plantas transgénicas de piña en condiciones de campo.	79
5.	CONCLUSIONES	101
6.	RECOMENDACIONES	102
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	103



## 1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) es la especie económica más importante de la familia *Bromeliaceae*. La producción anual en el 2006 alcanzó la cifra de 18.2 millones de toneladas (FAOSTAT, 2008). En la actualidad, el mercado de fruta fresca y la producción industrial de la piña en el mundo ha tenido una transformación grande después que la corporación Delmonte introdujo la piña MD-2 a consumidores en los Estados Unidos y Europa oficialmente en 1996 (Bartholomew, 2009). No obstante, la Cayena lisa es una de las variedades que posee caracteres de elevada importancia agronómica como son los altos rendimientos y calidad de la fruta (Firoozabady *et al.*, 2006).

Los programas de mejoramiento genético de la piña se iniciaron en Hawai y similares proyectos de hibridación se desarrollan en otros países que incluye a Cuba (Benega *et al.*, 1996; Isidró, 2000; Pérez *et al.*, 2009). La Cayena lisa es uno de los progenitores fundamentales a consecuencia de su gran adaptabilidad y calidad del fruto como fruta fresca y para el procesamiento industrial. Se prioriza la obtención de nuevas variedades menos espinosas, asociado a otros caracteres que brinda este cultivar tales como la maduración temprana, forma del fruto, excelente sabor, textura poco fibrosa y coloración del fruto. A pesar de considerables esfuerzos, los nuevos híbridos que se han obtenido no superan de manera integral a la Cayena lisa (Davey *et al.*, 2007).

Las enfermedades y las plagas agrícolas representan problemas serios en la producción de este cultivo (Peña *et al.*, 1996; Kamoun, 2001; Chan *et al.*, 2003; Isidró *et al.*, 2003). La incidencia de virus, nemátodos, y la susceptibilidad a hongos tales como *Fusarium subglutinans* y al oomicete *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* constituyen las principales limitaciones agrícolas (Rodríguez *et al.*, 2002). Por otra parte, el control de plantas indeseables en las áreas de piña es otro de los retos que afronta el agricultor, ya que puede causar la pérdida del 60% del rendimiento. La piña es un cultivo perenne, pero su crecimiento en determinados períodos es lento y por tanto se requiere de adecuados manejos integrales (Peña *et al.*, 1996). Lo anterior, ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas para el manejo de enfermedades y plagas agrícolas basados en los avances de la resistencia sistémica inducida o adquirida (Riveros *et al.*, 2004).

El mejoramiento genético convencional ha contribuido a la solución de parte de estos problemas. Sin embargo, factores como el limitado conocimiento de la variabilidad del germoplasma existente y el tiempo para la obtención-selección de variedades por la vía de la hibridación tradicional, han permitido que se considere a la Ingeniería Genética como una herramienta para el mejoramiento vegetal de este cultivo (Davey *et al.*, 2007). Existen varios grupos de trabajo que en la actualidad desarrollan investigaciones básicas y aplicadas a partir del uso de la Ingeniería Genética, con especial interés en la transformación genética en la piña.

En Australia se han realizado investigaciones relacionadas con el control de la floración de la piña (Botella *et al.*, 2000). Por otra parte, se desarrollan metodologías encaminadas a lograr resistencia a la enfermedad de la pudrición del corazón de la piña (Graham *et al.*, 2000; Rohrbach *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2003). Smith *et al.* (2004) y Gómez-Lim y Litz (2004) realizaron revisiones del estado del arte y concluyeron que la mayoría de los trabajos de transformación de la piña están dirigidos a: lograr resistencia a plagas y enfermedades (bacteriales, virales, infección por insectos y nemátodos), mejoramiento de la calidad del fruto y control de la floración. Con el objetivo de lograr tolerancia al herbicida FINALE<sup>®</sup> se han transformado plantas de piña por Sripaoraya *et al.*, (2001; 2006). Un trabajo de investigación reciente aborda la transformación para la resistencia a nemátodos (Wang *et al.*, 2009).

Con estos antecedentes el presente trabajo está basado en la siguiente hipótesis: "La incorporación de combinaciones de genes vegetales foráneos (*glucanasa*, *quitinasa* y *AP24*) que codifican proteínas relacionadas con la patogenicidad y el gen *bar* como marcador de selección pudiera originar líneas transgénicas de piña mejoradas para el carácter resistencia a *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* y la tolerancia al herbicida FINALE<sup>®</sup>".

Para la comprobación de esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

1. Establecer una metodología para la transformación genética de la piña (cv. Cayena lisa Serrana) mediante *Agrobacterium tumefaciens*.
2. Evaluar la tolerancia de líneas transgénicas ante el herbicida FINALE<sup>®</sup> y la resistencia al patógeno *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*.
3. Caracterizar plantas transgénicas de piña que portan genes de interés comercial según el perfil proteómico, indicadores bioquímicos y caracteres agronómicos.

**Novedad científica:** Se desarrolló por primera vez en el mundo una metodología para la transformación genética de la piña. Esta metodología tiene la particularidad que utiliza por primera vez a los biorreactores de inmersión temporal (BIT) como una herramienta para la selección de brotes transgénicos resistentes al agente selectivo, en este caso el herbicida FINALE®. Como resultado por primera vez se producen y evalúan en Cuba líneas transgénicas de piña que portan genes que codifican para caracteres de interés comercial, en este caso la tolerancia al herbicida FINALE® y al ataque del patógeno *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. Además, esta investigación muestra la caracterización de plantas transgénicas de piña durante la aclimatización y el crecimiento en campo de la primera generación vegetativa.

**Valor práctico:** La metodología de transformación de la piña por *Agrobacterium tumefaciens* constituye una herramienta para el mejoramiento por Ingeniería Genética de esta especie. Las líneas transgénicas de mejor comportamiento ante los caracteres evaluados en esta tesis pueden ser utilizadas como progenitores en el programa de mejoramiento genético de la piña.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

### 2.1. Generalidades del cultivo de la piña.

La piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) es oriunda del centro sur de Brasil, norte de Argentina y Paraguay donde crece de forma silvestre. Durante la colonización española se introdujo en Europa (Coppens d'Eeckenbrugge y Leal, 2003). Pertenece a la familia *Bromeliaceae*, y es una planta monocotiledónea, xerofita, suculenta, terrestre, herbácea y perenne (Py *et al.*, 1987).

Las hojas son puntiagudas y rodean un tallo grueso. Estas se clasifican de acuerdo a su edad desde A hasta F. La hoja D es la que indica el estado fisiológico de la planta (Py *et al.*, 1987). El tallo es corto con una longitud máxima de 35 cm y un diámetro medio de 5.5 a 7 cm. Los entrenudos miden de 1 a 10 mm. En éste se encuentra el meristemo apical y los axilares; el meristemo apical está ubicado en la corona del fruto. También allí se encuentran yemas axilares, las yemas del tallo dan lugar a los órganos de propagación de las plantas. Los que surgen en la parte basal del tallo se denominan criollos; los que se desarrollan superiores a éstos, claveles; y cerca de la base del fruto, basales (Py *et al.*, 1987). Cada uno de estos propágulos vegetativos requiere un período diferente desde la plantación hasta la floración y cosecha del fruto; generalmente para los claveles de 13 a 15 meses y de 16 a 18 meses para la corona (Bartholomew *et al.*, 2003; Davey *et al.*, 2007).

La taxonomía de la piña ha sido compleja e inconsistente, y se ha basado fundamentalmente en su origen y evolución. Esta se reagrupa en el género simple de *Ananas*, teniendo en cuenta las características de la inflorescencia, la cual está fusionada en un fruto múltiple o sincarpio (Coppens d'Eeckenbrugge y Leal, 2003). Este género contiene dos especies nominadas *macrodontes* y *comosus* y cinco variedades denominadas *ananassoides*, *bracteatus*, *comosus*, *erectifolius* y *paraguazensis*. Esta clasificación elimina los cinco grupos nominados como Cayena, Reina, Española, Pernambuco y Perolera, propuestos por Py *et al.* (1987), la cual se basó fundamentalmente sobre características hortícolas (Davey *et al.*, 2007).

Las variedades de *A. comosus* mayormente son diploides, compuestas por 50 cromosomas pequeños, aunque existen plantas triploides, tetraploides y heteroploides, es altamente variable y por el tamaño grande del fruto es la principal piña de cultivo. Las variedades de piña para que sean comercialmente viables, deben ser altamente auto-estériles, pero pueden producir semillas cuando se plantan con otros cultivares. El programa de mejoramiento de la piña combina la

reproducción vegetativa con la reproducción sexual alógama, esta última proporciona la mayor variación genética (Duval *et al.*, 1998).

La floración se produce de forma natural inducida por días cortos y temperaturas bajas. En plantaciones comerciales, la inducción floral se realiza de forma artificial con la aplicación de acetileno, etileno, o productos liberadores de esta hormona (Bartholomew *et al.*, 2003). El fruto de la piña es no climatérico, eso significa que no tiene capacidad para autocatalizar el etileno durante la maduración; sin embargo, esta hormona está involucrada en los procesos de maduración (Davey *et al.*, 2007).

Los programas de mejoramiento genético de la piña se iniciaron en Hawai y similares proyectos de hibridación se han desarrollado en otros países que incluye a Cuba (Benega *et al.*, 1996; Isidrón *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2009). La Cayena lisa ha sido uno de los progenitores más favorecidos a consecuencia de su gran adaptabilidad y calidad del fruto, tanto como fruta fresca y posterior procesamiento industrial. Los especialistas en mejoramiento genético, han dado prioridad a la obtención de nuevos cultivares que son menos espinosos. Asociado a otros caracteres que brinda este cultivar como la maduración temprana y forma del fruto, este con excelente sabor, textura poco fibrosa y coloración. Sin embargo, a pesar de considerables esfuerzos, los nuevos híbridos que se han obtenido no superan a la Cayena lisa (Davey *et al.*, 2007).

El cultivar Cayena lisa se ha difundido por todo el trópico hasta convertirse en uno de los de mayor interés comercial. El 96% de las piñas que se empleaban para la industria provenían de este cultivar (Loeillet, 1996; Rohrbach *et al.*, 2000; Bartholomew *et al.*, 2003; Rohrbach y Johnson, 2003; Firoozabady *et al.*, 2006). Sin embargo, el mercado de fruta fresca y la producción industrial de la piña en el mundo ha tenido una transformación grande después que la corporación Delmonte introdujo la piña MD-2 a consumidores en los Estados Unidos y Europa oficialmente en 1996 (Bartholomew, 2009).

En la Cayena lisa el fruto es de tamaño medio (1.5- 2.5 kg), cilíndrico, formado por un gran número de frutos simples que se insertan en un haz central en posición de espiral, íntimamente soldados unos con otros. Su coloración externa es verdosa, tornándose amarilla en la base durante la madurez. Tiene un contenido de carotenos y xantofilas tres veces mayor que el de la Española roja. El jugo de color amarillo pálido, tiene un alto contenido de azúcares y de ácidos

comparado con otras variedades (Py *et al.*, 1987). En esta variedad la maduración es más notoria que en la MD-2 (Bartholomew *et al.*, 2003).

Dentro de los aspectos fisiológicos del cultivo, la temperatura es el principal factor climático que determina el crecimiento de las diferentes partes de la planta, y por consiguiente su desarrollo (Py *et al.*, 1987). En un estudio de los principales problemas relacionados con el avance del cultivo en la región del Caribe, se determinó que la tasa de crecimiento relativo es lenta, pues la temperatura afecta el crecimiento de la planta y la calidad del fruto. El rango de temperatura óptima para el cultivo osciló de 20 a 30°C (Duval *et al.*, 1998). Otros autores como Davey *et al.* (2007) señalan el rango de temperatura entre 16 y 32°C como óptima para el cultivo.

El cultivo de la piña, por su rusticidad, no es afectado por muchas enfermedades parasitarias o no parasitarias. Sin embargo, la enfermedad conocida como pudrición del corazón de la piña constituye una de las causas más importantes que afecta el desarrollo y provoca pérdidas considerables en su producción (Matos, 1987; Botella *et al.*, 2000; Rohrbach *et al.*, 2000; Gómez-Lim y Litz, 2004; Botella y Fairbairn, 2005; Firoozabady *et al.*, 2006).

En Cuba la pudrición del corazón de la piña provocada por *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* fue informada por primera vez por Bruner (1920), y más tarde por Seidel (1976) y Arnold (1986). Dentro de las enfermedades que afectan a este cultivo ésta se considera la de mayor importancia en el país. En la región de Ciego de Ávila, se estudió que en los meses de mayo a noviembre se manifiestan las mayores pérdidas causadas por *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. El oomiceto vive y se reproduce principalmente en el suelo, y ataca a las plantas susceptibles a nivel de la superficie. En ocasiones se originan pudriciones laterales del tallo y del pedúnculo por la introducción del oomiceto a través de heridas (Peña *et al.*, 1996; Isidró *et al.*, 2003).

Otro de los principales problemas que causa la pérdida del 60% del rendimiento, lo constituye un mal control de la vegetación indeseable. La piña es un cultivo que en su desarrollo vegetativo atraviesa períodos lentos de crecimiento hasta completar su madurez fisiológica (Peña *et al.*, 1996). Esta razón hace que las plantas indeseables de rápido crecimiento puedan competir por alimento, luz y humedad con mucha mayor eficiencia. Por otra parte, las raíces terrestres son superficiales y poco desarrolladas, por lo que las malezas pueden utilizar rápidamente los nutrientes. Un enyerbamiento fuerte puede cubrir las plantas, reducir las posibilidades de la luz y por tanto su capacidad fotosintética, lo que retrasa su crecimiento y alarga su ciclo productivo. Además las plantas indeseables son reservorios de plagas y enfermedades como las chinches

(*Dysmicoccus brevipes* (Cock) y el gusano blanco (*Phyllophaga* sp.), lo que repercute desfavorablemente en las plantaciones (Isidrón *et al.*, 2003).

La identificación de los tipos de malezas es imprescindible para definir la forma y momento para su control. En los suelos con alto nivel de enyerbamiento la aplicación de un herbicida total como el glifosato (4 L /ha) antes de preparar el terreno, sería favorable. En el cultivo de la piña, cuando se aplica, se debe esperar 15 d antes de iniciar las labores del suelo (Isidrón *et al.*, 1999). También es importante que en la primera etapa los vástagos recién plantados dispongan de humedad para su desarrollo, y esto favorece también la germinación de semillas de la vegetación indeseable. El uso de herbicidas pre emergentes permite que en esta etapa, crítica para el establecimiento de la planta, no haya competencia. Una vez establecida la plantación, el control químico de malezas se realiza normalmente después de 60 a 80 d y al inicio de la temporada lluviosa del verano (Peña *et al.*, 1996).

En el cultivo de la piña se utilizan diferentes herbicidas según la fase agrotécnica del cultivo. En la tabla 1 se presentan los diferentes herbicidas y concentraciones recomendadas en cada etapa del cultivo de la piña según Isidrón (2002).

**Tabla 1.** Herbicidas y concentraciones recomendadas para el cultivo de la piña

Nombre comercial	Nombre químico	Concentraciones por unidad área	Concentraciones para 20 L de aplicación foliar
<b>Herbicidas y concentraciones recomendadas durante la preparación del suelo.</b>			
Dalapon 80%	<b>Dalapon</b>	<b>12 -18 kg/ha</b>	1-2 kg
Gramoxone 24%	<b>Paraquat</b>	<b>3-12 L/ha</b>	0.250-1L
Millquat 27%			
Karmex 80%	<b>Diuron</b>	<b>5-7.5 kg/ha</b>	0.5-0.75 kg
Krovar 80%	<b>Bromacil/Diuron</b>	<b>5-7.5 kg/ha</b>	0.5-0.75 kg
Round-Up 42%	<b>Glyphosate</b>	<b>2-3 L/ha.</b>	1-2 L
<b>Herbicidas y concentraciones recomendadas durante la plantación.</b>			
Gesaprim 80%	<b>Atrazine</b>	<b>5-7.5 kg/ha</b>	0.5-0.75 kg
Karmex 80%	<b>Diuron</b>	<b>5-7.5 kg/ha</b>	0.5-0.75 kg
Krovar 80%	<b>Bromacil/Diuron</b>	<b>5-7.5 kg/ha</b>	0.5-0.75 kg
<b>Herbicidas y concentraciones recomendadas durante el período de crecimiento.</b>			
Gesapax 80%	<b>Ametrine</b>	<b>2.5-3.75 kg/ha</b>	0.25-0.4 kg
Gesapax Comb: 80%	<b>Ametrine/Atrazine</b>	<b>2.5-3.75 kg/ha</b>	0.25-0.4 kg
Fusilade Nabu 12.5%	<b>Fluazfopbulyl</b>	<b>200-250 mL/ha</b>	20-25 mLs
	<b>Sethoxydim</b>		
Karmex 80%	<b>Diuron</b>	<b>2.5-3.75 kg/ha</b>	0.25-0.4 kg
Krovar 80%	<b>Bromacil/Diuron</b>	<b>2.5-3.75 kg/ha</b>	0.25-0.4 kg
Frigate	<b>Surfactante</b>	<b>5 mL/L</b>	100 mL

## 2.2 Métodos para la transformación genética de plantas.

La transformación genética de una planta se define como la introducción "por cualquier vía" e integración estable en el genoma vegetal de información genética exógena, que da como resultado la adquisición por parte de la célula vegetal de una nueva información, la cual puede ser expresada o no (Birch, 1997).

Las metodologías para la transformación genética de plantas se clasifican en dos grandes grupos: 1- Métodos directos, donde la información genética deseada se introduce en la célula vegetal sin la necesidad de utilizar ningún vector biológico. 2.- Métodos indirectos, donde el segmento de ADN se introduce en la célula mediante un vector de origen biológico, el cual por mecanismos naturales es capaz de introducir esta información en la célula vegetal e integrarla en su genoma (Potrykus, 1990).

Los métodos de transformación directa fundamentan su aplicación en fenómenos físicos y químicos. Dentro de los más utilizados se encuentran: la electroporación de protoplastos (Fromm *et al.*, 1987) y células intactas (Arencibia *et al.*, 1995); la microinyección (Nehaus *et al.*, 1987); el empleo de la técnica de polietilenglicol (Shillito *et al.*, 1986); la transformación mediada por liposomas (Caboche, 1990) y la pistola de genes (Sanford, 1990). Todos estos métodos, excepto la pistola de genes utilizan los protoplastos como células diana, lo cual brinda algunas ventajas (Potrykus, 1990). Sin embargo, los mayores inconvenientes de estos métodos radican en la gran dificultad para la regeneración de plantas a partir de protoplastos, lo cual ha resultado en un proceso biológicamente difícil y casi siempre insatisfactorio, a excepción de algunas especies de plantas (Potrykus y Shillito, 1986; Zárata *et al.*, 2008).

En la transferencia directa de genes con el uso de la electroporación y el empleo de la técnica de polietilenglicol se han alcanzado altas frecuencias de transformación (Fromm *et al.*, 1987; Potrykus, 1990; Corazzaria *et al.*, 2000; De Vries *et al.*, 2003; Capodicasa *et al.*, 2004; Janyce *et al.*, 2005). El polietilenglicol es un agente que facilita tanto la toma de material extraño por los protoplastos vegetales, como su fusión favoreciendo así la generación de transformantes. Parece existir una relación directa entre la concentración de polietilenglicol y la frecuencia de transformación (Zárata y Verpoorte, 2007).



En la electroporación se someten los protoplastos a impulsos eléctricos de alto voltaje, se permeabiliza la membrana y se induce la formación reversible de poros permitiendo así la introducción de macromoléculas. Con la aplicación de este método se han alcanzado frecuencias de transformación superiores a las obtenidas por cualquiera de los otros métodos directos descritos (Di Cola *et al.*, 2005), también ha posibilitado la transformación estable del arroz y maíz, las que no habían podido lograrse previamente (Fromm *et al.*, 1987; Rhodes *et al.*, 1988; Shimamoto *et al.*, 1989; Gordon-Kamm *et al.*, 1990; Seyama *et al.*, 2007).

De todos los métodos directos, el bombardeo de partículas o aceleración de partículas ha demostrado tener mayor eficiencia y versatilidad en el campo de la ingeniería genética. Su uso ha permitido la introducción de ADN foráneo a la papaya, la cebada, el trigo, el arroz, la soya y el maíz, especies vegetales cuya transformación ha sido tradicionalmente difícil de lograr por otros métodos de transferencia de ADN (McCabe *et al.*, 1988; Kartha *et al.*, 1989; Fitch *et al.*, 1990; Oard *et al.*, 1990; Xiang Yang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003; Zeng-Yu *et al.*, 2004).

El método consiste en la aceleración de micropartículas cubiertas con ADN, a velocidades tales que permiten su paso a través de la pared y membrana celular y la integración de la información genética dentro de células de los tejidos bombardeados (Sanford, 1990; Altpeter *et al.*, 2005). La utilidad de éste método para la transformación de plantas radica en la obtención de eventos de transformación que involucran la recuperación de plantas transgénicas, gracias a que los tejidos bombardeados mantienen su integridad y capacidad de regeneración en el cultivo de tejidos (Sanford, 1990; Ye *et al.*, 1997; Rentao *et al.*, 2004; McCafferty *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007). Las condiciones óptimas para la transformación dependen de forma general del tipo de tejido bombardeado y de las circunstancias en que éste se lleve a cabo (Sanford, 1990).

En relación con la calidad de integración del ADN al genoma de la planta, estos métodos físicos presentan un grupo de desventajas en comparación con la transformación mediada por *Agrobacterium*. Entre ellas, las plantas transgénicas que se obtienen presentan un elevado número de copias, lo que puede redundar en un problema de estabilidad y cosupresión del ADN integrado, además de dificultar el análisis de los tejidos transformados y la obtención de plantas homocigóticas. Otra dificultad consiste en la imposibilidad de introducir fragmentos de ADN muy grandes debido a los rearrreglos genéticos que con frecuencia se producen en los transformantes (Kartzke *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2007; Bae *et al.*, 2008). Es por ello que los métodos directos han

quedado relegados a las plantas recalcitrantes donde *A. tumefaciens* no se ha podido utilizar (Kim *et al.*, 2007).

En la transformación genética pueden emplearse agentes biológicos que infectan de forma natural a las plantas y le transmiten parte de su información genética. *A. tumefaciens* es una bacteria del suelo que infecta de forma natural a los sitios heridos de las plantas. Puede transformar genéticamente células vegetales, con un segmento de ADN (ADN-T) a partir de un plásmido inductor de tumor (Ti-plásmido) con el resultado de la producción de la conocida como cresta o corona de gallo, el cual es un tumor vegetal (Zambryski, 1992).

La primera evidencia que indica a la bacteria como agente causal de esta enfermedad se remonta a más de 100 años y las primeras investigaciones estuvieron encaminadas a discernir los mecanismos involucrados en la inducción y formación del tumor. Las cepas virulentas de *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*, cuando interactúan con genotipos susceptibles, inducen la formación de tumores y la proliferación desordenada de raíces respectivamente. Estas cepas contienen un plásmido de más de 200 kb denominado plásmido-Ti (inductor de tumores) o plásmido-Tr (inductor de raíces), los cuales juegan un papel fundamental en la inducción del tumor o raíces respectivamente (Clarke *et al.*, 2008).

Entre las ventajas que ofrece la transformación mediada por *Agrobacterium* se encuentra la transferencia de segmentos de ADN relativamente largos con pocos rearrreglos, así como la integración de un número bajo de copias dentro de los cromosomas vegetales, lo que limita así los efectos de la cosupresión y la inestabilidad de los genes. Por otra parte, el proceso de transferencia del ADN-T hacia las células vegetales es un evento de transformación de célula a célula, lo que disminuye la obtención de mosaicismo (Enriquez-Obregón *et al.*, 1998). La inserción del ADN-T es dirigida, generalmente, hacia zonas activas del genoma donde se garantiza la expresión de los genes de interés (Okada *et al.*, 2002). La simplicidad, bajo costo y eficiencia del método garantizan que su uso sea efectivo para muchos cultivos (Arencibia *et al.*, 1998b). En la actualidad, la transferencia de genes mediada por *A. tumefaciens* es el método que tiene mayor utilización debido a su alto porcentaje de eventos de inserción de única copia y único locus (Clive, 2008)

El mecanismo de la transferencia de ADN desde *A. tumefaciens* ha sido descrito por numerosos autores (Nester *et al.*, 1984; Binns y Thomashow, 1988; Hooykaas y Beijersbergen, 1994; Zupan y Zambryski, 1995; Jia *et al.*, 2002; Stanton, 2003; Jianxiong *et al.*, 2005; Pu *et al.*, 2005; Pu y Eugene, 2006; Clarke *et al.*, 2008). Esta bacteria tiene la propiedad de transferir al núcleo de las células infectadas un segmento de ADN (ADN-T) que se encuentra en el plásmido inductor del tumor. Una vez integrado al genoma, el ADN-T se expresa y provoca la formación del tumor (Nester *et al.*, 1984; Binns y Thomashow, 1988; Zupan y Zambryski, 1995; Zhao, 2006). El ADN-T contiene dos tipos de genes, los oncogénicos que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de auxinas y citoquininas, que inducen el tumor y los genes que codifican para la síntesis de las opinas, compuestos que se obtienen de la condensación entre aminoácidos y azúcares. Estos compuestos los sintetiza la planta y los consumen las bacterias como fuente de carbono y nitrógeno.

Los genes responsables del catabolismo de las opinas, se encuentran localizados fuera de la región del ADN-T y también en ese lugar existe una región de genes responsables de la transferencia del ADN-T y su integración al núcleo de la célula vegetal. Existe además una región de genes encargada de la transferencia del ADN-T durante la interacción conjugada de los plásmidos bacteria a bacteria (Zupan y Zambryski, 1995).

Las cepas de *Agrobacterium* se clasifican según el tipo de opinas que sintetizan en cepas productoras de nopalinas, octopinas y agropinas. En diferentes estudios se ha demostrado que existen dos tipos básicos de plásmidos inductores de tumores, los de tipo nopalina y los de tipo octopina. Los primeros transfieren su ADN-T como un fragmento de simple cadena de 23 Kb, y está representado por el plásmido pTiC58. Los de tipo octopina como el plásmido pTiAch5 pueden transferir un segmento compuesto de dos fragmentos de 13.2 y 7.9 Kb o un solo ADN-T formado por alguno de los dos fragmentos (Fralely *et al.*, 1983). Durante la infección, el ADN-T de *A. tumefaciens*, se transfiere al núcleo de la célula vegetal y se integra en sus cromosomas. Dos secuencias repetidas de 25 pb bordean el ADN-T y actúan como señales *cis* para el aparato de transferencia (Zupan y Zambryski, 1995).

La región de la virulencia de 30 kb es reguladora y se organiza en seis operones, cuatro de ellos esenciales para la transferencia del ADN-T (*virA*, *virB*, *virD*, *virG*) y dos que garantizan una mayor eficiencia en la transferencia (*virC*, *virE*). Estos operones están estrechamente regulados y la

expresión solo ocurre en la presencia de células vegetales heridas (Zupan y Zambryski, 1995; Jeon *et al.*, 1998).

En la colonización del tejido vegetal por la bacteria, los elementos cromosomales tienen una función importante. Los loci *chvA* y *chvB* están involucrados en la síntesis y excreción de  $\beta$ -1, 2 glucanos (Cangelosi *et al.*, 1989); y el locus *chvE* es necesario para la asimilación de los azúcares y la mejora de la inducción de los genes *vir* (Cangelosi *et al.*, 1991). Por otra parte, el locus *cel* es responsable de la síntesis de las fibrillas de celulosa (Matthysse, 1987); el locus *pscA* (*exoC*) juega un papel importante en la síntesis de los glucanos cíclicos y los ácidos succinoglicánicos (Cangelosi *et al.*, 1991); y el locus *att* está involucrado en la síntesis de las proteínas de la superficie (Matthysse, 1987).

En la transferencia e integración del ADN-T al genoma de la célula vegetal se han definido los siguientes eventos: a) La proteína VirA detecta pequeñas cantidades de compuestos fenólicos liberados por los tejidos heridos. La fosforilación de esta proteína a VirG rige la activación de la transcripción de los genes *vir*. b) Las proteínas VirD1/D2 unidas, reconocen la secuencia borde de 25 pb y producen un endonucleótido de simple cadena seccionado en cortes. Estos cortes sirven como sitios iniciadores y terminadores de la cadena T. Esta cadena puede moverse a través de numerosas membranas y espacios celulares. c) La proteína VirE2 se une a la cadena-T. d) El complejo-T sale de la bacteria y atraviesa la pared celular. e) El complejo-T cruza la pared celular y llega al citoplasma. f) El complejo-T llega al núcleo y atraviesa la membrana nuclear. g) La cadena-T se integra a uno de los cromosomas de la planta (Zupan y Zambryski, 1995).

Hiei (1997) resume la infección de *Agrobacterium* a las células vegetales como la multiplicación de la bacteria en el tejido herido, el ataque a la pared celular, la transferencia del ADN-T a la célula vegetal y finalmente la integración dentro del genoma. Los genes del ADN-T se expresan en las células vegetales aún antes de la integración (Janssen y Gardner, 1989).

En el proceso de transferencia del ADN-T a las células vegetales hay tres evidencias experimentales de gran importancia práctica. Primero, la formación del tumor es el resultado final de la transferencia e integración del ADN-T y su posterior expresión. Segundo, el ADN-T es solamente transcrito en las células vegetales y no tiene ningún rol importante durante el proceso de transferencia. Tercero, cualquier ADN foráneo que se inserte entre las dos secuencias

repetidas de 25 pb, que bordean el ADN-T, independientemente de cuál sea su donante puede ser introducido en las células vegetales. Estas evidencias posibilitaron la construcción de los primeros vectores y sistemas bacterianos para la transformación de plantas (Hooykaas y Schilperoort, 1992; Hamilton, 1997; Torisky *et al.*, 1997).

La primera información sobre la expresión de genes foráneos en plantas transgénicas apareció a principios de la década de los 80 del pasado siglo (Herrera-Estrella *et al.*, 1983). Muchas de las características moleculares de este proceso eran desconocidas y aún lo son, a pesar de la claridad que hoy se tiene sobre algunos eventos moleculares que lo conducen (Vunsh *et al.*, 2007; Moeller y Wang, 2008; Ogaki *et al.*, 2008).

En la transformación de plantas, es preciso agregar una secuencia nucleotídica promotora, para que el gen sea expresado correctamente (es decir, traducido como un producto proteínico). La expresión de un gen es completamente dependiente de la presencia o no de un promotor adecuado. La acción del promotor va dirigida a aquellas partes de la planta o en aquellos instantes del desarrollo vegetal en que sea necesaria la expresión del gen que regula (Breitler *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008; Ohkama- Ohtsu *et al.*, 2008).

El promotor más usado en las plantas transgénicas es el gen 35S del virus del mosaico de la coliflor. Se trata de un promotor fuerte, con expresión constitutiva a lo largo de toda la vida de la planta y en todos sus órganos (Tung *et al.*, 2008). Para controlar la expresión en determinados momentos se han usado promotores de los genes productores de proteínas PR relacionadas con la patogenicidad. Son fáciles de inducir mediante daños mecánicos o señales químicas (Aguero *et al.*, 2005). Existen promotores de expresión diferencial en hojas, en raíz o en tallos. Dicha expresión es fácil de observar con el uso de genes delatores como el gen *Gus* (Carre y Kay, 1995; Ahn y Zimmerman, 2006; Ahn, 2008). Otros promotores son más específicos y responden a señales indicadoras en el medio interno o externo de la planta. Un ejemplo de un promotor que se induce por la luz es el promotor del gen *cab*, que codifica la principal proteína fijadora de clorofilas *a* y *b* (Padilla *et al.*, 2006).

El uso de *Agrobacterium*, para la transformación de plantas monocotiledóneas fue inicialmente rechazada debido, fundamentalmente, a la falta de pruebas que demostraran la integración y

expresión de los genes contenidos en el ADN-T. La única prueba irrefutable se presentó en *Asparagus officinalis* (Bytebier *et al.*, 1987).

La transformación genética mediada por *Agrobacterium*, en aquellas plantas que no eran su hospedero natural fue subestimada por algunos investigadores (Potrykus, 1990). En los inicios muchas monocotiledóneas no fueron susceptibles a la transformación mediada por *Agrobacterium* y fue precisamente el desarrollo de las técnicas directas de transferencia de genes quien favoreció la transformación en monocotiledóneas. Mediante la modificación de las condiciones de cultivo, previo o durante la infección con *A. tumefaciens*, se ha logrado transferir genes de la bacteria hacia varias de estas especies monocotiledóneas, las cuales habían sido consideradas fuera de su rango de hospedero natural (Arencibia *et al.*, 1998b). En la transformación de plantas, la no-formación de tumores no es indicativo de un fallo en la transferencia génica (Eady *et al.*, 2000).

Se han planteado varias hipótesis para explicar la resistencia que presentan la casi totalidad de las plantas monocotiledóneas a la infección con *A. tumefaciens*. Ellas son: a) la incapacidad de *A. tumefaciens* de infectar a las células vegetales o infectar muy poco. b) Poca interacción de la bacteria con la pared celular del vegetal (Rao *et al.*, 1982). c) Actividad reducida de los promotores de los genes del ADN-T (Graves y Goldman, 1986). d) Escasa producción de sustancias que inducen virulencia, o producción de otras que inhiben los genes *vir* (Usami *et al.*, 1988). e) Desbalance en la relación auxina-citoquinina en las células de monocotiledóneas (Binns y Thomashow, 1988). f) Exagerada respuesta al daño celular (Potrykus, 1990).

La transformación genética mediante *A. tumefaciens* se ha empleado en numerosas dicotiledóneas: Papa (*Solanum tuberosum*) (Gahan *et al.*, 2002), frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Arangao *et al.*, 2002), cítricos (*Citrus*) (Peña *et al.*, 1995; Peña *et al.*, 1997; Peña *et al.*, 2001), mango (*Mangifera*) (Gómez-Lim y Litz, 2004), aguacate (*Persea americana*) (Gómez-Lim y Litz, 2004). Este método también ha sido empleado para la modificación del genoma de monocotiledóneas por ejemplo en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Arencibia *et al.*, 1998a), arroz (*Oryza sativa*) (Momma *et al.*, 1999), canola (*Brassica napus*) (Shewmaker *et al.*, 1999), semillas de colza (*Brassica napus*) (Al-Kaff *et al.*, 2000b), en cebada (*Hordeum vulgare*) (Horvath *et al.*, 2001) y maíz (*Zea mays*) (Saxena y Stotzky, 2001; Shrawat y Lorz, 2006).

En la transformación de plantas monocotiledóneas, hay influencia de factores genéticos y fisiológicos, así como componentes físicos de la interacción bacteria-planta (Moeller y Wang, 2008). Yuji *et al.* (2007) informaron que tres hechos experimentales, tales como la inclusión de acetosiringona, glucosa y el pH del medio (pH 5.2) durante el cocultivo fueron los elementos claves para lograr la transformación eficiente en los cultivares de arroz del tipo japónica.

Shrawat y Lorz (2006) demostraron que varios factores afectaron la eficiencia de transformación del (*Zea mays*); y consideraron como los de mayor importancia los relacionados con la optimización de las condiciones de cocultivo, y la selección del tipo de explante. Por otra parte, Arencibia *et al.* (1998b) le dan gran importancia a la edad y el estado fisiológico del tejido de la planta. Otros, consideran como elementos de gran importancia el empleo de cepas supervirulentas y vectores super-infestivos (Zárate y Verpoorte, 2007).

Los genes exógenos clonados han de transferirse a la planta mediante un sistema de transformación genética previamente ajustado. Los requerimientos esenciales en este sistema para la obtención de plantas transgénicas son: a) disponibilidad de un tejido vegetal que sirva como punto de partida y a su vez esté formado por células competentes para la regeneración de plantas; b) un método para introducir ADN dentro de las células con capacidad regenerativa y c) un procedimiento para seleccionar y regenerar plantas transformadas con una frecuencia satisfactoria (Moeller y Wang, 2008). La eficiencia de este sistema depende en gran medida de la presión de selección que ejerza el agente seleccionado sobre el tejido transformado (Enriquez-Obregón *et al.*, 1998).

La primera información sobre la transformación genética de la piña mediada por *A. tumefaciens* fue realizada por Firoozabady *et al.* (1997). El tejido embriogénico de Cayena lisa fue cocultivado con la cepa C5851 que contenía un vector binario del gen *als* y *nptII* que confieren tolerancia al herbicida clorsulfuron y a la neomicin fosfotransferasa respectivamente. Se obtuvieron alrededor de 30 líneas a partir de callos con estructuras embriogénicas por gramo de masa fresca. La transformación fue confirmada por análisis histoquímico *gus* y pruebas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa e hibridación Southern.

Sripaoraya (2001) usó la transformación mediada por *A. tumefaciens* cepa 1065 con el vector que contenía los genes *gus* y *nptII* en suspensiones celulares embriogénicas de la piña var. Phuket.

Aunque se observaron regiones gus positiva en el tejido inoculado, no fue posible la selección exitosa de transformantes.

La transformación mediada por *A. tumefaciens* cepa C58 que porta el vector binario con los genes *surB* y *nptII* que confieren resistencia a clafuron y neomicin fosfotransferasa respectivamente fue desarrollada en *Cayena lisa* por Firoozabady *et al.* (2006). Los autores obtuvieron 50-120 líneas transgénicas por cada gramo de callos con estructuras embriogénicas.

Las técnicas de transformación de plantas constituyen herramientas útiles para el mejoramiento genético de la piña. La necesidad de encontrar métodos cada vez más eficientes que permitan la selección y la regeneración de las plantas transformadas, así como la caracterización biológica de los regenerantes en su interacción con el medio ambiente resultan aspectos de gran importancia para la utilización de las líneas transgénicas como progenitores, lo que constituye uno de los principales objetivos del presente trabajo.

### **2.2.1 Transformación genética para la tolerancia a herbicidas.**

Un herbicida es una sustancia química u organismo biológico (bioherbicida), usado para matar, disminuir o inhibir completamente el crecimiento de las plantas indeseables. Existen dos tipos de herbicidas, los selectivos, que solo atacan a determinados tipos de plantas y los no selectivos, que controlan todo tipo de cultivos (Cromwell *et al.*, 2005).

En la actualidad se han desarrollado estrategias de tolerancia a dos tipos de herbicidas, el glifosato y el glufosinato de amonio. La mayor parte de las semillas que hoy se comercializan son resistentes a estos herbicidas post-emergentes de amplio espectro y de baja persistencia en el medio ambiente (Clive, 2008). Estos compuestos actúan sobre las rutas de síntesis de aminoácidos (Confalonieri *et al.*, 2000). El glifosato constituye un herbicida donde la base química es la N-fosfometilglicina, que inhibe la acción de una enzima clave en la síntesis de aminoácidos aromáticos (Al-Kaff *et al.*, 2000b).

El glufosinato de amonio se considera un herbicida de contacto con efecto sistémico vía floema, cuya acción se extiende a un amplio espectro de plantas indeseables tanto anuales como perennes (Hu *et al.*, 2005). Este se emplea después que emerge la cosecha o para el control total de la vegetación en tierras no cultivadas. También es utilizado para desecar las cosechas. El glufosinato de amonio es absorbido por las hojas y en menor medida por los tallos verdes. No se



absorbe por los tallos cuya corteza esté suberificada, ni tampoco por las raíces, la materia activa sufre una rápida biodegradación en contacto con el suelo (Accotto *et al.*, 2005).

El glufosinato de amonio es el ingrediente activo del herbicida FINALE<sup>®</sup>, contiene intrínsecamente al isómero L- de la fosfinotricina (L-PPT), responsable de la actividad herbicida. También contiene el isómero D que es inactivo para la actividad herbicida. El mecanismo primario de acción del glufosinato de amonio sobre las plantas es inhibir la enzima glutamina sintetasa (Mulwa *et al.*, 2006). Esta enzima cataliza la síntesis de la glutamina a partir de glutamato de amonio y juega un papel central en el metabolismo del nitrógeno de las plantas, principalmente en el proceso de transformación de amoníaco en nitrógeno orgánico. El herbicida FINALE<sup>®</sup> cuando se aplica en plantas provoca la acumulación del amonio a concentraciones fitotóxicas, y como consecuencia el tejido vegetal se daña hasta provocar la muerte de la planta. Por tanto, la eficiencia del herbicida es mayor en las plantas en activo crecimiento. Este compuesto fue registrado en EE.UU. para ser usado como herbicida en 1993 por la compañía Hoechst Celanese (Madduri y Snodderley, 2007).

Por otra parte, las especies de *Streptomyces hygroscopicus* y *Streptomyces viridochromogenes*, bacterias del suelo gram (+), producen antibióticos tripéptidos (bialafos, L-fosfinotricinil-L-alani-L-alanina). La glutamina sintetasa de estas bacterias es también sensible a la L-fosfinotricina que se identificó en estos tripéptidos, por tanto las bacterias tienen respuestas defensivas que neutralizan la acción de la fosfinotricina. Esta ventaja se aprovechó para aislar de *Streptomyces hygroscopicus* el gen de tolerancia a L-fosfinotricina (PPT), glufosinato (una sal de amonio) y a bialafos (Thompson *et al.*, 1987).

La fosfinotricina se sintetiza químicamente como glufosinato de amonio, inhibidor irreversible de la glutamina sintetasa. Esta enzima ha sido aislada de bacterias, hongos, plantas y animales, existen diferencias con respecto a propiedades físicas y regulatorias, en el tipo de enzimas de plantas y bacterias. En las plantas, la glutamina sintetasa juega un papel importante en el metabolismo del nitrógeno en general. Es la responsable de la destoxicación del amonio que se produce durante la reducción del nitrato, la fotorespiración y degradación de aminoácidos en las células vegetales (D'Halluin *et al.*, 1992).

Para entender el mecanismo de inhibición de la glutamina sintetasa por la L-fosfinotricina, es necesario describir el mecanismo de la reacción que cataliza la glutamina sintetasa. Durante la

catálisis se forma un complejo cuaternario de glutamina sintetasa-glutamato-ATP-  $Mg^{2+}$ , dentro de este complejo, el fosfato obtenido a partir de ATP, se transfiere al glutamato y se forma el complejo glutamina sintetasa-glutamato fosfato-amonio-ADP-  $Mg^{2+}$ . El desplazamiento del fosfato de glutamina por amonio produce la L-glutamina. La L-fosfinotricina reemplaza el L- glutamato en el sitio activo de la glutamina sintetasa. La constante de inhibición de la fosfinotricina como inhibidor reversible de la glutamina sintetasa ( $K_i$ ) es de 18  $\mu$ M comparado con esta misma constante con relación al sustrato (glutamato) cuya  $K_M$  es de 3 mM. La unión de la enzima al inhibidor (L- fosfinotricina) es significativamente mejor que al sustrato, y se le atribuye a la habilidad del fosfonitrato de simular parcialmente el estado de transición de la reacción catalizada por la enzima. Además la L-fosfinotricina experimenta la fosforilación en el fosfonitrato hidroxil que da lugar a un complejo cuaternario de glutamina sintetasa-L-fosfinotricinil-fosfato-ADP-  $Mg^{2+}$ . La disociación de los ligandos dentro de los complejos es muy lenta, por lo que esta estrecha unión provoca una inhibición aparentemente irreversible de la enzima (Padgette *et al.*, 1989).

La inactivación metabólica de la fosfinotricina le confiere a toda la planta tolerancia al herbicida FINALE<sup>®</sup>. La enzima de inactivación es la fosfinotricina acetil transferasa que cataliza la conversión de fosfinotricina a N-acetil-L-fosfinotricina en presencia de acetil CoA como un co-sustrato. La enzima fosfinotricina-N-acetiltransferasa, acetila el amonio libre del grupo de la fosfinotricina, y por lo tanto causa su inactivación (Padgette *et al.*, 1989).

Este herbicida también tiene gran aceptación en la biotecnología agrícola, a partir del descubrimiento de dos genes *bar* o *pat*. El gen *bar* codifica para la enzima fosfinotricina acetiltransferasa (PAT), y confiere tolerancia a la fosfinotricina. La inserción de estos genes heterólogos en plantas ha permitido el desarrollo de cultivos transgénicos. Es usado en las transformaciones de varios cultivos, ya sea como gen de interés agrícola o de selección en los procesos de transgénesis (Zeng-Yu *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2005).

El gen *bar* como marcador de la selección presenta como ventaja principal que la selección de plantas potencialmente transgénicas se puede realizar en condiciones *in vitro* y *ex vitro*. Estas pruebas se realizan con mínimos costos y experiencia técnica (D'Halluin *et al.*, 1992). Varios autores han obtenido plantas transgénicas tolerantes a la fosfinotricina (McCabe *et al.*, 1988; McCabe *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 1999; Horvath *et al.*, 2001; Skipsey *et al.*, 2005). El uso de la fosfinotricina y cultivos tolerantes al mismo, puede contribuir a una considerable reducción en la

cantidad de herbicidas utilizados en comparación con las prácticas actuales (Edward y Dixon, 2000; Skipsey *et al.*, 2005). Por otra parte, la enzima fosfotricin acetiltransferasa ha sido ampliamente estudiada y tiene un excelente perfil de bioseguridad (Herouet *et al.*, 2005).

Los cultivos que son mejorados genéticamente para buscar tolerancia a herbicidas, seguido por los cultivos que son resistentes a insectos, representan la avanzada en la biotecnología agrícola, explotada de manera exitosa a nivel mundial (Skipsey *et al.*, 2005). Sin embargo, por ser la piña uno de los cultivos tropicales mayoritarios de forma comercial, existen muy pocos estudios genéticos moleculares y genes aislados (Gómez-Lim y Litz, 2004).

En este cultivo, se informa sobre la existencia de líneas transgénicas resistentes al herbicida FINALE<sup>®</sup>. (Sripaoraya *et al.*, 2000; Sripaoraya *et al.*, 2001) mediante el bombardeo a la base de las hojas de brotes micropropagados con el empleo del plásmido AHC25 portador de los genes *bar* y *gus*, ambos manejados por el promotor ubiquitina de maíz. La integración y expresión del gen heterólogo se confirmó por análisis de Southern y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real respectivamente. Las plantas regeneradas *in vitro* y en condiciones de casas verdes mostraron tolerancia al herbicida. La generación de plantas de piña tolerantes al herbicida FINALE<sup>®</sup> facilitaría la eficiencia al control de malezas en este cultivo tropical ampliamente explotado de una manera, menos tóxica y biodegradable que el bromacil, el cual es utilizado actualmente por la mayoría de los productores (Davey *et al.*, 2007).

### **2.2.2 Transformación genética para incrementar la resistencia a patógenos.**

Las aplicaciones de técnicas en la Biología Molecular y la Biotecnología de las plantas para estudiar las interacciones hospedero-patógeno han estado dirigidas a la identificación y clonaje de numerosos genes involucrados en la respuesta defensiva de la planta seguida por la infección patogénica. Esto incluye genes que expresan proteínas, péptidos o compuestos antimicrobianos que son directamente tóxicos al patógeno o reducen su crecimiento *in situ*. También producto de genes que directamente inhiben la virulencia patogénica o incremento de los genes de defensa estructural, que directa o indirectamente activan la respuesta defensiva general de la planta, y genes de resistencia involucrados en la respuesta hipersensitiva y en la interacción con factores de avirulencia. La introducción y expresión de esos genes en especies de plantas transgénicas han demostrado que el desarrollo del patógeno fúngico puede ser significativamente reducida. La

extensión de la reducción de la enfermedad, varía con la estrategia empleada, así como con las características del hongo patogénico (Punja, 2001).

La expresión de productos de genes que son directamente tóxicos al patógeno o que reducen su crecimiento incluyen las proteínas PR o proteínas relacionadas con la patogénesis, tales como las enzimas hidrolíticas quitinasas y glucanasas, proteínas antifúngicas como las osmotinas y traumatinas, los péptidos antimicrobianos, tioninas, defensinas y lectinas, las proteínas que inactivan los ribosomas y las fitoalexinas (Punja, 2001).

Los oomicetes se diferencian de los hongos, entre otras características moleculares, morfológicas y fisiológicas, por el hecho de que prácticamente carecen de quitina en su pared celular y no sintetizan esteroides. Debido a que la mayoría de los fungicidas que tradicionalmente se usan tienen como blanco de acción la síntesis de quitina y esteroides, son ineficientes contra los oomicetes. Otros pesticidas basados en la fenilamida metalaxil, con acción específica contra la ARN Polimerasa 1, dejaron de ser efectivos pocos años después de su introducción debido al desarrollo de resistencia por parte de muchas especies patogénicas de *Phytophthora* (Parra y Ristaino, 2001), por lo que no existen pesticidas efectivos contra estos patógenos (Attard *et al.*, 2008). Al tener en cuenta lo anterior, la transformación genética de plantas se presenta como una de las estrategias más prometedoras para lograr cultivos resistentes a *Phytophthora* sp. La expresión de quitinasas y glucanasas es la estrategia que más se ha utilizado para el control de la actividad fúngica en plantas. Las quitinas y los glucanos comprenden los principales componentes de la pared celular en algunos grupos de hongos, de allí que la sobre expresión de estas enzimas en las células de las plantas causa la lisis de la hifa y reduce el crecimiento del hongo (Mauch y Staehelin, 1989).

El rol específico de estas hidrolasas en la resistencia a enfermedades ha tenido dificultad para probar en plantas no transgénicas debido a la presencia de estas en tejidos resistentes y susceptibles y además su expresión puede ser también inducida por estrés ambiental y la senescencia de las plantas (Punja y Zhang, 1993). Sin embargo, en un amplio rango de especies de plantas transgénicas, se ha determinado que la expresión de quitinasas ha provocado una reducción en el desarrollo y tamaño de la lesión, así como el número de lesiones cuando eran expuestas a la infección por hongo, incluyen aquellos con un amplio espectro de hospedero como *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani*. La expresión de quitinasa no fue efectiva contra otros

patógenos como *Cercospora nicotiana*, *Colletotrichum lagenarium* y *Pythium* sp., lo cual es indicativo de la diferencia existente en la sensibilidad del hongo a la quitinasa (Punja, 2001).

Taira *et al.* (2005) purificaron y caracterizaron tres quitinasas de hojas de piña, de ellas solo una, la PL Chi-B exhibió fuerte actividad antifúngica frente a *Trichoderma viride*. PL Chi-C mostró ligera actividad antifúngica en la presencia de NaCl y esta actividad incrementó con el aumento de la concentración de la sal. Los resultados de este estudio permiten relacionar las altas concentraciones de sales, las que pudieran decrecer la interacción iónica e incrementar la interacción hidrofóbica. Si se considera que la piña es una planta tipo CAM adaptada a fuerte luminosidad y altas temperaturas, la fortaleza iónica del tejido puede ser alta dependiendo del ambiente, de allí que PL Chi-C abundante en las hojas de la piña puede jugar un rol defensivo contra los hongos bajo altas condiciones de fuerza iónica.

Una construcción que contiene genes *quitinasas* de arroz y *glucanasa* de alfalfa y el gen *bar* se introdujeron por bombardeo de proyectil en la gramínea *A. palustris* Huds. La integración de estos genes en el genoma de ocho líneas transgénicas fue confirmada por hibridación Southern, mientras que en cinco líneas se evaluó el nivel de transcripción por el Northern para *quitinasas* pero no para *glucanasa*. Las líneas transgénicas resistentes a glufosinato exhibieron también resistencia al patógeno fúngico *Sclerotinia homeocarpa* y *Rhizoctonia solana* cuando una solución de 0.5% de FINALE<sup>®</sup> fue asperjada tres h antes a la inoculación del hongo. Cuando no se aplicó el herbicida, las cinco líneas transgénicas que expresaron el gen de *quitinasa* no resistieron al ataque del patógeno (Wang *et al.*, 2003).

Para analizar la función del gen Gns1, que codifica para glucanasa, en la resistencia a enfermedades se caracterizaron plantas transgénicas de *Oryza sativa* L. *japónica*. Cuando las plantas transgénicas se inocularon con el hongo virulento *Magnaporthe grisea*, desarrollaron algunas lesiones de tipo resistentes sobre la hoja inoculada acompañado de la activación de genes de defensa del tipo PR-1 y PBZ1, en comparación con las plantas control. La expresión de estos dos genes de defensa fue drásticamente incrementado después de la aparición de lesiones fenotípicas (Nishizawa *et al.*, 1999).

En el cultivo de la piña Rodríguez *et al.* (2002), establecieron una metodología para la selección *in vitro* de plantas de piña con resistencia a *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. Determinaron la

concentración de zoosporas, la técnica de inoculación y el momento de evaluación. Las mejores condiciones para esta selección se lograron con  $10^8$  zoosporas/mL y la técnica de inoculación por punción. Se realizó una caracterización histopatológica de la enfermedad en hojas de vitroplantas de la variedad Cayena lisa Serrana; a las 144 h se observaron los signos y posteriormente la muerte total. Con esta metodología se logró diferenciar *in vitro* cultivares que manifiestan en campo resistencia o susceptibilidad.

Por otra parte, Borrás *et al.*, (1999) probaron varias concentraciones de filtrado de cultivo de *Fusarium subglutinans* y testaron sobre la multiplicación *in vitro* de plántulas y la regeneración de callos de piña. Los cultivares que se evaluaron fueron los resistentes Perolera y Primavera, y los susceptibles Perola y Cayena lisa. El filtrado del hongo redujo la organogénesis y la regeneración de callos en las variedades susceptibles, no así en las resistentes. Los resultados mostraron el potencial del filtrado del hongo como método para la selección *in vitro* de piña resistente al patógeno.

### **2.3 Evaluaciones fenotípicas de plantas transgénicas y estudios de riesgos.**

Los productos obtenidos a partir de organismos vivos genéticamente modificados (OVGM) deben atravesar procesos de control que incluyen múltiples instancias antes de llegar al mercado. Uno de los niveles más importantes es la evaluación de la "equivalencia sustancial", según la cual se busca comparar el OVGM con su par no transgénico en busca de similitudes o diferencias en cuanto a distintas características (caracteres genotípicos, fenotípicos y factores nutricionales) (OECD, 1993). Además de estos datos, distintas cuestiones referidas a los genes introducidos se evalúan para completar el estudio para la aprobación del evento transgénico. Dentro de ellas se encuentran: la posibilidad de la transferencia de las nuevas secuencias de ADN insertadas hacia células del organismo consumidor o bacterias de su tracto gastrointestinal, la posible toxicidad de los productos proteicos producidos o la posible alergenicidad de las proteínas producidas (Kimber *et al.*, 1999; Bahieldin *et al.*, 2005).

La transgénesis de distintas especies indica que es necesario obtener un elevado número de eventos de transformación para encontrar alguno con alto nivel de expresión en campo (Al-Kaff *et al.*, 2000a; Quilis *et al.*, 2007). Arencibia *et al.* (1998a) y Carmona *et al.* (2005), realizaron estudios

a nivel de campo en líneas transgénicas de caña de azúcar y demostraron que algunas construcciones genéticas se silencian frecuentemente, mientras que otros se expresan estables.

Riemens (2008) emprendió estudios sobre la previsibilidad de los efectos de los herbicidas sobre las plantas cultivadas en condiciones de campo, aseguró que influye la etapa de desarrollo de las plantas y la eficacia del herbicida, así como la sensibilidad individual de la planta y las concentraciones subletales en la biomasa. Akama *et al.* (2005) evaluaron la tolerancia al herbicida FINALE® en plantas transgénicas y no transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Los resultados mostraron que las plantas testigos sufrieron daños foliares intensos, y murieron una semana después de la aplicación del herbicida. Confalonieri *et al.* (2000) realizaron estudios de tolerancia al herbicida FINALE® en cuatro líneas transgénicas de *Populus alba* L. bajo condiciones *ex vitro*. Ellos observaron que a las dos semanas después de la primera aplicación del producto no se apreciaron daños en las líneas transgénicas tratadas con 6 L/ha; sin embargo, las plantas tratadas a altas concentraciones mostraron lesiones necrosadas en algunas hojas. Las plantas testigo, a los 30 d después de la aplicación del herbicida, mostraron lesiones necrosadas en todas las partes de la planta, atrofia del meristemo apical, inhibición del crecimiento y alta mortalidad.

Bae *et al.* (2008) establecieron un protocolo de transformación de la *Zoysia* (*Zoysia japonica*) mediante el uso de *A. tumefaciens*. El gen *bar* fue introducido para conferir tolerancia al herbicida FINALE®. Al comparar esta especie con la de tipo salvaje mostró tolerancia al herbicida, su siembra en parques y jardines permitió el control de otras plantas indeseables. El estudio incluyó pruebas selectivas, efectos ambientales, de biodiversidad y se analizó el cruzamiento genético. Los resultados indicaron que no hubo riesgos significativos que mostraran variación de las líneas transgénicas comparados con su parental en condiciones de campo.

En el cultivo de la remolacha se realizaron ensayos prácticos en condiciones de campo. Se analizaron dos líneas de este cultivo transformadas genéticamente. Una con tolerancia al herbicida glufosinato y la otra, al glifosato. Las diferencias encontradas estuvieron dadas por el porcentaje de respuesta al herbicida entre las líneas, que proporcionaron una amplia gama de situaciones para estimar los riesgos de transferencia horizontal. El 86% de las semillas colectadas de las flores de la remolacha cosechadas en campo se mostraron resistentes al herbicida. Por otra parte, se analizó el flujo del polen de las plantas transformadas hacia campos vecinos, se detectó el escape del transgen a 112 m de distancia con respecto al donante transgénico (Darmency *et*

*al.*, 2007). Otros estudios se han dirigido a profundizar en la transferencia horizontal de genes del polen de plantas transgénicas resistentes a herbicidas, hacia una variedad silvestre que tenga compatibilidad sexual (Mohr y Tebbe, 2007).

Pascual *et al.* (2008) transformaron el álamo (*populus alba* L.) con el propósito de sobreexpresar la glutamina sintetasa. La inhibición de esta enzima bloquea la fotorespiración, y da como resultado el agotamiento del aminoácido en la hoja, como consecuencia ocurre la muerte celular. El álamo transgénico sobreexpresa la enzima citosólica de pino, aumenta las capacidades fotosintéticas y fotorespiratorias. En el ensayo práctico se observó un mayor crecimiento y una mejor calidad fisiológica de las hojas. La caracterización del álamo transgénico con la expresión de la enzima demostró una tolerancia apreciable al herbicida FINALE®. Después de los 30 d de aplicado el herbicida el crecimiento de las plantas transgénicas fue cinco veces mayor al de las plantas testigo.

Por otra parte, Sakamoto y Murata (2001) sugirieron que para estabilizar y proteger las membranas frente a un estrés abiótico en plantas transgénicas, se puede sobreexpresar la enzima glicinbetaina sintetasa. Esta enzima protege la actividad metabólica y fisiológica de los cloroplastos y estabiliza la estructura cuaternaria de los complejos proteicos tales como el fotosistema II. Estos autores observaron que en las plantas no transformadas se produjo una reducción de los contenidos de clorofila *a*, *b* y totales después de la aplicación del herbicida FINALE®, lo que asociaron con la acción de la fosfinotricina y la acumulación de amonio. Esto provoca afectaciones en las estructuras de los cloroplastos con pérdida de pigmentos clorofílicos (Metz *et al.*, 1998). Otros autores determinaron que todas las plantas que son sometidas a un estrés, muestran alteraciones bioquímicas relacionadas directamente con los niveles de síntesis de etileno. Frente a situaciones de daño celular esta respuesta se vincula con la disminución en el contenido de las clorofilas (Scarpari *et al.*, 2005).

Los avances en el campo de la proteómica, permiten su uso como una herramienta para los análisis de los cultivos transgénicos (Wakasa *et al.*, 2006). El estudio de la equivalencia sustancial de los alimentos transgénicos antes de ser liberados al mercado, la detección de proteínas tóxicas o alergénicas, pueden estar precedidos por investigaciones proteómicas (Brumbarova *et al.*, 2008). Hacer estudios comparativos del proteoma de plantas transformadas y testigo ha permitido detectar efectos indeseados de la transformación genética (Hjerno *et al.*, 2006). Tal es el caso de



perfiles proteómicos de líneas isogénicas de una variedad de maíz donde se detectaron aproximadamente 100 proteínas con diferencias en los niveles de expresión diferencial. Se ha sugerido que el nuevo producto obtenido requiere profundizar los análisis proteómicos para comprobar las diferencias y semejanzas basadas en el principio de equivalencia sustancial (Egidi, 2008). El uso de la proteómica les permitió a Fraser *et al.* (2007) establecer patrones de comparación en el estudio de plantas modelos, que se expusieron a condiciones estresantes con el fin de identificar la expresión de proteínas específicas como respuesta a señales.

Algunas proteínas introducidas en las plantas son las que pueden provocar respuestas alergénicas. Este es el caso de una soya que expresaba una proteína rica en metionina a partir de la nuez del Brasil y que nunca fue aprobada para las fases de desarrollo, debido a que se comprobó el efecto alergénico sobre pacientes alérgicos a la nuez del Brazil (Nordlee *et al.*, 1996). Por otra parte, el maíz Startlink de Aventis, generó un debate acerca de la posibilidad de que se pudiera comportar como un alérgeno en humanos. A pesar de que no quedó comprobado este efecto en ninguno de los estudios realizados, este maíz sólo se ha utilizado para el consumo animal hasta que no se demuestre que es totalmente seguro (Prakash, 2001).

Los estudios realizados a plantas transgénicas de piña han estado dirigidos al control de la floración, la calidad del fruto, la resistencia a nemátodos, virus y a la enfermedad del corazón negro (Botella *et al.*, 2000; Graham *et al.*, 2000; Rohrbach *et al.*, 2000; Bartholomew *et al.*, 2003; Sanewski, 2004; Wang *et al.*, 2009). Algunos autores como Sripaoraya *et al.* (2006) han hecho referencia a plantas cultivadas en condiciones experimentales de campo. Estos autores informaron la respuesta de plantas de piña transformadas de una variedad tailandesa que mostraron tolerancia al herbicida FINALE<sup>®</sup> bajo condiciones de campo. La evaluación de estas plantas de piña se limitó a un reducido número de caracteres agronómicos. Sin embargo no se ha abordado el estudio del fenotipo de plantas y frutos transgénicos de piña con tolerancia al herbicida FINALE<sup>®</sup> y resistencia al oomicetes *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.0 Generalidades**

El trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Mejoramiento Genético del Centro de Bioplantas de la Universidad de Ciego de Ávila (UNICA). El experimento de campo se realizó en la Estación Experimental "Dr. Juan Tomás Roig" de esta institución, situada a 21°47' de latitud Norte y 78°17' de longitud Este.

En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el utilitario *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, 2002) versión 11.5.1 sobre Windows (Copyright SPSS Inc., 1998-2002). Se comprobó el ajuste a la distribución normal de los datos de cada tratamiento (Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas (Levene). En algunos casos fue necesario hacer transformaciones de datos, los que aparecen aclarados en la sección de Resultados y Discusión. Se desarrollaron pruebas paramétricas: ANOVA de un factor, ANOVA y Tukey. La probabilidad máxima de cometer error de tipo I fue 0.05.

#### **3.1 Desarrollo de una metodología para la transformación genética de la piña (cv. Cayena lisa Serrana) con *Agrobacterium tumefaciens* y un sistema de micropropagación por inmersión temporal.**

##### **Material vegetal**

Las plantas de piña de la variedad Cayena lisa Serrana se seleccionaron del Banco del Germoplasma de piña de Ciego de Ávila, localizado en la Estación Experimental "Dr. Juan Tomás Roig" del Centro de Bioplantas. La toma de los explantes y la desinfección se realizó por el procedimiento descrito por Daquinta y Benega (1997).

Se partió de coronas de frutos seleccionados, a los se les extrajeron las yemas axilares con una porción de tejido basal. Se realizó el lavado de los explantes seleccionados con detergente comercial auxiliándose de una esponja, con el objetivo de eliminar las suciedades que se adhieren en las partes donde estaban insertadas las hojas. Se enjuagaron con abundante agua corriente. Esta operación se realizó de tres a cuatro veces, dejándolas en agua corriente por espacio de 30 min. Luego se introdujeron en agua antioxidante (150 mg/L de ácido cítrico). La desinfección se realizó dentro del flujo laminar, los troncos de corona se sumergieron en una solución de hipoclorito

de sodio al 0.5% durante 20 min. Posteriormente se lavaron con agua desionizada estéril con antioxidante. A continuación se procedió a una segunda desinfección con la misma concentración de hipoclorito de sodio durante 10 min. Se realizaron cuatro lavados con agua desionizada estéril de 5 min cada uno. Las yemas se mantienen en agua desionizada estéril con antioxidante hasta el momento de la implantación. Se implantaron en el medio de cultivo que contenía sales MS (Murashige y Skoog, 1962) 100 mg/L de mio- inositol, 0.1 mg/L de tiamina HCl, 30 g/L de sacarosa, enriquecido con 1 mg/L de BAP y 1 mg/L ANA. Las yemas se incubaron en una cámara de luz artificial de 25 a 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  flujo de fotones fotosintéticos, fotoperíodo de 16 h luz/ 8 oscuridad y temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ .

A los 45 d después de la implantación, los brotes se transfirieron a un medio de cultivo de multiplicación que contenía la misma base del medio de cultivo de implantación suplementado con 2.1 mg/L de BAP y 0.3 mg/L de ANA. La proliferación de los brotes se realizó durante tres meses, con dos subcultivos. Las condiciones de incubación fueron similares a las mantenidas en la fase de implantación.

Como explantes para la formación de callos se utilizaron las tres hojas más jóvenes de los brotes, después de un segundo subcultivo. La parte basal de las hojas se colocaron en placas de Petri que contenían el medio de cultivo MS suplementado con 2.5 mg/L de Dicamba y 0.5 mg/L de BAP, 30 g/L de sacarosa y agar 7 g/L (Daquinta *et al.*, 1994) y fueron incubados en condiciones de oscuridad. Todos los medios de cultivo se ajustaron a pH 5.7 antes de ser esterilizados en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  y  $1.2\text{ kg/cm}^2$  durante 15 min. Los antibióticos y el agente de selección utilizados durante los experimentos se esterilizaron mediante filtros hidrofílicos (0.2  $\mu\text{m}$ ).

### **3.1.1 Determinación del agente de selección.**

Con el objetivo de evaluar la susceptibilidad del explante ante diferentes agentes de selección se probaron tres antibióticos: higromicina (hgm), kanamicina (km) y la fosfotricina (PPT), el cual constituye el principio activo del herbicida comercial FINALE<sup>®</sup>. Los brotes *in vitro* de piña se formaron a partir de callos con estructuras embriogénicas. Estos brotes fueron los explantes para la posterior fase de multiplicación. Durante la fase de multiplicación se emplearon dos sistemas de micropropagación, el convencional (Daquinta y Benega, 1997) y los biorreactores de inmersión temporal (BIT), según lo establecido por Escalona *et al.* (1999).

Los tratamientos experimentales consistieron en la combinación de los sistemas de propagación convencional o en BIT con el uso del medio de cultivo de multiplicación suplementado con diferentes concentraciones del agente de selección expresadas en mg/L: hgm (10, 20, 30, 40, 50); km (25, 50, 75, 100, 125); PPT (2.5, 5.0, 7.5). En todos los casos se utilizó un tratamiento testigo sin agente de selección. El número de muestras para cada tratamiento fue de 15 brotes, lo cual corresponde a tres repeticiones con cinco explantes cada una. Cada explante consistió en un agregado de dos brotes iniciales. La evaluación del coeficiente de multiplicación en función del agente de selección se realizó a los 45 d para el caso de la micropropagación convencional. Para el caso de la micropropagación en los BIT la evaluación se realizó a los 30 d. La implementación de los BIT se realizó según lo descrito por Escalona *et al.* (1999) y esencialmente consistieron en un tiempo de inmersión de 4 min y una frecuencia de 3 h. En ambos casos se mantuvo las condiciones de luminosidad de 25 a 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de flujo de fotones fotosintéticamente activos, una temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$  y un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 de oscuridad.

### **3.1.2 Efecto de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* y el tiempo de cocultivo en la actividad del gen reportero en callos embriogénicos de piña.**

Con el objetivo de evaluar la cepa At2260 (pIG121Hm) de *A. tumefaciens* y su actividad transitoria en callos con estructuras embriogénicas de piña cv. Cayena lisa Serrana, se diseñó el siguiente experimento. Se utilizó una cepa de *A. tumefaciens* que el plásmido contiene los genes de resistencia a kanamicina (*nptII*), resistencia a higromicina (*hph*) y el gen reportero GUS-intron (Ohta *et al.*, 1990; Hiei *et al.*, 1994). Ambos bajo el control del promotor 35S(CaMV).

El cultivo se realizó a partir de colonias aisladas inoculadas en erlenmeyers (100 mL) con 50 mL de medio de cultivo líquido Luria Bertani (LB) (Bertani, 1951), compuesto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl, pH=7.0, se adicionó acetosiringona (100  $\mu\text{mol/L}$ ). El crecimiento de los cultivos se realizó en un agitador orbital a 200 rpm,  $28^\circ\text{C}$ , en la oscuridad durante 24 h. El cultivo de At2260 (pIG121Hm) en el medio de cultivo se suplementó con carbenicilina (100 mg/L), estreptomina (100 mg/L) y rifampicina (50 mg/L).

Para el cocultivo se utilizó suspensión de la cepa de *A. tumefaciens* con absorbancias ( $\text{DO}_{620\text{nm}}$ ) entre 0.9 y 1. Paralelamente se seleccionaron callos con estructuras embriogénicas de piña cv. Cayena lisa Serrana después de 10-15 d en un cuarto subcultivo. Antes de ser infectados con *A.*

*tumefaciens* los callos se tamizaron por una malla de 2000  $\mu\text{m}$  para aumentar la superficie de contacto tejido vegetal-células bacterianas, además de producir heridas que inducen la virulencia del *A. tumefaciens* (Arencibia *et al.*, 1998a).

La infección se realizó con aproximadamente 1 g de callos que se sumergieron en volumen de 5 mL de *A. tumefaciens*, durante 10 min, en placas de Petri. Posterior a la infección los callos se lavaron con agua destilada estéril y se secaron con papel de filtro estéril. El cocultivo se realizó en medio de cultivo MS durante 0, 24, 48 y 72 h, en frascos de cultivo que se mantuvieron en la oscuridad a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . Se evaluó el mejor tiempo en que el *A. tumefaciens* inserta los genes heterólogos en el genoma de la piña. En todos los casos el tratamiento testigo consistió en 1 g de callos no infectados con *A. tumefaciens*. Estos experimentos fueron repetidos tres veces.

La determinación de la actividad transitoria se realizó mediante el método histoquímico GUS según el procedimiento propuesto por Jefferson (1987). Las células transformadas deberán tomar el color azul lo cual es indicativo de la expresión de la  $\beta$ -glucuronidasa. Para esta evaluación los callos cocultivados (1 g) en cada tratamiento así como los testigos, se sumergieron en tubos Eppendorf que contenía 1 mL de sustrato X-gluc. Posteriormente se incubaron en la oscuridad a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 h. La evaluación se realizó con el auxilio de un estereomicroscopio y los resultados se expresaron como porcentaje, el cual se calculó tomando en consideración el número de puntos azules (unidades de expresión transitoria) por gramo de callos.

### **3.1.3 Evaluación de la cefotaxima en el control del *Agrobacterium tumefaciens* durante la regeneración de plantas de piña.**

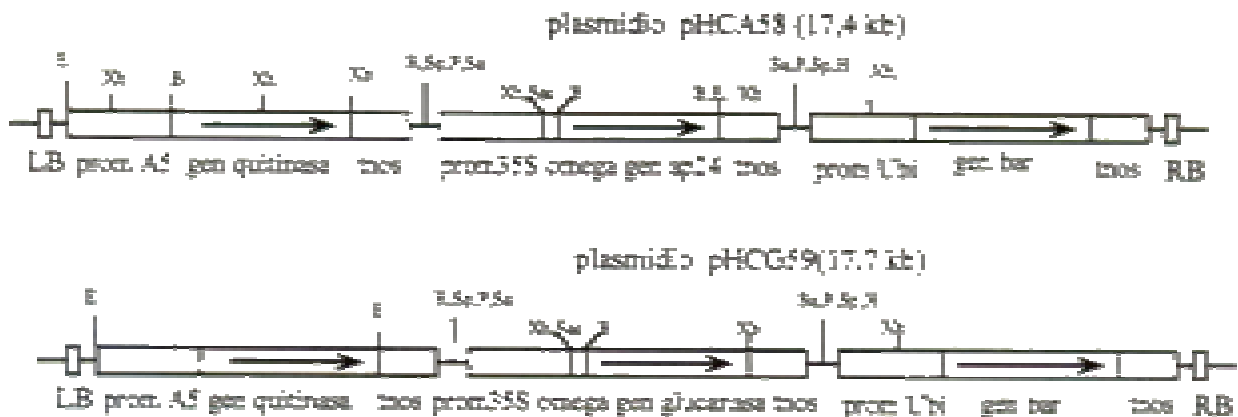
Con el propósito de determinar la concentración de cefotaxima capaz de controlar el crecimiento del microorganismo, una vez concluido el tiempo de cocultivo tejido vegetal-bacteria y que no afecte drásticamente la regeneración del material vegetal infectado se realizó el siguiente experimento. Como explantes se utilizaron callos con estructuras embriogénicas provenientes de hojas de plantas *in vitro* de piña. Las condiciones de cultivo fueron las mismas descritas en el acápite 3.1. Los callos se seleccionaron después de 10-15 d del cuarto subcultivo. La infección se realizó durante 10 min mediante inmersión de los explantes en una suspensión de *A. tumefaciens* D.O 0.9-1. El cocultivo se realizó en el mejor tiempo determinado en el acápite 3.1.2. Los callos cocultivados con *A. tumefaciens* se transfirieron a medio sólido de regeneración de embriones (sales MS con 100 mg/L de mio- inositol, 0.1 mg/L de tiamina HCl, 30 g/L de sacarosa, 0.5 mg/L de

BAP y 150 mg/L de ácido cítrico) (Daquinta y Benega, 1997). Los tratamientos experimentales consistieron en las diferentes concentraciones de cefotaxima suplementadas al medio de cultivo de regeneración: 0, 200, 400, 600 mg/L. El testigo no suplementado con cefotaxima se sometió al mismo procedimiento de regeneración. Las condiciones de regeneración fueron: luminosidad de 25 a 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  flujo de fotones fotosintéticos, fotoperíodo de 16 h luz/ 8 oscuridad y temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . La evaluación se realizó a los 45 d y se consideraron las siguientes variables: número de plantas, contaminación visible con *A. tumefaciens* y contaminación detectada en medio de cultivo líquido LB sin antibióticos.

### 3.1.4 Producción de plantas transgénicas de piña que portan genes de interés agrícola.

- **Construcciones genéticas.**

Se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* At2260 con dos construcciones genéticas (pHCA58 y pHCG59) que portan combinaciones de los genes *quitinasa*, *glucanasa* y AP24 para la resistencia a enfermedades fungosas y el gen *bar* para la tolerancia a la fosfinotricina, principio activo del herbicida comercial FINALE®. Ambos plásmidos fueron gentilmente aportados por el Dr. Lázaro Hernández García del Laboratorio de Interacción Planta-Microorganismos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de la Habana. El esquema de ambas construcciones aparece en la figura 1.



**Figura 1.** Representación de las regiones T-ADN utilizadas en la transformación genética. pA5: promotor híbrido compuesto del amplificador OCS, gen de la actina del arroz Exón/Intrón/Exón, inicio de la transcripción desde el promotor CaMV35S.p35S (long): p35S simple, 1.37 kb extendido corriente arriba desde el sitio de transcripción. Es esperada la dirección vacuolar de ambas enzimas a partir de su propio péptido señal y el propéptido C-terminal. La quitinasa madura es de 289 a.a. (32.1 KDa). La AP24 madura es de 207 a.a (23.0) kDa). La glucanasa madura es de 314 a.a (35.7 kDa). H: *Hind* III, P: *Pst* I, E: *Eco*RI, B: *Bam*HI, As: *Sal* I, K: *Kpn* I, Xb: *Xba* I, Sm: *Sma* I, Xh: *Xho* I. Nota: No se muestran los sitios de restricción internos en los genes codificantes.

A partir de las mejores condiciones establecidas en los anteriores acápite se procedió al escalado de la transformación con la utilización de los plásmidos pHAC58 y pHCG59 que contienen los genes de interés comercial.

Para cada experimento se seleccionaron del cuarto subcultivo 6 g de masa fresca de callos con estructuras embriogénicas. Los callos se tamizaron por mallas de 2000  $\mu\text{m}$  y posteriormente infectados mediante inmersión en 15 mL de *A. tumefaciens* (D.O 0.9-1) durante 10 min. Después de tres lavados con agua destilada estéril las muestras se secaron en papel de filtro estéril. El cocultivo se realizó en medio de cultivo de callogénesis establecido por Daquinta *et al.* (1994), se mantuvo durante 24 h a la oscuridad y temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . Los experimentos se repitieron seis veces para cada construcción genética.

Los callos infectados se transfirieron a medio de cultivo de regeneración de plantas suplementado con 200 mg/L de cefotaxima. Los cultivos se mantuvieron durante seis semanas a condiciones de luminosidad de 25 a 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  flujo de fotones fotosintéticos, un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 oscuridad y temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ .

Los brotes regenerados por embriogénesis somática se transfirieron a Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) que contenían medio de multiplicación suplementado con cefotaxima 200 mg/L y el agente de selección fosfinotricina (PPT) 2.5 mg/L. La multiplicación selectiva en BIT se realizó durante cuatro semanas en cámara iluminada a una temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , en las siguientes condiciones: tiempo y frecuencia de inmersión de 4 min cada 3 h, con un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 oscuridad, luminosidad de 25 a 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  flujo de fotones fotosintéticos.

- **Caracterización molecular de líneas resistentes a PPT.**

#### ***Determinación de la integración del transgen bar mediante reacción en cadena de la polimerasa (RCP).***

Se seleccionaron tres plantas provenientes de cada uno de los aglomerados (grupo de brotes constituidos entre 5 y 7 unidades) resistentes a PPT en los BIT. Cada aglomerado se consideró una línea transgénica. Se extrajo ADN genómico a partir de un gramo de material vegetal (hojas) de estas líneas supuestamente transgénicas según el método descrito por Dellaporta *et al.* (1983). La calidad y concentración del ADN se chequearon en gel de agarosa al 0.8%. Se utilizaron los cebadores 5'CGA GAC AAG CAC GGT CAA CTTC 3' y 5'AAA CCC ACG TCA TGC CAG TTC 3' que amplifican aproximadamente 450 pb correspondiente a una región del gen *bar* y al terminador

tNOS3'. Las condiciones para la RCP fueron: 1µg de ADN total; 100 pM de cada cebador; 250 mM de cada dNTP; 1X Buffer Taq Pol (PROMEGA) y 1U Taq Pol (PROMEGA). El programa fue de 3 min a 94°C, 1 min a 50°C y 1 min a 72°C. Posteriormente 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C y 1 min a 72°C, y por último se mantuvo a 72°C por 10 min. Se utilizó como control positivo de la reacción el plásmido pAHC25 el cual contiene al gen *bar* bajo las señales del promotor Ubil de maíz y el terminador tNOS3'. Como control negativo se utilizó ADN de plantas de la variedad Cayena lisa Serrana provenientes del mismo procedimiento de cultivo de tejidos, pero sin infección con *A. tumefaciens*. Los productos amplificados se tiñeron con EtBr 0.5 mg/ml en gel de agarosa al 0.8%. Como patrón de peso molecular se utilizó el marcador comercial 1Kb *ladder* (PROMEGA).

### **Análisis Southern blot genómico.**

Se seleccionaron cinco líneas transformadas resistentes a PPT en los BIT que se mostraron positivos a la presencia del gen *bar* mediante RCP. Un total de cinco plantas de cada línea se seccionaron en tres partes: basal, media y superior. Se utilizó 1 g de material vegetal para la extracción del ADN genómico de cada sección de las plantas según el método descrito por Dellaporta *et al.*, (1983). De cada muestra se digirió 10 µg de ADN total con la enzima *BamHI*. Los productos de las digestiones se separaron en un gel de agarosa 0.8% y se transfirieron a membranas Hybond N<sup>+</sup> según las recomendaciones del productor AMERSHAM (U.K). La prehibridación se desarrolló en tampón 5XSSPE, 5X de la solución de Denhardt's, 0.5% de SDS y ARNt (100 ng/mL), durante una hora a 65°C. Las condiciones de hibridación se desarrollaron según Sambrook *et al.* (1989). Como sonda de hibridación se utilizó el fragmento de 540 pb correspondiente al gen *bar* obtenido de la digestión *PstI* del pHAC58. El marcado radioactivo de la sonda se realizó con  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP según Sambrook *et al.* (1989). Como control positivo se utilizó 10 pg del fragmento de 540 pb (*bar*) obtenido de *PstI*/pHAC58. Como control negativo se utilizaron plantas de Cayena lisa Serrana no transformadas.

## **3.2 Evaluación de la tolerancia al herbicida FINALE<sup>®</sup> y la actividad antipatogénica.**

### **3.2.1 Tolerancia al herbicida FINALE<sup>®</sup> en líneas transgénicas de piña en condiciones de aclimatización.**

Cada aglomerado de plantas de piña resistentes a PPT en los Sistemas de Inmersión Temporal se consideró originario de un evento de transformación independiente. Se evaluaron 100 líneas supuestamente transgénicas (50 de la construcción pHCA58 y 50 de la construcción pHCG59) que mostraron resistencia *in vitro* al agente de selección. Se utilizaron plantas de Cayena lisa Serrana



sin transformar como tratamiento testigo. La aclimatización de las plantas se realizó en el área protegida para plantas transgénicas de piña cumpliendo los requerimientos de la Licencia de Liberación Ambiental Controlada 65/02 otorgada por el Centro de Seguridad Biológica. Cada línea transformada y el testigo incluyeron 30 plantas, divididas en tres réplicas de 10 plantas. La distribución de las líneas en cada réplica se realizó al azar. El experimento incluyó plantas no transformadas en los bordes. Se utilizaron bandejas plásticas con sustrato Zeolita + cachaza (v/v), el volumen de sustrato por planta fue de 82 cm<sup>3</sup>, la irrigación automatizada por microaspersión se realizó durante 25 s cada 30 min y una iluminación de 458 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Las atenciones culturales del cultivo se realizaron según lo establecido por la metodología de Yanes *et al.* (2000). A los 30 d después de plantadas en la fase de aclimatización, las plantas que no supervivieron se sustituyeron por réplicas que paralelamente se mantuvieron bajo las mismas condiciones experimentales.

A los 90 d se aplicó el herbicida FINALE<sup>®</sup> a la concentración de 2% (v/v) de la solución acuosa del producto comercial FINALE<sup>®</sup>, con un nebulizador, según lo recomendado por Bayer CropScience (2005). Transcurridos 30 d después de la aplicación del herbicida FINALE<sup>®</sup>, se evaluó el porcentaje de supervivencia en cada tratamiento (línea).

### **3.2.2 Actividad antipatogénica en la interacción piña-*Phytophthora* en condiciones de aclimatización.**

Este experimento se realizó con el objetivo de caracterizar la actividad antipatogénica en las líneas transgénicas de piña durante la interacción con *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* en condiciones de aclimatización. Se utilizaron plantas replicadas de las 100 líneas transgénicas de piña que mostraron tolerancia *in vitro* al PPT. Se utilizaron 15 plantas (cinco repeticiones de tres plantas) por cada tratamiento (línea supuestamente transgénica). Se utilizaron un total de 15 plantas para cada testigo, Cayena lisa Serrana sin transformar (testigo negativo) y *Bromelia pinguin* (testigo positivo), para la resistencia a esta enfermedad en piña (Isidró *et al.*, 2003). El experimento se realizó en bandejas con el sustrato sustrato Zeolita + cachaza (v/v), el volumen de sustrato por planta fue de 82 cm<sup>3</sup>, la irrigación automatizada por microaspersión se realizó durante 25 s cada 30 min y una iluminación de 458 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Las atenciones culturales del cultivo se realizaron según lo establecido por la metodología de Yanes *et al.* (2000). El experimento se realizó en el periodo Mayo-Junio 2006 en condiciones controladas de casas de adaptación según la Licencia de Seguridad Biológica B/CA-L(15)06).

La cepa de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* fue aislada de las áreas de la Empresa Piña, Ciego de Avila. Se tomaron hojas que presentaban los síntomas típicos de la enfermedad, las lesiones se lavaron en agua corriente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% (v/v), durante tres min, luego se pasaron por alcohol al 70% (v/v) y se lavaron en agua destilada estéril. Las muestras se colocaron en placas con medio de cultivo agar PDA y se incubaron a 28°C durante 48 h a la oscuridad, el micelio observado se transfirió a placas con medio de cultivo agar jugo V8 para obtener un cultivo puro del patógeno. Se comprobó la identidad de la cepa mediante RCP con cebadores de secuencias repetitivas específicos de esta especie. Las plantas se inocularon artificialmente mediante punción en la base de las hojas que posteriormente se sumergieron en una solución de *P. nicotianae* var *parasitica* con 10<sup>8</sup> zoosporas/mL según metodología establecida por Rodríguez *et al.* (2002).

A los 30 d posteriores a la inoculación se evaluó el porcentaje de supervivencia de las plantas con síntomas típicos de la enfermedad (lesión en la base de las hojas, cambio de coloración y olor fétido) y plantas muertas.

### **3.3 Caracterización de plantas transgénicas.**

#### **3.3.1 Efectos secundarios bioquímicos de la transformación genética en plantas de piña en fase de aclimatización.**

Para conocer los efectos secundarios bioquímicos de la transformación genética, se seleccionaron algunos indicadores bioquímicos que están asociados a un amplio espectro de rutas metabólicas importantes, tales como la respuesta al estrés y la fotosíntesis. Se diseñó el siguiente experimento, en el cual se utilizaron 60 plantas *in vitro* de una línea supuestamente transgénica (línea 90) y 60 plantas *in vitro* de Cayena lisa Serrana sin transformar como tratamiento testigo. Se transfirieron al área de aclimatización protegida para plantas transgénicas de piña. Las atenciones culturales durante la adaptación del cultivo se realizaron según lo establecido por la metodología de Yanes *et al.* (2000), tal como se describe en el acápite 3.2.1. Las plantas estuvieron divididas en tres réplicas de 20 individuos y se utilizaron plantas no transgénicas en los bordes.

Se realizó la evaluación de la supervivencia, la altura y la masa fresca de las plántulas a los 0, 15 y 30 d. En cada momento de evaluación, se colectaron hojas y se colocaron en nitrógeno líquido para los posteriores análisis bioquímicos: malondialdehído, otros aldehídos, fenoles solubles y ligados a las paredes celulares, contenido de pigmentos clorofílicos (*a*, *b* y totales), actividad de

enzimas peroxidadas, y contenido total de proteínas. Las evaluaciones bioquímicas se realizaron por réplica experimental y cada análisis se repitió tres veces.

El contenido de malondialdehído y otros aldehídos se evaluó por el procedimiento descrito por Heath y Packer (1968). Las hojas se maceraron en nitrógeno líquido (0.1 g), se mezclaron con 1.4 mL de agua destilada, y se agitaron brevemente. Se adicionaron 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico 0.5% (v/v; en ácido tricloroacético 20% (v/v), y las muestras se incubaron en un baño termostataado a 100°C durante 25 min. Luego de enfriarlas en hielo, se centrifugaron a 756 g, por 10 min. Se midió la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro UV visible Phamacia LKB-Ultrospec III ( $A_{455}$  nm,  $A_{532}$  nm). La absorbancia no específica del producto de la reacción se midió a 600 nm, y se sustrajo de la absorbancia máxima a 532 nm para las mediciones del malondialdehído, y a 455 nm para otros aldehídos. Para el cálculo de la concentración de malondialdehído se utilizó un coeficiente de extinción de 155 1/mmol·L·cm y para los otros aldehídos de 45.7 1/mmol·L·cm (promedio de los coeficientes de extinción del propanal, butanal, exanal, y propanal-dimetilacetal) a 532 nm. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol/g}$  de masa fresca.

El contenido de fenoles solubles y ligados a las paredes celulares se determinó según Gurr *et al.* (1992). Las muestras de hojas (0.1 g) se maceraron en nitrógeno líquido y luego se adicionó 0.5 mL de metanol. Las muestras se agitaron en un *vortex* y se centrifugaron a 12 100 × g, durante 15 min. El precipitado se sometió a dos ciclos adicionales de extracción con metanol, con 250  $\mu\text{L}$  cada uno hasta completar 1 mL de extracto. El sobrenadante se colectó siempre y se consideró como la fracción de los fenoles solubles. El precipitado se incubó con 0.25 mL de hidróxido de sodio 2 mol/L durante 16 h a 70°C. Se adicionó 0.25 mL de ácido clorhídrico (2 mol/L) después de la incubación. Las muestras se centrifugaron a 12 100 × g, durante 15 min). El precipitado se descartó y el sobrenadante se consideró como el reservorio de los fenoles ligados a las paredes celulares. Con el objetivo de cuantificar los niveles de fenoles solubles y ligados a las paredes celulares, 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante se mezclaron con 980  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu, y las muestras se incubaron durante 5 min. Se adicionó bicarbonato de sodio (600  $\mu\text{L}$ , saturado con hidróxido de sodio 0.1 mol/L) y transcurridos 60 min, se determinó la absorbancia a 725 nm. El contenido de fenoles se expresó en mg de fenoles/g de masa fresca de la hoja, referidos a una curva patrón de ácido clorogénico ( $\epsilon=0.0044$  1/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL} \cdot \text{cm}$ ).

El contenido de pigmentos clorofílicos se determinó según el método de Porras (1991). Se maceraron 100 mg de hojas en nitrógeno líquido y posteriormente se adicionaron 0.5 mL de

acetona al 80% (v/v). Las muestras se centrifugaron a  $12\ 100 \times g$  y  $4^{\circ}C$  durante 15 min. Se colectó el sobrenadante y se evaluó la absorbancia a 647 nm y 664 nm. El contenido de clorofila *a* se calculó:  $\text{Clorofila } a = 13.19 \cdot \text{Absorbancia}_{664\text{nm}} - 2.27 \cdot \text{Absorbancia}_{647\text{nm}}$ . El contenido de clorofila *b* se determinó como:  $\text{Clorofila } b = 22.10 \cdot \text{Absorbancia}_{647\text{nm}} - 5.26 \cdot \text{Absorbancia}_{664\text{nm}}$  y el contenido total de pigmentos clorofílicos se obtuvo al sumar  $7.93 \cdot \text{Absorbancia}_{664\text{nm}} + 19.53 \cdot \text{Absorbancia}_{647\text{nm}}$ .

La actividad peroxidasa se determinó según el método de Pascual (1983). Se maceraron las hojas (0.1 g) en nitrógeno líquido. La extracción se realizó con solución amortiguadora tris-HCl (0.01 mol/L, pH 7.0). La mezcla de la reacción incluyó: 0.1 mL de extracto de hojas, 1 mL de solución amortiguadora tris-HCl (0.01 mol/L), 0.15 mL de guayacol (100 mmol/L) y 20  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno. Se evaluó la absorbancia a 470 nm cada 15 s durante tres min. El promedio de la variación de la absorbancia de la sección lineal de la curva se tomó en consideración para estimar la actividad peroxidasa. En cada determinación se tuvo en cuenta la reacción espontánea en el tiempo de los sustratos guayacol y peróxido de hidrógeno. La actividad enzimática guayacol peroxidasa fue expresada como unidades (U)/g de masa fresca de hoja, donde 1 unidad corresponde a 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato transformado en 1 min.

La actividad enzimática se calculó como el cociente de la variación de la absorbancia medida en el tiempo de ensayo con respecto a la variación del tiempo, referidos al coeficiente de extinción molar del guayacol ( $5570 \cdot 10^{-6} \text{ l}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}$ ). El volumen de cubeta fue de 1270  $\mu\text{L}$  y el volumen de enzima 100  $\mu\text{L}$ .

La concentración de proteínas se determinó según Bradford (1976). Las hojas (0.1 g) se maceraron en nitrógeno líquido. La extracción se realizó con solución amortiguadora tris-HCl (0.01 mol/L, pH 7.0). El extracto de hojas (0.1 mL) se mezcló con 1.0 mL de reactivo de Bradford. Se evaluó la absorbancia a 595 nm. El contenido de proteínas se expresó en mg de proteínas/g de masa fresca de hojas, referido a una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA).

### **3.3.2 Efectos secundarios bioquímicos de la aplicación del herbicida FINALE® en plantas transgénicas de piña en fase de aclimatización.**

Con el objetivo de conocer las diferencias bioquímicas más relevantes entre plantas transgénicas y no transgénicas después de la aplicación del herbicida, se realizó el siguiente experimento. Se utilizaron 120 plantas *in vitro* de una línea transgénica (línea 90) y 120 plantas *in vitro* de Cayena lisa Serrana sin transformar como tratamiento testigo. Se transfirieron al área de aclimatización protegida para plantas transgénicas de piña. El 50% de las plantas de cada grupo se asperjó con el

herbicida FINALE<sup>®</sup> a la concentración de 2% (v/v) de la solución acuosa del producto comercial, según lo recomendado por Bayer *CropScience* (2005). En total se evaluaron cuatro tratamientos (60 plantas por tratamiento, divididas en tres réplicas de 20 individuos). Las atenciones culturales se realizaron según lo establecido por la metodología de Yanes *et al.* (2000), tal como se describe en el acápite 3.2.1. Se utilizaron plantas no transgénicas en los bordes.

A los 15 d después de aplicar el herbicida FINALE<sup>®</sup> a las plantas, se evaluó la supervivencia de las mismas, se colectaron las hojas y se conservaron en nitrógeno líquido para los posteriores análisis bioquímicos. Se determinaron los siguientes indicadores bioquímicos: malondialdehído, otros aldehídos, fenoles solubles y ligados a las paredes celulares, contenido de pigmentos clorofílicos (*a*, *b* y totales), actividad de las enzimas peroxidasas y contenido total de proteínas. Los procedimientos se realizaron según lo descrito en el acápite 3.3.1.

### **3.3.3 Tolerancia al herbicida FINALE<sup>®</sup>, perfil proteómico, el número de cromosomas e indicadores bioquímicos y agronómicos en plantas transgénicas de piña en condiciones de campo.**

El experimento en condiciones de campo se realizó en el área de liberación para plantas transgénicas de piña según la Licencia de Liberación Ambiental Controlada B/CA-L (15)06, ubicada en la Estación Experimental "Dr. Juan Tomás Roig" perteneciente al Centro de Bioplantas. Como material vegetal se compararon tres grupos de plantas: plantas de Cayena lisa Serrana (CIS) sin transformar (testigo) provenientes del cultivo *in vitro*, que se obtuvieron de la misma forma que las plantas transformadas, excepto que los callos nunca estuvieron en contacto con *A. tumefaciens*, ni en medio de selección con PPT. Además se utilizó otro grupo como testigo que estuvo constituido por plantas de Cayena lisa Serrana macropropagadas con la misma edad fisiológica y se evaluaron plantas de una línea transgénica (línea 90). A los tres meses de crecimiento en campo para cada grupo, el 50% de las plantas se asperjaron con el herbicida FINALE<sup>®</sup>; la concentración empleada fue de 2% (v/v) de la solución acuosa del producto comercial, según lo recomendado por Bayer *CropScience* (2005). Por lo tanto, seis tratamientos se compararon en un diseño de bloque al azar, con 60 plantas para cada tratamiento, cuatro réplicas por tratamiento y 15 plantas para cada réplica. Se evaluó el porcentaje de supervivencia de las plantas a los tres meses posteriores a la aplicación del herbicida. Adicionalmente se analizó el perfil proteómico, el número de cromosomas, y la evaluación de los caracteres bioquímicos y agronómicos.

Los tres grupos de plantas se plantaron en cuatro bloques experimentales completamente aleatorizados. En cada hilera se plantaron 15 plantas, con un marco de plantación de 1.40 m X 0.40 m según lo descrito por el MINAGRI (1989). Se utilizó *nylon* de polietileno como cobertor para las hileras. Para el efecto de borde se emplearon plantas de piña variedad Cayena lisa Serrana, con igual estado fisiológico que las plantas transformadas y no transformadas utilizadas como testigo. La preparación del terreno, labores agrícolas e inducción de la floración con la mezcla de *Flordimex* (ácido-2-cloroetil-fosfórico), urea y carbonato de calcio se realizó a los 12 meses de efectuada la plantación, de acuerdo al instructivo técnico para la piña recomendado por el Ministerio de la Agricultura (MINAGRI, 1989).

- **Comparación del perfil proteómico de plantas de piña transformadas con *Agrobacterium tumefaciens* y no transformadas.**

Para estudiar los cambios que se producen en el proteoma de las plantas transgénicas de piña portadoras del gen *bar*, se comparó la línea transgénica promisoría y plantas del cultivar Cayena lisa Serrana no transformadas micropropagadas (testigo), con y sin la aplicación del herbicida FINALE®. Las muestras se colectaron en cinco tiempos: 0, 24, 48, 72 y 168 h después de la aplicación del herbicida.

La extracción de proteínas totales para los estudios de electroforesis bidimensionales se realizó por triplicado y se siguió el protocolo de Damerval *et al.* (1986). Se maceraron 2 g de hojas en nitrógeno líquido. Seguidamente se añadió la solución de extracción (1:4 m/v), que contenía ácido tricloroacético 10% (m/v) y ditioneitol (DTT) 0.07% (m/v) en acetona. El homogenato se filtró por gasa y se sonicó dos veces durante 30 s, luego de 1h a -20°C se centrifugó a 10 290×g por 30 min. El precipitado se lavó por triplicado con una solución de DTT 0.07% en acetona fría y se centrifugó a 10 290×g por 30 min. Posteriormente, las proteínas precipitadas se clarificaron según el protocolo seguido por Wang (2006).

Los precipitados obtenidos se resuspendieron en tampón de solubilización que contenía urea 8 mol/L, DTT 20 mmol/L, CHAPS (BioRad) 2% (m/v) y anfolitos (Bio-lyte 5-8, BioRad) 0.5% (m/v), se centrifugaron a 10 290×g por 30 min y se colectaron los sobrenadantes a los cuales se les determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976).

Las electroforesis de una dimensión se realizaron por el método de Laemmli (1970). Las muestras y los patrones se desnaturalizaron con tampón Tris-HCl, 0.0625 mol/L, pH 6.8, duodecil sulfato de sodio (SDS) 2% (m/v), β- mercaptoetanol (5%, v/v), glicerol (10%, v/v) y bromofenol azul (0.006%,

m/v) y se aplicaron a geles de poliacrilamida al 12.5% (m/v). Posterior a la corrida, los geles se colocaron en solución fijadora (ácido acético glacial 7%, (v/v) y metanol 10%, (v/v) durante 20 min. Luego se procedió a la tinción con colorante Sypro Ruby durante 12 h, seguidamente se lavaron con solución fijadora durante 30 min.

Los patrones de masa molar conocida se adquirieron de SIGMA: miosina (200 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (116.25 kDa), fosforilasa b (97.4 kDa), albúmina de suero bobino (66.2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina de soja (21.5 kDa), lisozima (14.4 kDa) y aproptina (6.5 kDa).

Para las electroforesis bidimensionales a las muestras se le adicionó tampón de focalización que contenía urea 9 mol/L, CHAPS 4% (m/v), DTT 20 mmol/L, bromofenol azul (0.01%, m/v) y anfolitos (2%, v/v). El enfoque de las tiras de 17 cm con un rango de pH 5–8 (Protean IEF Cell system, BioRad) se desarrolló en varios pasos y se utilizaron 100  $\mu$ g de proteínas totales para cada tira. En la tabla 2 se muestran las etapas y condiciones establecidas para muestras de piña.

**Tabla 2.** Condiciones establecidas para el isoelectroenfoco en muestras de piña.

Etapas	Condiciones
1	0 a 250 V (gradiente lineal) 20 min
2	250 a 10 000 V (gradiente lineal) 3 h
3	10 000 V hasta alcanzar 60 000 V 16 h

Las tiras se equilibraron sumergiéndolas primero durante 15 min en una solución base de tampón Tris-HCl 375 mmol/L pH 8.8, 6 mol/L urea, 2% (m/v) SDS, 20%, (v/v) glicerol con 2% (m/v) DTT (reducción), y posteriormente en la misma solución base con 2.5% (m/v) de iodoacetamida (alquilación). Finalmente se lavaron con tampón que contenía: Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8.3, 192 mmol/L de glicina y SDS 0.1% (m/v).

La segunda dimensión se realizó en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida al 12% (m/v) en un equipo Protean Plus Dodeca Cell, Bio-Rad. Los geles se tiñeron con SYPRO Ruby (SIGMA), para lo cual las proteínas se fijaron a los geles con una solución 10% (v/v) metanol-7% (v/v) ácido acético y se incubaron con el reactivo durante 16 h. Las imágenes de los geles se obtuvieron con el escáner de fluorescencia "Molecular Imagen FX Pro Plus multilmager System" (BioRad) y se utilizó un láser de 532 nm, un filtro de emisión LP 555nm y el filtro de bloqueo de

excitación 1063 nm. Los geles se destiñeron con una solución de bicarbonato de amonio 100 mmol/L y acetonitrilo al 50% (v/v), se incubaron durante 48 h y se cambió la solución a las 24 h.

Una vez finalizado este proceso, se llevó a cabo la doble tinción de los geles con *Coomassie brilliant blue*. Las imágenes se tomaron con un densitómetro (GS-800, Bio-Rad) y se analizaron con el programa PDQuest™ (Bio-Rad).

El análisis fue realizado cuidadosamente mediante inspección visual. Se determinaron los volúmenes normalizados de las manchas (intensidad individual manchas/factor de normalización), calculados para cada uno en base a la cantidad total en manchas válidas. Se analizaron las tres réplicas de cada tratamiento para establecer las diferencias cualitativas y cuantitativas. Sólo se consideraron las manchas cuya presencia o ausencia fue consistente en las tres réplicas.

La detección de la PAT se realizó por Western-blot con muestras proteicas de hojas de plantas de piña transformadas y no transformadas. Las proteínas se separaron mediante geles desnaturizantes.

Después de la electroforesis SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel, durante 2 h a 70 V. Posteriormente se realizó el bloqueo con el uso del kit "ECL Advance WB detection kit" (SIGMA) preparado según las instrucciones del fabricante.

Se utilizó un anticuerpo específico producido en conejo que reconoce la proteína de interés, Anti-PAT (SIGMA). El péptido sintético fue aislado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* y la PAT fue expresada en plantas transgénicas de tabaco. La concentración utilizada fue 2 µg/mL. Como anticuerpo secundario se utilizó un suero anticonejo conjugado a un reactivo quimioluminiscente, en una dilución 1/10000. Para la detección de la quimioluminiscencia se utilizó el kit "ECL Advance WB detection kit" (SIGMA) y el equipo de revelado TDI Laser-3000 (Fujifilm).

- **Conteo cromosómico.**

A las plantas de piña crecidas en condiciones de campo durante 12 meses se les realizó el conteo cromosómico. Para ello, los ápices radiculares en las nuevas raíces se cortaron al amanecer. Las muestras se pre-trataron y fijaron en soluciones de  $\alpha$  Bromo-naftaleno y FAA (3:1, v/v). Luego de la hidrólisis y la tinción de las raíces con el reactivo de Schiff, se procedió al aplastado (*squash*) de las



raíces y se realizó la tinción con aceto-orceína (4%, v/v) (Bor *et al.*, 1987). Para la observación se empleó el microscopio óptico Opton con aumentos de 1000x, 1250x y 1600x. Se estudiaron plantas transformadas con y sin la aplicación del herbicida FINALE<sup>®</sup>, y plantas no transformadas micropropagadas y macropropagadas. Estas dos últimas no habían sido aplicadas con el herbicida.

- **Evaluación de los indicadores bioquímicos, agronómicos y bromatológicos.**

A los 12 meses a los tres grupos de plantas se les realizaron determinaciones bioquímicas como parte de la caracterización del fenotipo. Se muestrearon las hojas D de plantas transformadas con la aplicación del herbicida FINALE<sup>®</sup> y sin ella, y a plantas no transformadas micropropagadas y macropropagadas. Estas dos últimas no habían sido aplicadas con el herbicida.

*Experimento de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (ATB) (Malondialdehído (MDA) y otros aldehídos (propanal, butanal, hexanal, heptanal y propanal-dimetilacetil)).*

Se empleó 0.1 g de hojas maceradas en nitrógeno líquido, a las que se le añadió 1.4 mL de agua destilada y se agitó en vortex. Posteriormente se adicionaron 1.5 mL de ATB (0.5% m/v) disuelto en 100 mL de TCA al 20% (v/v). Las muestras se colocaron en baño termostático de agua a 100°C durante 25 min. La reacción se detuvo en hielo durante cinco min y se centrifugó a 12 000×g por 10 min. El máximo de absorción del complejo formado por ATB-MDA se leyó a 532 nm (Harding y Benson, 1995) y se restó la absorbancia a 600 nm (turbidez no específica, sustancias no-MDA) y a 455 nm para los otros aldehídos. Para el cálculo de la concentración de MDA y otros aldehídos se siguió el procedimiento descrito en el acápite 3.3.1.

El contenido de fenoles solubles y ligados a la pared celular, contenido de pigmentos clorofílicos y la concentración de proteínas, se determinó según los procedimientos descritos en el acápite 3.3.1. Para cada evaluación bioquímica se realizaron tres repeticiones por cada muestra.

*Determinación de actividades enzimáticas.*

La actividad enzimática de las peroxidasas (EC 1.1.1.1.7) se realizó como se describió en el acápite 3.3.1. Todas las extracciones enzimáticas se realizaron a 4°C y la centrifugación a 15000×g durante 20 min. El sobrenadante se colectó utilizándose como extracto enzimático crudo.

La actividad específica se calculó como el cociente de la actividad enzimática entre la concentración de proteínas.

*Actividad Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1).* Para la extracción se empleó 0.25 g de hojas maceradas con PVPP (0.25 g) en nitrógeno líquido, posteriormente se adicionaron 2 mL del tampón de extracción Tris HCl (0.1 mol/L) pH 7.5, que contenía para-metil-sulfóxido (1 mmol/L) y ME (15 mmol/L), en una relación 1:4 m/v. La suspensión se homogeneizó y posteriormente se centrifugó. La mezcla de reacción para determinar la actividad enzimática SOD contenía 20  $\mu$ L del extracto enzimático, 1 mL de tampón fosfato de potasio-KOH 50 mmol/L, pH 7.6, 0.1 mmol/L EDTA, 0.01 mmol/L citocromo C, 0.05 mmol/L xantina, 0.03 unidades xantina oxidasa (EC 1.2.3.22) (SIGMA). La mezcla xantina-xantina oxidasa se utilizó como fuente de radicales superóxido y para la cuantificación de los mismos se siguió el método del citocromo C (550 nm) ( $\epsilon_{340}=21.1$  1/mmol $\cdot$ L $\cdot$ cm) (McCord y Fridovich, 1969). El tiempo de reacción fue de 5 min, la lectura de la absorbancia se realizó a 550 nm. La actividad específica se expresó en U/mg de proteína donde 1 unidad corresponde a 1  $\mu$ mol de superóxido transformado por min.

*Actividad Fenilalanina Amonio-Liasa (PAL) (EC 4.3.1.5).* Para la extracción se empleó el mismo procedimiento descrito para la SOD. La actividad PAL se ensayó espectrofotométricamente con la aparición del producto, ácido trans-cinámico, de acuerdo a la metodología descrita por Jorrín y Dixon (1990). La mezcla de la reacción contenía 0,2 mL de extracto crudo, 0.8 mL de L-fenilalanina (7.5 mmol/L) en tampón Tris-HCL 0.1 mol/L, pH 8.5. Las muestras se incubaron a 4°C durante 2 h, posteriormente se determinó la actividad mediante la lectura de la absorbancia a 290 nm. A partir de una curva de calibrado obtenida con diferentes concentraciones de ácido trans-cinámico en el tampón de ensayo, se obtuvo el coeficiente para el cálculo de la actividad ( $\epsilon=3364.1$  1/mol $\cdot$ L $\cdot$ cm). El tiempo de reacción fue de 5 min. La actividad específica se expresó en U/g de proteína donde 1 unidad corresponde a 1  $\mu$ mol de sustrato transformado por min.

*Actividad Glutamina Sintetasa 2 (GS-2) (EC 6.3.1.2).* Para la extracción se empleó 0.25 g de hojas maceradas con PVP (0.25 g) en nitrógeno líquido, posteriormente se adicionaron 2 mL del tampón de extracción que contenía: Tris-HCl 0.158 g, MgCl<sub>2</sub> 0.203 g, ácido glutámico 0.147 g, glicerol 10 mL,  $\beta$ - mercaptoetanol 42  $\mu$ L, Triton X-100 100  $\mu$ L, DTT 0.077 g. La suspensión se homogeneizó y posteriormente se centrifugó. La mezcla de reacción para determinar la actividad enzimática contenía 350  $\mu$ L de extracto crudo y 250  $\mu$ L de tampón de reacción que contenía: imidazol 0.356 g, ácido glutámico 1.488 g, ácido aspártico 0.077 g, MgCl<sub>2</sub> 1.064 g, NH<sub>2</sub>OH 0.048 g, ATP 0.441 g. Seguidamente se incubaron a 37°C durante 20 min. Finalizado este tiempo la reacción se detuvo

con la adición de 700 µL de una solución que contenía FeCl<sub>3</sub> 10 g, HCl 5.8 mL, ácido tricloroacético 3.3 g. Se centrifugó durante 5 min a 1000×g. La lectura de la absorbancia se determinó a 540 nm (Habash *et al.*, 2001). La actividad específica se expresó en U/µg de proteínas, donde 1 unidad corresponde a 1 µmol de sustrato transformado por min.

#### *Indicadores agronómicos.*

Para comprobar la estabilidad fenotípica de las plantas se realizó una comparación a nivel agromorfológico entre plantas transformadas y no transformadas. Para esto se seleccionaron al azar 40 plantas transformadas, de estas 20 con la aplicación de herbicida y 20 sin la aplicación y como tratamiento testigo 40 plantas no transformadas, de estas 20 provenientes del cultivo *in vitro* y 20 macropropagadas.

A partir de los 12 meses de plantados los tres grupos de plantas de piña en condiciones de campo, se realizaron parte de las evaluaciones que se describen en la tabla 3. La colecta de los frutos maduros se realizó transcurrido cinco meses posterior a la inducción floral. Las variables bromatológicas evaluadas a los frutos se detallan en la tabla 4. En todos los casos se utilizaron las variables morfológicas que se describen en el descriptor para la piña (IBPGRI, 1991).

**Tabla 3.** Descripción de los caracteres agronómicos evaluados.

Variabes	UM	Momento de la evaluación	Descripción
Altura de la planta	cm	Antes de inducción floral	Se midió al colocar una cinta métrica de forma vertical hasta alcanzar la mayor altura de la planta.
Diámetro de la planta	cm	Antes de inducción floral	Se midió con una cinta métrica de forma horizontal midiéndose la mayor longitud alcanzada por las hojas.
Longitud del pedúnculo	cm	En la cosecha	Se midió la longitud entre ambos extremos con un pie de rey de forma vertical.
Diámetro del pedúnculo	cm	En la cosecha	Se midió el diámetro con un pie de rey de forma horizontal.
Color de la hoja	escala	Antes de inducción floral	Según escala del IBPGRI, 1991
Presencia de espinas en las hojas	escala	Antes de inducción floral	Según escala: 1 sin espinas, 2 espinas solo en los extremos, 3 espinas en ambos bordes.

**Tabla 4.** Descripción de las variables bromatológicas evaluadas.

Tipo de variable	Variables	UM	Descripción
Física cuantitativa	Longitud del fruto	cm	Se midió con un pie de rey la distancia entre los extremos.
Física cuantitativa	Diámetro superior del fruto	cm	Se midió el diámetro con un pie de rey, en la parte superior del fruto.
Física cuantitativa	Diámetro inferior del fruto	cm	Se midió el diámetro con un pie de rey, en la parte inferior del fruto.
Física cuantitativa	Masa del fruto sin corona	Kg	Se realizó con ayuda de una balanza técnica con la mayor rapidez posible después de la cosecha
Física cuantitativa	Masa del fruto con corona	Kg	Se realizó con ayuda de una balanza técnica con la mayor rapidez posible después de la cosecha
Física cuantitativa	Número de ojos en el fruto	U	Conteo visual del número de ojos por espiral multiplicado por la cantidad de espirales.
Física cuantitativa	Número de espirales en el fruto	U	Por conteo visual del número de espirales
Física cuantitativa	Profundidad de los ojos del fruto	cm	Se midió con un pie de rey
Física cuantitativa	Masa de la corona	Kg	Se realizó con ayuda de una balanza técnica con la mayor rapidez posible después de la cosecha
Física cuantitativa	Longitud de la corona	cm	Se midió con un pie de rey la distancia entre los extremos
Física cuantitativa	Número de coronas por fruto	U	Por conteo visual del número de coronas
Física cuantitativa	Diámetro del corazón	cm	Se midió con un pie de rey la distancia entre los extremos
Física cualitativa	Presencia de espinas en la corona del fruto	escala	Según escala: 1 sin espinas, 2 espinas solo en los extremos, 3 espinas en ambos bordes.
Física cualitativa	Forma del fruto	escala	Según escala: 1 cónico, 2 bloque, 3 oblengo, 4 barril y 5 cilíndrica
Física cualitativa	Color del fruto	escala	Según escala. IBPGRI, 1991
Física cualitativa	Forma de los ojos del fruto	escala	Según escala. IBPGRI, 1991
Química cuantitativa	Sólidos solubles	°Brix	Según Normas Cubanas 77-22-4 (1982)
Química cuantitativa	Vitamina C (ácido ascórbico)	mg/100 de jugo	mL Según Normas Cubanas 77-22-16 (1982)
Química cuantitativa	Acidez total titulable (ácido cítrico)	%	Según Normas Cubanas 77-22-7 (1982)
Química cuantitativa	Índice de Madurez.	U	Se calculó por relación (sólidos solubles/acidez) para cada fruto.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Desarrollo de una metodología para la transformación genética de la piña (cv. Cayena lisa Serrana) con *Agrobacterium tumefaciens* y un sistema de micropropagación por inmersión temporal.

#### 4.1.1 Determinación del agente de selección.

Los resultados del experimento se muestran en la tabla 5. Entre los tratamientos de la micropropagación convencional se encontraron diferencias significativas. Los tratamientos con 20 mg/L y 30 mg/L de hgm difirieron significativamente del resto con cero coeficiente de multiplicación. La concentración de 20 mg/L de hgm se recomienda en la multiplicación de los brotes de piña, porque permite la selección de individuos transgénicos en esta etapa. En el caso de la multiplicación en los BIT todos los tratamientos con hgm y PPT difirieron significativamente de aquellos con km, con cero coeficiente de multiplicación. Por lo tanto se sugiere la selección de las líneas transformadas en los BIT con 2.5 mg/L de PPT, por no estar asociado a antibióticos y ser inactivado de forma directa por el gen *bar*, además se utiliza en menores concentraciones.

**Tabla 5.** Efecto de la km, la hgm y el PPT en la multiplicación de brotes de plantas de piña no transformadas durante la micropropagación convencional y en BIT.

Agente de selección	Concentración (mg/L)	Coeficiente de multiplicación de brotes en la micropropagación convencional	Coeficiente de multiplicación de brotes en BIT
testigo	0	12.2 a	44.0 a
Kanamicina	25	11.4 a	32.2 a
	50	11.2 b	18.6 b
	75	9.5 b	16.5 b
	100	9.1 b	14.4 b
	125	8.7 b	10.5 c
Higromicina	10	10.0 b	0.0 d
	20	0.0 e	0.0 d
	30	0.0 e	0.0 d
Fosfotricina	2.5	5.6 c	0.0 d
	5	3.6 d	0.0 d
	7.5	2.6 d	0.0 d
Media general		6.99	11.35
Error típico de la media		0.5	1.7

Dentro de cada sistema de multiplicación, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey,  $p > 0.05$ ).

De estos experimentos el primer resultado a destacar es la mayor eficiencia de la micropropagación en los BIT, con respecto a la micropropagación convencional. El empleo de los BIT permite que su uso sea valioso para la selección de líneas supuestamente transgénicas en la metodología de transformación genética de la piña. Tanto para la hgm como para el PPT se demostró su empleo como buenos agentes de selección, pues controlaron la multiplicación de los brotes de piña en los BIT y se reduce el coeficiente de multiplicación a cero.

Los BIT tienen ventajas relacionadas con el uso del medio líquido sobre el semisólido. En estos sistemas hay mayor contacto del explante con el medio y por lo tanto mayor asimilación de nutrientes, mayor facilidad para la producción a gran escala porque se reducen las manipulaciones y se simplifica el cambio de medio, así como la renovación del espacio gaseoso lo que le confiere una mejor calidad a las plantas. Con el uso de estos sistemas se combinan una serie de condiciones que pueden estar relacionadas con las condiciones físicas creadas en el recipiente de cultivo como: mejor suplemento de elementos nutritivos por el renovado contacto directo con el medio de cultivo, eficiente intercambio gaseoso entre la planta y la atmósfera a causa de los cortos tiempos de inmersión, completa renovación de la atmósfera dentro del recipiente a intervalos regulares y división del tejido vegetal por la agitación durante la fase de inmersión (Tession y Alvard, 1995), por todo lo antes expuesto es que se logra un mayor coeficiente de multiplicación. En caña de azúcar (*Saccharum* sp.), Lorenzo *et al.* (1998) obtuvieron este incremento, al igual que Escalona *et al.* (1999) en el cultivo de la piña. Con la utilización de los BIT se demostró además el aumento de indicadores como la fotosíntesis y la eficiencia de intercambio de gases en plantas de plátano (*Musa* AAB) (Aragón *et al.*, 2005), así como una mejor respuesta metabólica al estrés en plantas de caña de azúcar, debido a las condiciones de estrés abiótico propias de los BIT (Aragón *et al.*, 2009).

La estrategia a seguir con el uso de los BIT es la obtención de plantas resistentes al agente de selección y luego mediante su clonación acelerada se pudiera controlar la producción de posibles plantas quiméricas. Estrategias similares del uso de la micropropagación para la selección de transgénicos ha sido informada en la caña de azúcar (*Saccharum* sp.) por Arencibia *et al.* (1998b), solo que este caso se basó en la micropropagación convencional en frascos.

Estos resultados constituyen la primera demostración de la factibilidad de utilizar los BIT como herramienta para la selección de líneas transgénicas, en este caso la piña constituye la planta

modelo. Posterior a este trabajo se publica la utilización de los BIT para la selección de líneas transgénicas de fresa resistentes a hgm (Hanhineva y Karenlampi, 2007).

Por otra parte, los resultados demuestran que en las concentraciones estudiadas el antibiótico km no es adecuado para su uso como marcador de selección en piña. Una concentración de 125 mg/L no inhibió completamente la proliferación de las células de piña, lo que indica que los explantes empleados tienen alta resistencia endógena a este antibiótico. Resultados similares fueron publicados en algunas especies lo que limita su uso para la selección de células transgénicas. Plantas como *Lilium Longiflorum* cv. son resistentes a la km, en contraste con otras especies de plantas que son muy sensibles (Kathryn, 2008). En *Eschscholzia californica* Cham. se ensayaron el uso de antibióticos en el crecimiento y potencial morfogénico de callos de esta especie. A concentraciones entre 10 y 200 mg/L la km no inhibió el crecimiento de callos, el establecimiento de embriones somáticos y la regeneración de plantas (Park y Facchini, 2000).

No está demostrado que la aplicación de altas concentraciones de los agentes de selección es la mejor forma de eliminar células o tejidos organizados no transformados, a partir de que el proceso de selección puede también inhibir severamente la diferenciación de células transgénicas (Peña *et al.*, 1995; Cervera *et al.*, 2008). Es por eso que no se recomienda utilizar mayores concentraciones de km ni su uso como agente selectivo porque se demostró resistencia endógena de la piña a este antibiótico.

Referente a la hgm, se observa que las concentraciones más bajas utilizadas permitieron la inhibición total de la proliferación celular en los explantes que se utilizaron, lo que indica que la piña no tiene resistencia endógena a este antibiótico. La hgm es un aminoglucósido que interfiere en la traducción de procariontes y eucariotes porque inhibe la elongación de la cadena peptídica. Se ha empleado para seleccionar plantas transgénicas de cítricos (*Citrus*) (Hidaka *et al.*, 1990), arroz (*Oryza sativa* L.) (Arencibia *et al.*, 1998a) y caña de azúcar (*Saccharum* sp.) (Arencibia *et al.*, 1998b) con el uso de la transformación mediante *A. tumefaciens*.

Por otra parte, Igasaki *et al.* (2000) estudiaron el efecto de la hgm y km en la supervivencia de discos de hojas en la luz. Este indicador se determinó por la clorosis extendida en los explantes. La hgm a bajas concentraciones fue más efectiva en la muerte de los explantes que la km, además este antibiótico excluyó de manera eficiente células no transformadas.

Desde que comenzó la utilización de la Ingeniería Genética y con la obtención de las primeras plantas transgénicas a principios de la década de los años 80, se hizo necesaria la utilización de antibióticos como agentes de selección (Herrera-Estrella *et al.*, 1983; Wilson y Latham, 2006). Actualmente existe una tendencia a usar alternativas ante otros marcadores de selección y uno de los argumentos que presentan es que estas plantas contienen genes de resistencia a antibióticos que pudieran ser ingeridos por los consumidores y causar un efecto negativo. Por estas razones se han propuesto muchas estrategias para eliminar la presencia de estos genes en las plantas transgénicas (Puchta, 2003). Estas estrategias incluyen: sistemas de elementos transposables (Castro *et al.*, 2005), el uso de marcadores de selección alternativos como los resistentes a herbicidas (De Block *et al.*, 1989; Facchini *et al.*, 2008), alteraciones en el metabolismo (Rathinasabapathi *et al.*, 1994; Dumet y Benson, 2000; Wilson y Latham, 2006) y la co-transformación (Daley *et al.*, 1998; Ahmad *et al.*, 2006). Por estas razones en este trabajo se evaluó el efecto del PPT en la multiplicación de líneas de piña. Paralelamente la producción de líneas comerciales llevaría implícito la incorporación del carácter tolerancia a herbicida de alto valor agronómico. Actualmente la mayoría de los trabajos de producción de plantas transgénicas se basan en la estrategia del uso de herbicidas como agente de selección, entre ellos el PPT es sin dudas el de mayor difusión (Pascual *et al.*, 2008).

Krishnamurthy *et al.* (2000) estudiaron diferentes concentraciones de PPT (2, 5, 10 y 20 mg/L) en la regeneración de brotes de *Cicer arietinum* L. a partir de embriones axilares. Concluyeron que 10 mg/L suprimió totalmente el desarrollo de brotes a partir de embriones.

Según los resultados de esta investigación, la utilización de 2.5 mg/L de PPT fue eficiente para reducir significativamente la micropropagación de la piña en los Biorreactores de Inmersión Temporal por lo que se continuó la línea de trabajo con este marcador de selección a esta concentración.

#### **4.1.2 Efecto de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* y el tiempo de cocultivo en la actividad del gen reportero en callos embriogénicos de piña.**

Los resultados se muestran en la tabla 6, el mejor tiempo de cocultivo resultó ser 24 h, en el que se obtuvo un 40% de eficiencia en la actividad transitoria. La actividad GUS disminuyó al 20% en el tratamiento T0 cuando los callos se lavaron después de la infección con *A. tumefaciens*. A partir de las 48 h no se detectó actividad transitoria GUS en ninguno de los tratamientos, comportamiento que se mantuvo hasta las 72 h.



**Tabla 6.** Influencia del tiempo de cocultivo en la actividad glucuronidasa transitoria de callos con estructuras embriogénicas infectados con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AT2260 (pIG12Hm).

<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tiempo de Cocultivo (h)	Porcentaje de callos con actividad glucuronidasa
AT2260 (pIG12Hm)	0	20 b
	24	40 a
	48	0 c
	72	0 c
Testigo no inoculado con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>		0 c
Media general		13.33
Error típico de la media		1.26

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tuckey,  $p > 0.05$ ). Para el análisis, los datos se transformaron estadísticamente de acuerdo con  $y' = 2 \cdot \arccoseno (y/100)^{0.5}$ .

La interacción entre las células del explante y *Agrobacterium tumefaciens* es un aspecto crítico para obtener buena eficiencia de transformación genética. En este importante evento biológico influyen múltiples y determinantes factores ambientales, fisiológicos y genéticos. La muerte de los callos de piña a las 48 y 72 h fue posiblemente consecuencia del aumento del crecimiento bacteriano sobre el explante utilizado. El contacto prolongado de los callos con el *A. tumefaciens* pudo producir una infección excesiva de los tejidos, lo cual provocó la decoloración, la posterior necrosis y por último, la muerte de todos los callos. El incremento de daños en el material vegetal infectado con el aumento de cocultivo, al igual que la aparición de estas alteraciones morfológicas, pudiera estar asociado a alteraciones bioquímicas y fisiológicas producidas por la interacción de la bacteria con el material vegetal.

Para la transformación genética de callos de *Ananas comosus* cv. Queen (Gaurab *et al.*, 2009), utilizaron un tiempo de cocultivo material vegetal-bacteria de 72 h. La mayor eficiencia de la actividad transitoria en este genotipo se obtuvo con una longitud de tiempo menor a las 120 h, lo que garantizó la posterior eliminación o control del crecimiento de la bacteria. Las condiciones óptimas del tiempo de cocultivo permitieron la proliferación de las células vegetales, lo que hizo posible obtener microbrotes supuestamente transgénicos los cuales posteriormente se encapsularon con el agente de selección. El mismo tiempo de cocultivo se usó para callos de

*Ananas comosus* cv. Champaka y no se afectó la regeneración de brotes (Firoozabady *et al.*, 2006).

Resultados descritos por otros autores refieren que el tiempo de cocultivo requerido para llevar a cabo la transferencia de genes depende del genotipo vegetal y la virulencia de la cepa de *A. tumefaciens* que se utilice para la infección (Moran *et al.*, 1998; Okamoto *et al.*, 2005). En estudios realizados por Qing-Chang *et al.* (2004) en callos de boniato expuestos durante cuatro días la supervivencia fue baja, lo que explica que la exposición prolongada es una dificultad para la eliminación de *A. tumefaciens* del tejido vegetal. En la transformación de *Citrus reticulata* mediada por *A. tumefaciens*, Li *et al.* (2002) evaluaron diferentes tiempos de cocultivo y la mejor frecuencia de transformación la obtuvieron a las 72 h. Algunas variedades de soya oriundas de China mostraron una mejor respuesta en la eliminación o control del crecimiento de la bacteria, cuando se usaron tiempos menores de 120 h (Liu *et al.*, 2008).

En el cultivo de *Lavandula* se comparó la influencia de dos tiempos de cocultivo (dos y cuatro días). Los mejores resultados se lograron a los cuatro días de cocultivo. Se determinó además que las cepas LBA4404 y GV2260 se mostraron completamente ineficientes (Dronne *et al.*, 1999). Existen otros cultivos que requieren más días de cocultivo como por ejemplo *Mentha spicata* y *Mentha arvensis* que después de cinco días de cocultivo con *A. tumefaciens* es que pasan al medio de cultivo con el adecuado agente de selección (Diemer *et al.*, 1999).

En *Allium sativum*, Kondo *et al.* (2000) demostraron que el cocultivo por tres días mostró la mayor expresión glucuronidasa en comparación con uno y dos días de cocultivo. Sin embargo, la expresión glucuronidasa no varió significativamente de tres a seis días. Largos períodos de cocultivo parecen ser efectivos para la transferencia del ADN-T a las células vegetales. En explantes de cítricos la frecuencia de expresión transitoria glucuronidasa se incrementó marcadamente de uno a cinco días (Cervera *et al.*, 2008). Estos autores encontraron una mejor respuesta en mandarina (*Citrus clementina* Hort. ex Tanaka) al exponer el material vegetal recalcitrante durante un tiempo mayor de infección con la bacteria.

Han *et al.* (2000) compararon las cepas productoras de octopina (LBA4404), nopalina (C58) y agropina (EHA105) en la habilidad de transformación. La cepa EHA105 (agropina) mostró diferencias significativas en el incremento de la transferencia del ADN-T. Los resultados obtenidos

por estos investigadores indican que no se encontraron diferencias al evaluar las cepas productoras de octopina y nopalina.

El tipo de explante es un factor determinante en la interacción con el *A. tumefaciens*. En el cultivo de la piña, Rodríguez *et al.* (1996) en la variedad de Cayena lisa Serrana confirmaron mediante análisis histológicos la presencia de estructuras semejantes a embriones somáticos en estado globular unidos a la masa de callos. Esta estructura está formada por una protodermis, células con abundante citoplasma y núcleo grande altamente basofílico con paredes celulares gruesas y en posición central. También describieron células cubiertas bajo una misma envoltura como es característico de las células embriogénicas. Estos resultados permiten recomendar el uso de callos con estructuras embriogénicas para el establecimiento de un procedimiento de transformación en el cultivo de la piña. Este tipo de tejido está provisto de gran cantidad de células meristemáticas que son necesarias para la transformación con el *A. tumefaciens* (Arencibia *et al.*, 1998a). Por lo que se considera que 24 h de cocultivo del *A. tumefaciens* en callos con estructuras embriogénicas de piña, permiten una buena expresión del gen reportero.

#### **4.1.3 Evaluación de la cefotaxima en el control del *Agrobacterium tumefaciens* durante la regeneración de plantas de piña.**

En la tabla 7 aparecen los resultados del efecto de la cefotaxima en la regeneración de plantas de piña. El número plantas se afectó cuando los callos se cultivaron en ausencia de cefotaxima. Con la concentración de 200 mg/L de cefotaxima se logró el control del crecimiento de la bacteria y además la regeneración de plantas. No obstante, cuando los tejidos crecidos en 200 mg/L de cefotaxima se incubaron en medio LB, se demostró la presencia del *A. tumefaciens*. Este resultado indica que durante todo el procedimiento de transformación, que incluye la regeneración y la multiplicación de plantas, debe controlarse el crecimiento de la bacteria con este antibiótico.

Con 600 mg/L de cefotaxima en el medio de cultivo no hubo contaminación visible con *A. tumefaciens*; sin embargo, se redujo la capacidad de regeneración de plantas. Para el tratamiento testigo se obtuvo 75 plantas regeneradas por cada 200 mg de callos, sin diferencias significativas con el tratamiento que contenía 200 mg/L de cefotaxima.

**Tabla 7.** Efecto de la cefotaxima en la regeneración de plantas a partir de callos con estructuras embriogénicas de piña después del cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens*.

Cocultivo con	Concentración de	Número de plantas	Contaminación visible detectada en:
---------------	------------------	-------------------	-------------------------------------

<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	cefotaxima (mg/L)	regeneradas/200 mg de callos a los 45 días de cultivo	Medio de regeneración de brotes.	Medio LB
Sí	0	13.3 c	Sí	Sí
Sí	200	71.0 a	No	Sí
Sí	400	48.3 b	No	Sí
Sí	600	43.3 b	No	No
No	0	75.0 a	No	No
Media general		50.18		
Error típico de la media		2.5		

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey,  $p > 0.05$ ). Para el análisis, los datos se transforman estadísticamente de acuerdo con  $y' = y^{0.5}$ .

La cefotaxima es un antibiótico muy utilizado para el control del crecimiento del *A. tumefaciens*. En la transformación genética de piña cv. Cayena lisa, Wang *et al.* (2009) utilizaron 250 mg/L de cefotaxima para el control de la bacteria una vez concluido el período de cocultivo en brotes adventicios. Esta concentración utilizada en el nuevo protocolo establecido para este cultivo no produjo efecto negativo significativo en la elongación de los brotes. Gaurab *et al.* (2009) utilizaron una concentración de 300 mg/L de cefotaxima en callos infestados y cocultivados de piña cv. Queen. El control del crecimiento de *A. tumefaciens* lo realizaron unido a una primera etapa de selección de transformantes previa a la encapsulación de microbrotes. Concentraciones más elevadas de cefotaxima fueron utilizadas por Firoozabady *et al.* (2006) en callos con estructuras embriogénicas de *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. Champaka.

Kokko y Kärenlampi (1998) utilizaron la cefotaxima para el control de crecimiento de *A. tumefaciens* en la transformación de *Rubus arcticus* L. La concentración del antibiótico que previno el crecimiento de la bacteria estuvo entre 25 y 50 mg/L. Sin embargo, cuando estudiaron el efecto de ésta sobre el crecimiento de brotes transformados, determinaron que la concentración óptima fue de 200 mg/L. La necesidad de la utilización de elevadas concentraciones se debe a que la cefotaxima es degradada por la luz; es por eso que los cultivos de tejidos vegetales generalmente requieren períodos extensos (semanas) en estas condiciones.

En *Eucalyptus camaldulensis* se estudió el efecto de la cefotaxima en la capacidad de regeneración de segmentos de hojas. Este antibiótico no afectó a concentraciones mayores de 200 mg/L (Mullins *et al.*, 1997). En la transformación de hojas jóvenes de manzana se utilizaron

300 mg/L sin afectar el proceso de regeneración (Prakash *et al.*, 1999). Merrit *et al.* (1999) en segmentos de raíces de *H. muticus* infectados con *A. tumefaciens* y puestos después en un medio de cultivo de crecimiento con 500 mg/L de este antibiótico, encontraron que esta concentración inhibió ligeramente esta fase.

Tang *et al.* (2000) evaluaron el efecto de cuatro antibióticos en la eliminación de *A. tumefaciens* y en la formación de embriones secundarios de nuez. Los antibióticos fueron: ampicilina, cefotaxima, carbenicilina y timetina a diferentes concentraciones (100, 250, 500 y 1000 mg/L). A 100 y 250 mg/L de ampicilina, carbenicilina o cefotaxima no hubo control sobre el crecimiento de la bacteria. Sin embargo, cuando se utilizaron elevadas concentraciones de estos compuestos se afectó la producción de embriones somáticos.

Como resultado parcial de esta etapa se seleccionó la concentración de 200 mg/L de cefotaxima para el control del *A. tumefaciens* en la transformación de la piña.

#### **4.1.4 Producción de plantas transgénicas de piña que portan genes de interés agrícola.**

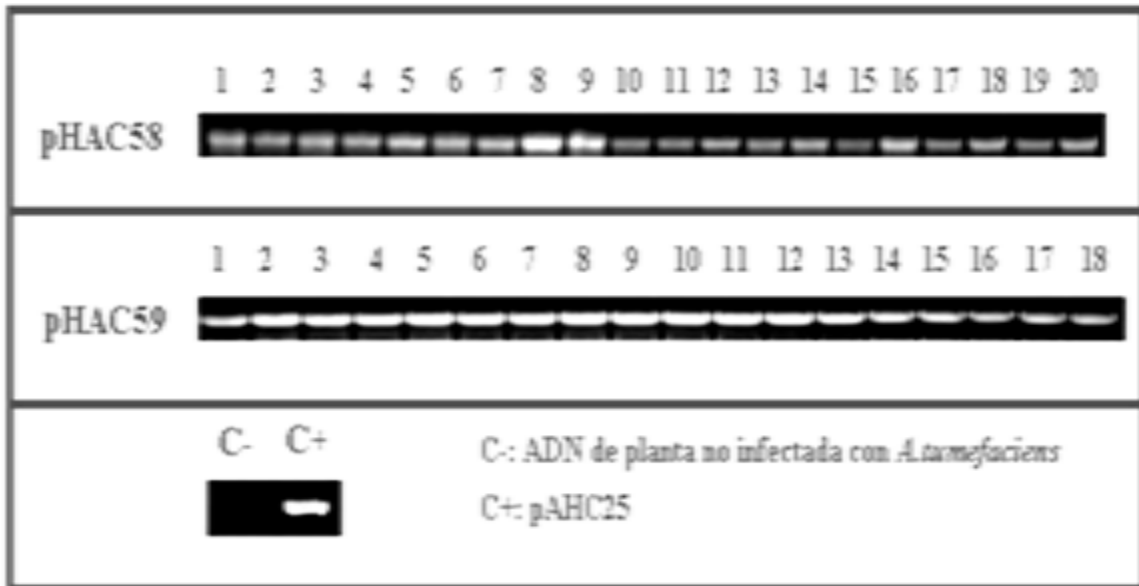
El procedimiento parte de callos con estructuras embriogénicas inoculados con *A. tumefaciens* durante 10 min. Posteriormente se cocultivaron en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) durante 24 h, al cabo de este tiempo se transfirieron a medio de cultivo de regeneración de callos (Daquinta *et al.*, 1994) con 200 mg/L de cefotaxima durante seis semanas. Después de transcurrido este tiempo se sometieron las plantas *in vitro* al proceso de selección en los BIT en el medio de cultivo de multiplicación de brotes (Daquinta *et al.*, 1994) con 2.5 mg/L de PPT y 200 mg/L de cefotaxima. A las cuatro semanas de cultivo en medio de cultivo selectivo se obtuvieron aglomerados de plantas *in vitro* resistentes al herbicida. En esta etapa se utilizó el método del RCP para el tamizaje de plantas transgénicas y la comprobación de la integración del gen *bar* en líneas con tolerancia *in vitro* al PPT.

Los resultados se muestran en la tabla 8. En total se obtuvieron 60 líneas de piña del tratamiento con el plasmido binario pHCA58 y otras 63 líneas provenientes de la infección con *A. tumefaciens* con la construcción pHCA59. Se demostró que todas las líneas que formaron aglomerados resistentes a PPT en BIT resultaron positivas a la presencia del gen *bar* mediante RCP (figura 2). Este resultado era esperado porque el material seleccionado para los análisis moleculares fueron

plantas totalmente verdes que crecieron en medio de selección con PPT. En resumen se corrobora la efectividad del PPT como agente de selección en la transformación de esta especie, además de la utilidad de los BIT como una herramienta para la selección efectiva de individuos transgénicos. Estos resultados constituyen el primer informe de la selección en BIT de líneas transgénicas de plantas, en este caso de piña, resistentes a PPT transformados mediante *A. tumefaciens*.

**Tabla 8.** Resultados de experimentos de transformación de la piña a gran escala.

Cepa de <i>A. tumefaciens</i>	Número de experimento	Masa fresca de callos inoculados (g)	Número de brotes regenerados	Número de líneas resistentes seleccionados en BIT	Número de líneas RCP <sup>+</sup>	Eficiencia de transformación (%) <sup>*</sup>
AT2260 (pHCA58)	1	6	45	3	3	6.6
	2	6	167	9	9	5.4
	3	6	286	12	12	4.2
	4	6	189	10	10	5.3
	5	6	175	12	12	6.8
	6	6	232	14	14	6.0
	Sub-total	36	1094	60	60	5.5
AT2260 (pHCG59)	7	6	158	3	3	1.8
	8	6	250	15	15	6.0
	9	6	270	14	14	5.2
	10	6	167	11	11	6.6
	11	6	178	8	8	4.5
	12	6	216	12	12	5.5
	Sub-total	36	1239	63	63	5.1
Eficiencia de Transformación: (número de brotes resistentes al PPT/ número de brotes regenerados) · 100.						



**Figura 2.** Análisis mediante RCP de la presencia del gen *bar* en clones de piña con resistencia *in vitro* a PPT. Los clones fueron obtenidos después de la infección con At2260 (pHAC58) y At2260 (pHAC59). El fragmento amplificado corresponde a una región de 450 pb entre el gen *bar* y el terminador tNOS3' con el uso de los cebadores 5'CGAGACAAGCACGGTCAACTTC y 5'AAACCCACGTCATGCCAG TTC.

Se considera que los valores de eficiencia de transformación obtenidos para ambas construcciones fueron altos, aunque existe una variabilidad entre los experimentos. Esto pudiera estar relacionado al uso de callos como material de partida para la transformación, aunque se debe considerar que la selección de estos materiales se hace de manera visual momentos antes de la infección con *A. tumefaciens*. Una eficiencia de transformación más elevada en *Ananas comosus* fue obtenida por Firoozabady *et al.* (2006), donde partieron de 1 g de callos con estructuras embriogénicas cv. Champaka y obtuvieron entre 50 y 120 líneas supuestamente transgénicas. Las diferencias obtenidas entre estos resultados están dadas por el manejo de genotipos vegetales diferentes y distintas cepas de *A. tumefaciens*. El manejo de las condiciones para optimizar la transformación es diferente en cada genotipo; como son el logro de una mayor población de células competentes, la inducción de la virulencia en las células bacterianas y la transferencia de genes.

Los resultados de esta tesis fueron los primeros referidos a la transformación de la piña mediante *A. tumefaciens*. Se usaron los BIT como una herramienta para la selección de los clones transgénicos. Recientemente, se realizó la transformación de esta especie mediante *A.*

*tumefaciens* con la utilización de la estrategia de micropropagación convencional para la selección de líneas transgénicas. Para ese caso se utilizaron brotes adventicios como material de partida para la transformación y se eliminó la vía de callos. Se obtuvieron 42 líneas de dos cultivares comerciales que portan en un caso un gen cistatina de arroz modificado y en el otro un gen antisentido de la aminociclopropano sintasa (ACS). La eficiencia de transformación de esos experimentos osciló entre 0.27-0.38 y la estrategia de multiplicación en medio selectivo fue sucesiva y redujo significativamente la posibilidad de plantas quimeras (Wang *et al.*, 2009).

Posteriormente se publicó la transformación por *A. tumefaciens* de callos de piña (cv. Queen) con el uso de un novedoso método de selección sobre la base de brotes micropropagados y encapsulados en medio de alginato de calcio con 60 mg/L de hgm. En ese trabajo se propone el uso de ese método para la eliminación de posibles plantas quimeras (Gangopadhyay *et al.*, 2009).

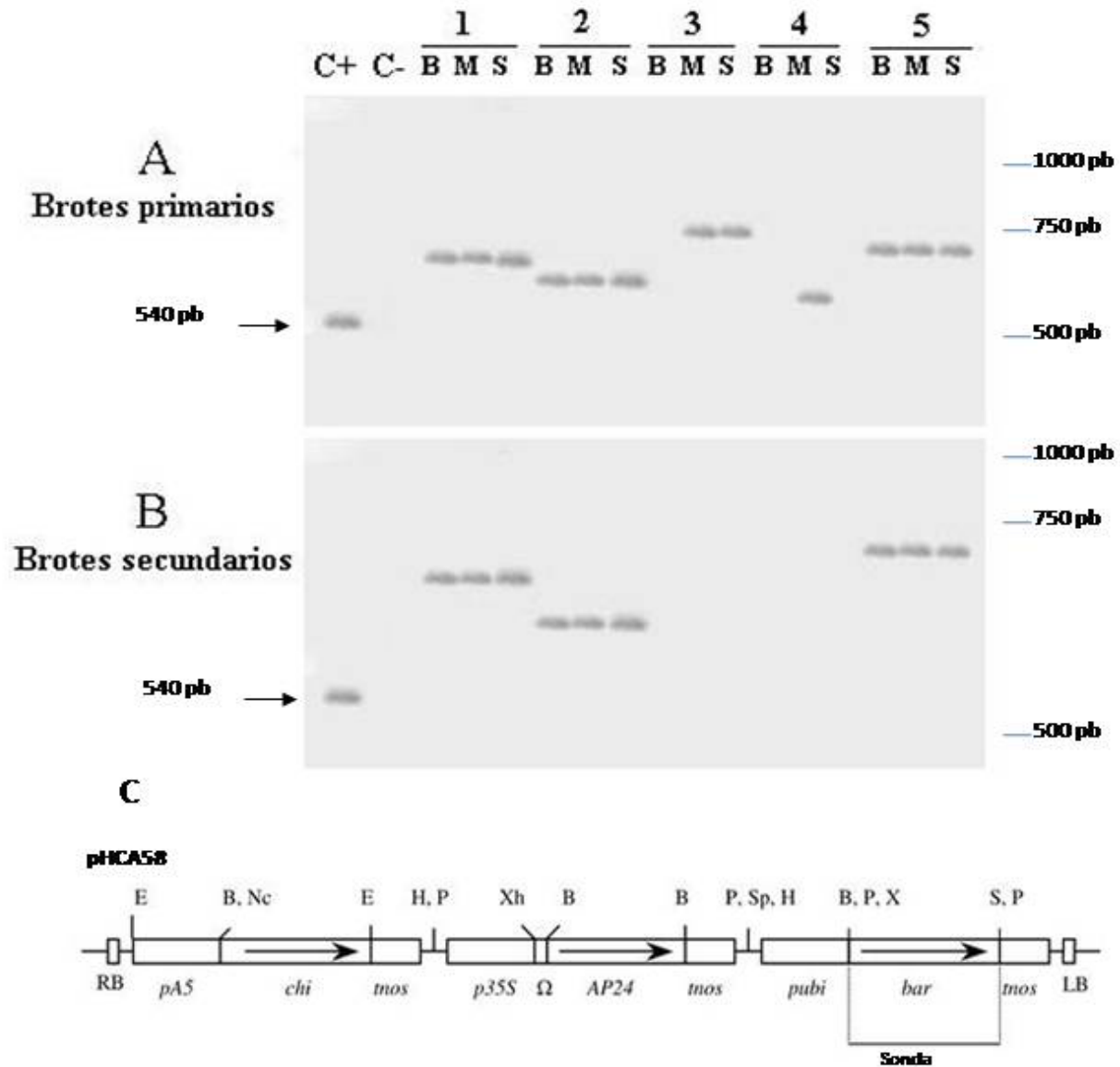
Una estrategia similar se desarrolló en caña de azúcar para la producción de líneas transgénicas seleccionadas mediante micropropagación convencional. En ese caso se utilizaron brotes axilares como material inicial y se eliminó la fase de formación de callos. Los cultivares Co92061 y Co671 se cocultivaron con las cepas de LBA4404 y EHA105 que contenían el gen *bar* para la tolerancia a FINALE<sup>®</sup>. Las eficiencias de transformación obtenidas fueron del 50% y se eliminaron las plantas quimeras en etapas de propagaciones selectivas sucesivas (Manickavasagam *et al.*, 2004).

La etapa de selección en líneas de piña supuestamente transgénicas se realizó en BIT, que contenían medio de multiplicación suplementado con PPT. Para determinar la efectividad de la selección se realizó un análisis de Southern blot genómico a cinco líneas resistentes a PPT. Los patrones de hibridación se muestran en la figura 3. El primer resultado que se evidencia es que las señales de hibridación corresponden a copias únicas de diferentes patrones de integración del gen *bar*, por lo que se puede concluir que las líneas se originaron de eventos de transformación independientes y, por tanto, son diferentes genotipos transgénicos.

Para el caso de los brotes primarios de las líneas 1, 2 y 5 se observaron señales de hibridación a alturas similares entre cada una de sus partes basal, media y superior. Para el caso de la línea 3 se observó señal en sus partes media y superior, mientras que para la línea 4 solo en su sección media (figura 3A). Se puede concluir que las líneas 1, 2 y 5 provienen exclusivamente de células transgénicas. Por el contrario las líneas 3 y 4 resultaron ser quiméricas o mosaicos.



## Líneas resistentes a PPT en BIT



**Figura 3.** Southern blot genómico de clones de piña transformados con At2260 pHAC58 y seleccionados como resistentes a PPT en BIT. El ADN total se extrajo de las partes basal (B), media (M) y superior (S) de los brotes, y digerido con *Bam*HI. La sonda de hibridación correspondió al gen *bar* (540 pb) del fragmento *Pst*I del plásmido pHAC58. C+: 10 pg del fragmento *Pst*I del pHAC58. C-: ADN genómico de plantas de *Cayena lisa* Serrana no transformadas con *A. tumefaciens*.

Esta conclusión se corrobora al analizar los brotes secundarios (figura 3B) donde se observa que las líneas 1, 2 y 5 mantienen los patrones de integración del gen *bar* en sucesivas generaciones agámicas, mientras que las líneas 3 y 4 no originaron plantas resistentes en multiplicaciones selectivas, debido a que no fueron transformados en su parte basal. Se debe tener en cuenta que en la piña, como en el caso de otras plantas micropropagadas (ej: caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), plátano (*Musa sp.*)) la multiplicación de brotes axilares ocurre predominantemente en la zona basal donde se localiza gran número de células y tejidos meristemáticos (Arencibia *et al.*, 1998b).

Estos comportamientos fueron los esperados teniendo en cuenta que los eventos de transformación son puntuales y al azar. Sin embargo, abren la posibilidad de que se puedan producir plantas mosaicos o químeras, fenómeno que se debe controlar (o manejar) en etapas sucesivas de multiplicación selectiva. Por lo que se recomienda una estrategia de selección que incluya varios subcultivos en BIT con el agente de selección.

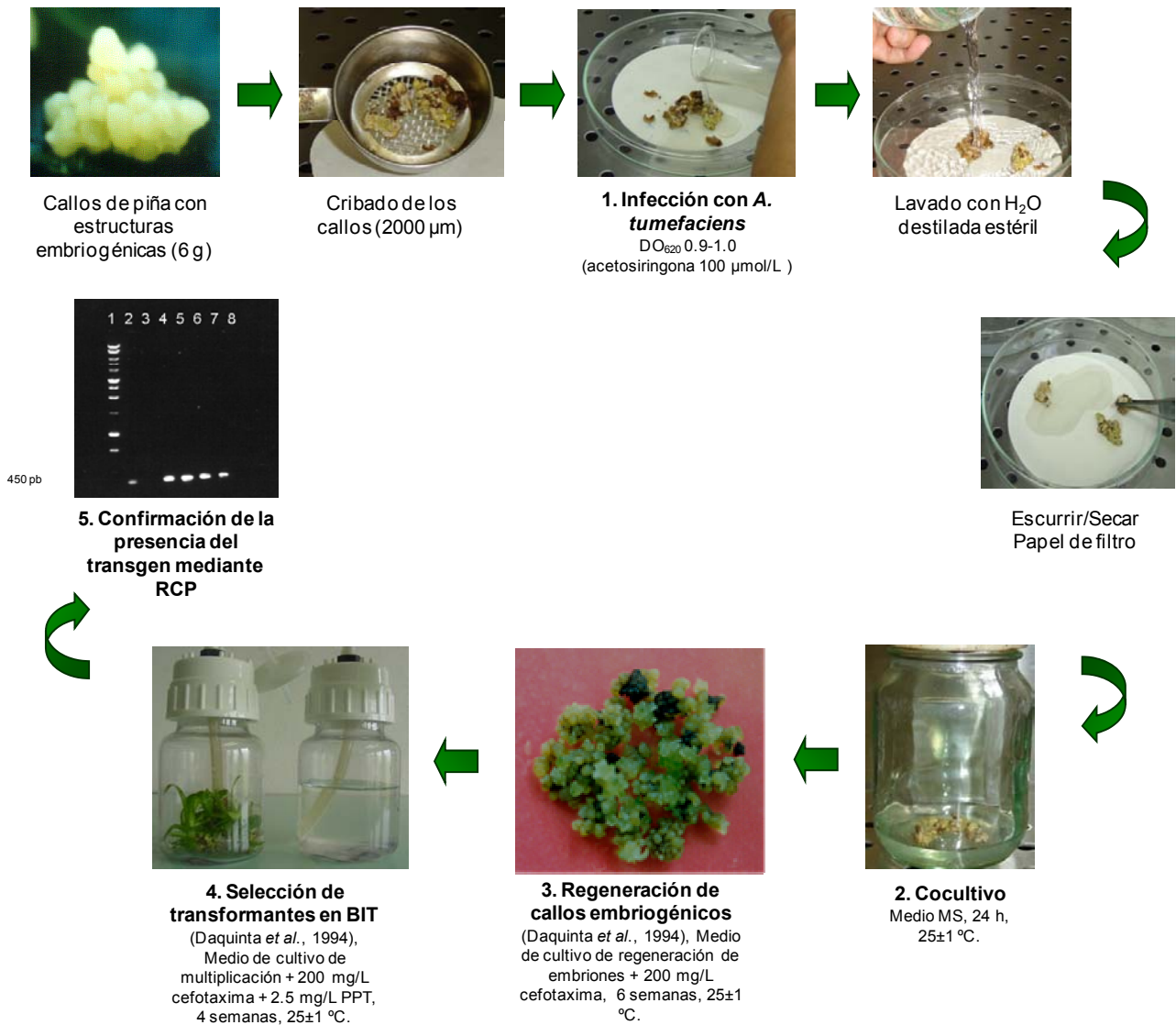
Un protocolo experimental similar para la selección de individuos transgénicos en BIT fue desarrollada para la fresa (Hanhineva y Karenlampi, 2007). En este caso se incrementaron las concentraciones del agente de selección hgm de 10 mg/L a 15 mg/L en dos etapas de micropropagación en BIT. De un total de 26 líneas resistentes tamizados por RCP, se demostró que 21 fueron totalmente transgénicos según señales hgm-RCP+ cuando se analizaron todos los órganos de las plantas transferidas al campo.

Para el caso de la piña se ha publicado la selección de líneas transgénicas con el uso de otras herramientas de micropropagación convencional. Gangopadhyay *et al.* (2009) utilizaron callos de piña (cv. Queen) infectados con *A. tumefaciens* portador de (pCAMBIA 1304) para la producción de microbrotes que posteriormente encapsularon en geles de alginato de Calcio suplementado con hgm 60 mg/L. Estos autores logran una eficiencia de transformación de 20.6%, superior a la obtenida en este trabajo, no obstante, refieren a una manipulación mayor y muy tediosa que genera un elevado costo para el encapsulamiento de estos microbrotes.

Recientemente Wang *et al.* (2009) demostraron la naturaleza no quimérica de plantas de piña (cv. Cayena lisa) transformados con *A. tumefaciens* (pCAMBIA 1301) para la resistencia a hgm. En ese trabajo se transformaron brotes completos y se seleccionaron los transgénicos durante la micropropagación convencional después de tres subcultivos (aproximadamente cuatro meses). Las eficiencias de selección de individuos totalmente transgénicos fue 0.27-0.38, considerada baja en comparación con los resultados del presente trabajo. Los autores defienden la no utilización de callos como material inicial y, por tanto, esperan que las plantas transformadas no deban tener variación somaclonal, fenómeno considerado indeseable durante la transgénesis. Este aspecto de la variabilidad somaclonal ha sido evaluado en este trabajo y será discutido más adelante.

Para otra especie de planta de reproducción asexual, en este caso la caña de azúcar, se publicó el uso de la selección de transgénicos en etapas de micropropagación (Manickavasagam *et al.*, 2004). En este caso se utilizaron cuatro subcultivos de multiplicación y uno adicional de enraizamiento en medio de cultivo selectivo. En general se obtuvo una eficiencia de transformación de 50%, mucho mayor que en este trabajo. Esta diferencia puede estar debida a dos razones: el uso de la cepa EHA105 que se considera superinfectiva para plantas monocotiledoneas (Hiei *et al.*, 1997; Arencibia *et al.*, 1998a; Arencibia *et al.*, 1998b; Hiei *et al.*, 2000), además del alto potencial de multiplicación de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), muy superior al de la piña.

Como conclusión del conjunto de experimentos desarrollados en esta etapa, está un esquema general de trabajo para la transformación mediante *A. tumefaciens* de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill), con el uso novedoso de los BIT como herramienta para la selección de individuos transgénicos, lo que permite que se proponga una metodología para la transformación genética de este cultivo (figura 4).



**Figura 4.** Esquema general de trabajo para la transformación genética de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

## 4.2 Evaluación de la tolerancia al herbicida FINALE® y la actividad antipatogénica.

### 4.2.1 Tolerancia al herbicida FINALE® en líneas transgénicas de piña en condiciones de aclimatización.

Después de 30 d de la aplicación del herbicida FINALE® se observó necrosis en todas las plantas del tratamiento testigo. En el caso de las líneas transformadas se evidenció un amplio espectro de signos desde manchas necróticas, la quemadura de las hojas, hasta la muerte total de la planta. Para este experimento se consideró el porcentaje de supervivencia al herbicida como criterio evaluativo.

De las 100 líneas estudiadas, un total de cinco líneas transgénicas (27, 40, 44, 46 y 90) lograron alta supervivencia ante el estrés producido por el herbicida. Estas líneas mostraron diferencias significativas con respecto al resto de las plantas transgénicas y el testigo no transformado (tabla 9). Por otra parte, se aprecia que las líneas 90, 44, y 40 mostraron los menores porcentajes de plantas muertas después de la aplicación del herbicida FINALE<sup>®</sup>, con diferencias significativas con respecto a las líneas transgénicas 27 y 46. El resto de las líneas transgénicas mostraron porcentajes de supervivencia menores al 20% (datos no mostrados) frente al herbicida FINALE<sup>®</sup> en las condiciones experimentales utilizadas.

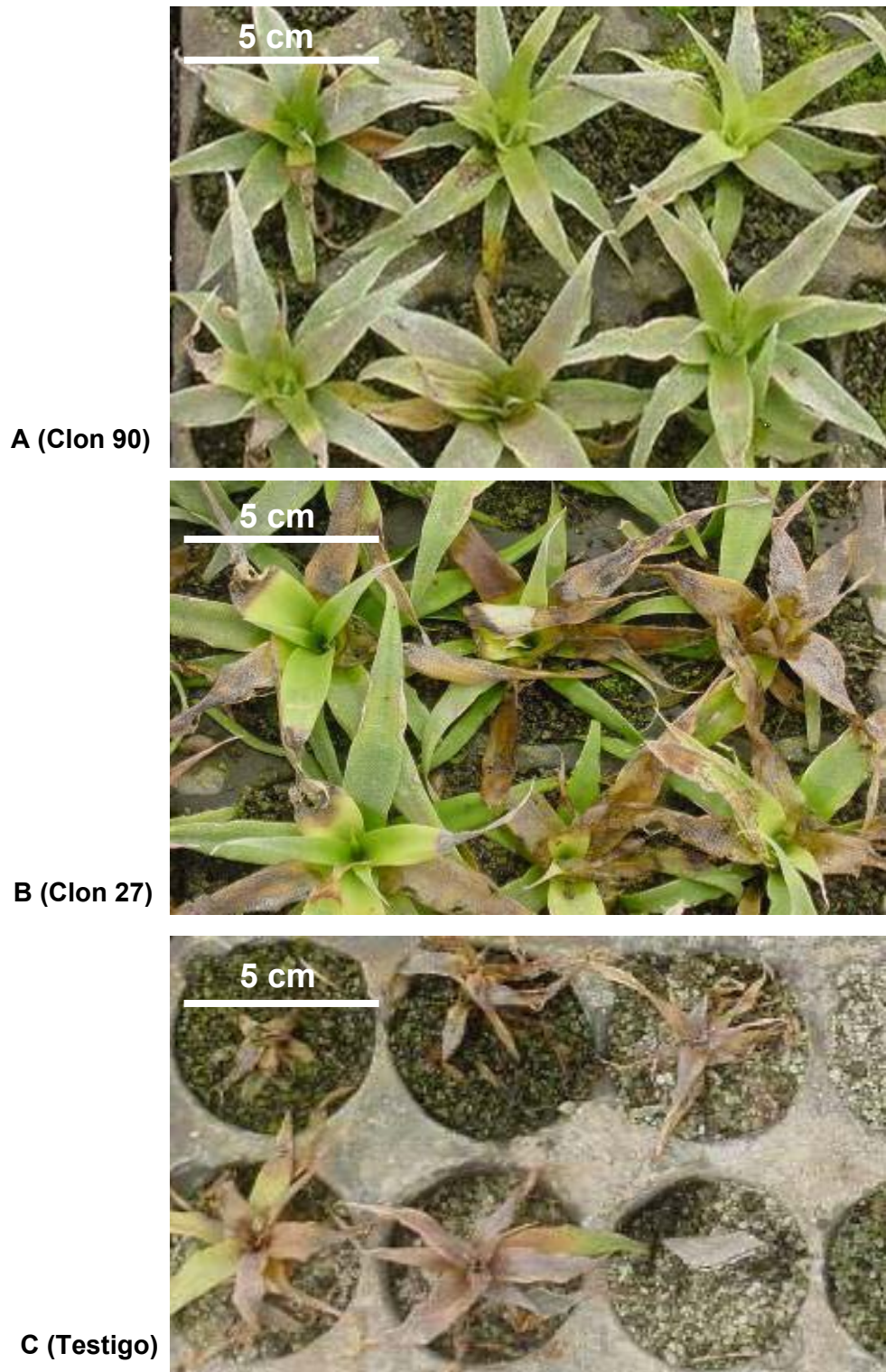
**Tabla 9.** Efecto de la aplicación del herbicida FINALE<sup>®</sup> en líneas transgénicas de piña en condiciones de aclimatización.

Línea	Construcción genética	Porcentaje de supervivencia (%)
90	pHAC58	100.0 a
40	pHAC58	94.0 b
44	pHCG59	97.0 b
46	pHCG59	91.0 c
27	pHAC58	88.5 c
97	pHAC58	20.0 d
3	pHCG59	20.0 d
54	pHAC58	20.0 d
1	pHAC58	20.0 d
5	pHCG59	20.0 d
Cayena lisa Serrana	No transformada	0.0 e
Media general de las 100 líneas evaluadas		51.86
Error típico de la media de las 100 líneas evaluadas		5.47

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey,  $p > 0.05$ ). Para el análisis, los datos se transformaron según  $y' = 2 \arccos(y/100)^{0.5}$ . El procesamiento estadístico se realizó solamente a las 10 mejores líneas y al testigo sin transformar. Además de las líneas transgénicas que se muestran en la tabla, se evaluaron otras 90 líneas donde el porcentaje de supervivencia fue inferior al 20%.

El cultivar Cayena lisa Serrana (testigo) mostró el 100% de plantas muertas, con diferencias significativas del resto de los tratamientos, aspecto que corrobora la efectividad del tratamiento con el herbicida y la adecuada presión de selección a que se sometió el experimento.

Los signos producidos en las hojas de las plantas de piña después de la aplicación del herbicida FINALE<sup>®</sup> se muestran en la figura 5. En las plantas transgénicas de la línea 90 se observan escasas quemaduras foliares, y se aprecia la aparición de nuevas hojas como respuesta de recuperación de las plantas. En el resto de las líneas promisorias (40, 44, 46, 27) se observaron algunas quemaduras foliares y la respuesta de recuperación mostró variación en el tiempo.



**Figura 5.** Plantas de piña a los 30 días después de la aplicación del herbicida FINALE®. El clon 90 mostró los menores daños. El herbicida, en el clon transgénico 27, provocó mayores lesiones en forma de quemaduras. Se apreciaron necrosis en todas las partes de las plantas testigo.

De las cinco líneas seleccionadas como más promisorias, tres provienen de la transformación con el plásmido pHAC58 (90, 40, 27) y dos de la transformación con el pHCG59 (44, 46). A partir de 100 genotipos transgénicos, se seleccionaron solamente cinco líneas con niveles altos de tolerancia según las condiciones experimentales estudiadas. Este resultado es comparable con otros de la literatura donde los niveles de expresión de los genes foráneos son variables y altamente dependientes de la interacción genotipo - ambiente (Arencibia, 1999).

La diferencia en los niveles de actividad biológica, entendida como diferentes niveles de expresión del gen foraneo, también está relacionada al número de copias del transgen y al sitio de inserción en el genoma huésped (Birch *et al.*, 2000; Birch *et al.*, 2002). No obstante, existen ejemplos de expresión variable de los transgenes, los cuales frecuentemente no están relacionados con el número de copias (Zárate *et al.*, 2008). En este caso, en las líneas analizadas se demostró la inserción de copias únicas del gen *bar* (figura 3) y los niveles de tolerancia al FINALE<sup>®</sup> han sido variables, y predomina la susceptibilidad en el 95% de las líneas analizadas. Por esta razón ha sido propuesto que los experimentos de actividad biológica deben tener un elevado número de líneas correspondientes a eventos de transformación diferentes, esto incrementaría la probabilidad de seleccionar alguno con adecuado nivel de expresión del transgen en las condiciones específicas (Al-Kaff *et al.*, 2000b).

Otro fenómeno frecuente es el silenciamiento transcripcional que puede ser el resultado de la integración del transgén en regiones del genoma de la planta en la que ocurra metilación de ADN. El silenciamiento del gen como resultado del mecanismo transcripcional, no solo se asocia a la metilación del promotor del transgen sino que este es a menudo "post-transcripcional". El transgen se transcribe, pero el ARN resultante es inestable. Tal silenciamiento del gen es frecuentemente asociado a múltiples copias del transgen dentro de una célula (Stanton, 2003).

Confalonieri *et al.* (2000), realizaron estudios de tolerancia a herbicida en cuatro líneas transgénicas de *Populus alba* L. bajo condiciones *ex vitro*, y determinaron que, a las dos semanas después de la primera aplicación del producto, no se apreciaron signos de daños en las líneas transgénicas tratadas con 6 L/ha, todas continuaron su crecimiento y desarrollo normal. Sin embargo, observaron que las plantas tratadas a altas concentraciones del producto mostraron lesiones necrosadas en algunas de las hojas de las plantas. Las plantas testigos del presente estudio a los 30 d después de la aplicación del herbicida mostraron lesiones necrosadas en todas

las partes, también atrofia del meristemo apical, inhibición del crecimiento, y finalmente la mortalidad de las plantas.

En líneas transgénicas de caña de azúcar se comprobó por técnicas moleculares (Southern blot) la inserción del gen *bar*, y se evaluó la tolerancia al herbicida FINALE<sup>®</sup> en condiciones *ex vitro*. Las plantas no transgénicas (testigos) mostraron lesiones necrosadas, y murieron después de una semana de la aplicación del herbicida FINALE<sup>®</sup>. Sin embargo, en las plantas transgénicas se observaron signos producidos por el efecto tóxico del herbicida, pero seleccionaron de forma cualitativa las plantas que presentaron menores afectaciones (Enriquez-Obregón *et al.*, 1998).

El efecto del herbicida FINALE<sup>®</sup> en plantas de piña transformadas y no transformadas fue evaluado por Sripaoraya *et al.* (2001). El experimento fue desarrollado en condiciones de casas verdes y las concentraciones del herbicida aumentaron progresivamente hasta 1.400 mg/L. Las plantas no transformadas a partir del cuarto día comenzaron a perder la pigmentación de sus hojas, se necrosaron y a los 15 d de la aplicación comenzaron a morir. En las plantas transformadas las hojas continuaron con un desarrollo vigoroso y el herbicida no provocó afectaciones. Resultados más recientes también se informaron por este grupo que estudia una variedad Tailandesa de piña que responde favorablemente a niveles elevados del glufosinato de amonio, señalaron que las plantas de piña transformadas expuestas al estrés químico mantienen sus características fisiológicas y continúan su desarrollo y crecimiento en condiciones controladas (Sripaoraya *et al.*, 2006).

Como conclusión parcial de la etapa se logró la selección de cinco líneas de piña con buenos niveles de tolerancia al herbicida FINALE<sup>®</sup>; estas líneas pueden ser evaluadas en etapas posteriores de campo, además pueden ser incluidas como progenitores en los programas de mejoramiento de la piña.

#### **4.2.2 Actividad antipatogénica en la interacción piña-*Phytophthora* en condiciones de aclimatización.**

La evaluación realizada a los 30 d de interacción del oomicetes con las plantas de piña se muestra en la tabla 10, figura 6. Se observa la respuesta esperada en los tratamientos controles: las 15 plantas de *Bromelia pinguin* (testigo positivo) resistieron al ataque del patógeno, mientras que las plantas de Cayena lisa Serrana no transformadas (testigo negativo) tuvieron un 100% de



mortalidad. Este resultado evidencia la agresividad de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* en las plantas de piña, donde se obtuvo una alta presión de selección y los tratamientos testigos utilizados en el experimento resultaron ser efectivos. Con respecto a las líneas de piña transformadas con los vectores binarios pHAC58 (*quitinasa-AP24*) y pHAC59 (*glucanasa-quitinasa*) se obtuvo diferencia en los porcentajes de supervivencia.

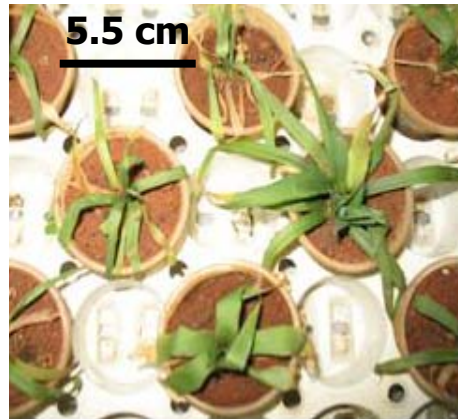
Tres líneas (90, 79, 41) fueron las de mayor resistencia al ataque del patógeno sin diferencias significativas entre los porcentajes de supervivencia. Las líneas 1 y 20 fueron seguidas en su mejor comportamiento con 66.6% de supervivencia. El resto de las líneas transgénicas se ubican en los niveles intermedios y de mayor susceptibilidad al ataque del oomicetes. Esta variabilidad de la respuesta fenotípica (síntomas) de las líneas transgénicas al ataque de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* pudiera estar relacionada a los diferentes niveles de expresión de los transgenes y también por su mecanismo de acción frente al patógeno. Los resultados de las evaluaciones se muestran solamente para algunas líneas (tabla 10).

**Tabla 10** Porcentaje de supervivencia en líneas transgénicas de piña en la interacción con *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* en condiciones de aclimatización.

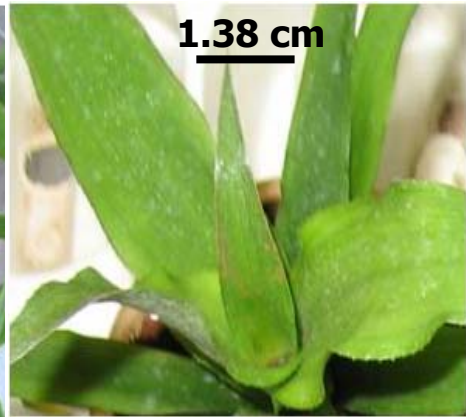
Línea	Construcción genética	Porcentaje de supervivencia (%)
90	pHAC58	83.3 b
79	pHAC58	72.7 b
41	pHCG59	72.0 b
1	pHAC58	66.6 c
20	pHCG59	66.6 c
45	pHCG59	20.0 d
53	pHCG59	20.0 d
64	pHAC58	13.0 e
19	pHCG59	13.0 e
<i>Bromelia pinguin</i>	Testigo positivo	100.0 a
Cayena lisa Serrana	Testigo negativo	0.0 f
Media general de los 100 líneas evaluadas		47.92
Error típico de la media de los 100 líneas evaluadas		4.67

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey,  $p > 0.05$ ). Para el análisis, los datos se transformaron según  $y' = 2 \cdot \arccoseno(y/100)^{0.5}$ . El procesamiento estadístico se realizó solamente a las 9 mejores líneas y al testigo sin transformar. Además de las líneas transgénicas que se muestran en la tabla, se evaluaron otras 91 líneas donde el porcentaje de supervivencia fue inferior al 20%.

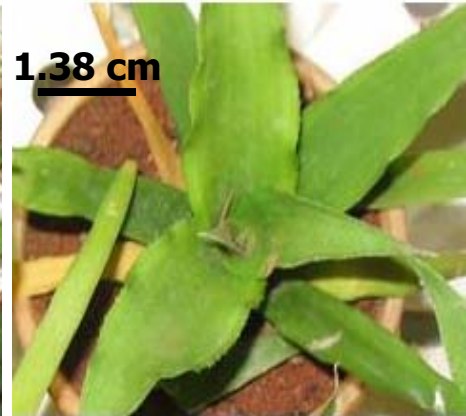
**Testigo susceptible**  
Plantas de Cayena lisa  
Serrana no transformadas



**Testigo resistente**  
Plantas de *Bromelia pinguin*



**Clon 90**  
Plantas de Cayena lisa  
Serrana transformadas  
con pHCA58



**Figura 6.** Interacción piña - *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* en el clon 90 que porta los genes *quitinasa* y *AP24* (pHAC58).

Existen escalas para la evaluación de *Phytophthora sp.* en los cultivos de papa, tomate, tabaco, (INISAV, 1978). Para el caso de la interacción piña- *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* no existe una escala evaluativa establecida. En este trabajo nos basamos solamente en el porcentaje de supervivencia de las plantas. Aunque esta variable fue efectiva para evaluar la resistencia de las líneas transgénicas de piña al ataque de *Phytophthora sp.*, se recomienda el establecimiento de una escala que permita una mejor evaluación de los niveles de resistencia. Esta herramienta puede permitir correlacionar los niveles de expresión de los genes foráneos en las líneas transgénicas.

Un trabajo de producción de líneas transgénicas que portan el gen *bar* para la tolerancia al herbicida FINALE<sup>®</sup> y los genes *quitinasa* y *glucanasa* para la resistencia a hongos fue publicado por Wang *et al.* (2003). En ese caso se utilizó el bombardeo de partículas para la co-transformación por separado de los tres genes en el pasto *A. palustris* Huds. Se detectaron niveles de ARNm para el gen *bar* en 15 líneas, sin embargo, solo se identificaron transcritos de *quitinasa* en cinco líneas y en ningún caso se identificaron transcritos de *glucanasa*. En las cinco líneas que hubo co-transformación *bar-quitinasa* se observó protección contra los hongos *Rhizoctonia solana* y *Sclerotinia homoeocarpa* solamente cuando se aplicó 0.5% del herbicida antes de la infección de los patógenos.

Para el caso del trigo se publicó el uso de los genes *quitinasa*, *glucanasa* y *taumatina* en el bombardeo de callos del cultivar Sumai-3 susceptible a *Fusarium graminearum* (Anand *et al.*, 2003). Se obtuvieron 24 líneas co-transformadas y en 20 de ellas se demostró el silenciamiento de los genes en la segunda generación. En condiciones de campo una línea mostró niveles moderados de resistencia al patógeno.

Otros resultados del uso de la Ingeniería Genética para mejorar la resistencia a hongos fitopatógenos incluye la estrategia del uso de las proteínas relacionadas con la patogenicidad y fueron descritos por Punja (2001). Se obtuvo un incremento de la resistencia de plantas de tabaco transformadas con el gen *pr-n*, que codifica para la enzima  $\beta$ -(1,3)-glucanasa, cuando las expusieron a la infección con *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica* a través de las hojas (Lusso y Kuc, 1996). También en el sistema de interacción tabaco-*Phytophthora parasitica*, Yoshikawa *et al.* (1993) obtuvieron resultados similares de incremento de la resistencia al sobreexpresar la actividad de la misma enzima en plantas de tabaco. De igual forma, se ha demostrado un

incremento de la resistencia en alfalfa frente a *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*, con la enzima con actividad  $\beta$ -(1,3)-glucanasa (Masoud *et al.*, 1996).

A pesar de que la pared celular de los oomicetes, como *Phytophthora* sp., contiene predominantemente (1,3) y (1,6)  $\beta$ -glucano y carece de quitina, o solo la presenta en muy pequeñas cantidades (Ruiz, 1992), también se ha comprobado la inducción diferencial de ambas enzimas *in vivo* en respuesta a la infección con algunas especies de *Phytophthora*, tanto en interacciones compatibles como incompatibles; y en modelos *in vitro* de cultivo de suspensiones celulares. Sin embargo, no se conoce totalmente el papel desempeñado por la enzima quitinasa, en la defensa del hospedero frente a patógenos carentes de quitina en su pared celular, como los oomicetes (Groten y Barz, 2000).

Las plantas capaces de responder activamente y sobrevivir a la infección por *Phytophthora* sp., generalmente desarrollan una respuesta defensiva inducida por la acción de elicitores derivados del patógeno o mediada por la interacción entre genes de avirulencia del patógeno con genes de resistencia de la planta (Tyler, 2002).

Según los resultados obtenidos en esta investigación, se puede considerar que el potenciamiento de la resistencia a la infección por *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* en las líneas transgénicas seleccionadas, puede deberse a la sobreexpresión de la combinaciones de genes codificadores de proteínas de resistencia utilizadas. En varios sistemas de interacción planta-patógeno representados por *Phytophthora* sp. se ha caracterizado la inducción de respuesta de defensa mediada por la liberación de elicitores desde el patógeno. Estos elicitores son reconocidos como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP). Los PAMP son moléculas o motivos dentro de estructuras macromoleculares esenciales de los patógenos, altamente conservadas y no sometidas a la diversificación evolutiva, que son reconocidos por los hospederos como una señal de peligro frente a la cual deben responder defensivamente (Gaulin *et al.*, 2006). Hasta el momento todos los PAMP identificados en las diferentes especies de *Phytophthora* son compuestos derivados de la pared celular del oomicetes motivados por proteínas presentes en la pared celular o secretadas, al ser por lo tanto accesibles a los receptores de la superficie de las células del hospedero.

Aunque hasta el momento no se ha identificado ningún elicitador oligosacárido o de otra naturaleza que se derive de los componentes de la pared celular y actúe en la interacción piña-*Phytophthora*; es probable que los fragmentos de glucanos liberados de la pared celular actúen como elicitores

de mecanismos defensivos. Durante la interacción del patógeno con las líneas transgénicas 41 y 20 la actividad incrementada de la enzima  $\beta$ -1,3 glucanasa pudiera liberar pequeños fragmentos de glucano que posibilita el reconocimiento efectivo del patógeno.

Por otra parte, la respuesta de las líneas transgénicas 90, 79 y 1 está relacionada con la AP24 que es una proteína considerada PR-5. El modo de acción exacto de las proteínas como la AP24 en la tolerancia a las enfermedades no está bien dilucidado (Hernández *et al.*, 2005). Las proteínas de la familia PR-5 no han mostrado ninguna actividad bioquímica, aunque si exhiben actividad antipatogénica.

De las cinco líneas seleccionadas por sus mayores niveles de resistencia a la pudrición del corazón causada por *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, las líneas 90, 79 y 1 tenían los genes *quitinasa* y *AP24* (pHAC58), mientras la 41 y la 20 con la combinación *glucanasa* y *quitinasa* (pHCG59). De esta etapa se concluye que estas combinaciones de genes originan niveles de protección ante el patógeno que permiten sean recomendadas para su uso como una estrategia de mejoramiento en el programa de mejora de la piña. Se resalta que la línea 90 fue la de mejores resultados para la tolerancia al herbicida FINALE<sup>®</sup> por lo que fue seleccionada para una caracterización más integral.

### **4.3 Caracterización de plantas transgénicas.**

#### **4.3.1 Efectos secundarios bioquímicos de la transformación genética en plantas de piña en fase de aclimatización.**

La figura 7 muestra el efecto de la transformación genética en el crecimiento de las vitroplantas (masa fresca, altura de la planta y supervivencia), durante la aclimatización a los 0, 15 y 30 d de cultivo. Se observó que la transformación genética no afectó los indicadores de crecimiento evaluados. Tampoco hubo diferencias significativas en los dos grupos de plantas cuando se evaluó la supervivencia durante la fase de aclimatización.

Por otra parte en la figura 8 se presenta el efecto de la transformación genética en los niveles endógenos de aldehídos, clorofilas, fenoles, proteínas y actividad peroxidasa. No se encontró diferencias significativas en la actividad peroxidasa. Sin embargo, las diferencias estadísticas más consistentes entre las plantas transformadas y no transformadas se observaron en los niveles de malondialdehído, otros aldehídos, clorofilas *b* y totales.