



Nº 183 Mayo de 2016

avances



Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite - Cenipalma ISSN 0123-8353



Transformación genética de *Phytophthora palmivora*: una herramienta útil para la cuantificación y seguimiento histológico de la Pudrición del cogollo en palma de aceite

Juan Camilo Ochoa¹, Hernán Mauricio Romero^{1, 2*}

¹ Programa de Biología y Mejoramiento de la Palma, Cenipalma

² Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia

* Autor para correspondencia. E-mail: hromero@cenipalma.org

Notas del Director

El cultivo de palma de aceite en Colombia presenta actualmente varias problemáticas fitosanitarias, siendo la Pudrición del cogollo (PC) la principal enfermedad que lo afecta ya que ha generado enormes pérdidas para el sector. Una solución es la búsqueda de fuentes de resistencia en *Elaeis guineensis*, lo cual implica procesos de mejora vegetal que pueden tomar varios años. Para acelerar los procesos de mejoramiento genético, la ampliación del conocimiento de la biología del patógeno y el proceso de infección, constituyen un factor clave para crear pruebas de selección en fases tempranas de desarrollo, que permitan identificar materiales resistentes o susceptibles. El área de Biología Molecular de Cenipalma ha comenzado a investigar las particularidades de *P. palmivora* haciendo uso de metodologías de transformación genética. Estas estrategias han sido de gran utilidad en el campo de la fitopatología, en otras especies vegetales afectadas por patógenos similares.

Esta investigación se centra en la primera etapa de estandarización de un proceso que permite la transformación de *P. palmivora* en un organismo fluorescente. La transformación genética de un microorganismo es un proceso que comprende una serie de pasos que deben engranarse en un orden muy preciso; al fin y al cabo, se trata de integrar al genoma un gen foráneo. Una vez se logra esto, el reto es mantener el gen introducido en perfecta armonía con todas las funciones biológicas y vitales del organismo receptor.

La visualización de aislamientos fluorescentes de *P. palmivora* durante un ciclo de infección brinda una nueva dimensión al seguimiento de su interacción con los tejidos vegetales y constituye una ganancia en el dominio de herramientas biotecnológicas, que pueden ser utilizadas en el mejoramiento genético del cultivo de palma de aceite.

José Ignacio Sanz Scovino, Ph.D.

Director General de Cenipalma

Introducción

La Pudrición del cogollo (PC) es la principal enfermedad que afecta a la palma de aceite en Colombia y países latinoamericanos en donde se cultiva, y su causante es el microorganismo *Phytophthora palmivora* (Drenth *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2010; Sarria *et al.*, 2015). La asociación de este microorganismo como agente causal de la enfermedad fue confirmada por investigadores de Cenipalma mediante diversos trabajos de investigación, realizados desde hace aproximadamente 10 años. Los principales resultados de dichos trabajos fueron la caracterización precisa de los síntomas de la enfermedad, la obtención de diferentes aislamientos a partir de material infectado, la reproducción de síntomas mediante inoculaciones artificiales y la caracterización de la infección mediante microscopía óptica y electrónica de barrido (Torres *et al.*, 2010; Sarria *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010; Sarria *et al.*, 2015). Los resultados de estas investigaciones son muy importantes para continuar con estudios enfocados en complementar la descripción precisa del proceso de infección, desarrollo de metodologías que permitan identificar posibles fuentes de resistencia en diferentes materiales de palma de aceite, y encaminar las prácticas agronómicas para el control y manejo de la enfermedad.

Una metodología ampliamente utilizada para la cuantificación y caracterización de enfermedades, principalmente aquellas causadas por hongos u oomicetes, consiste en evaluar el crecimiento del patógeno mediante observaciones al microscopio de órganos vegetales infectados (Chen *et al.*, 2003; Bottin *et al.*, 1999).

- Este tipo de observaciones, además de permitir una descripción detallada del proceso de infección, puede ayudar a diferenciar variedades de plantas que puedan tener mayores niveles de resistencia o susceptibilidad (Kamoun *et al.*, 1998). En palma de aceite, Sarria *et al.* (2015) realizaron la caracterización histopatológica del patógeno mediante microscopía óptica y electrónica de barrido, con lo cual se logró determinar el tiempo aproximado que le toma a *P. palmivora* completar su ciclo de vida durante el proceso infectivo, e identificar los tejidos y estructuras más importantes en el proceso de colonización.

Una de las maneras más utilizadas para visualizar el crecimiento de un patógeno en el tejido vegetal infectado, consiste en hacer que el microorganismo produzca su propia coloración y así facilitar su observación al microscopio. El principal colorante utilizado para estas observaciones se conoce como proteína verde fluorescente o Green Fluorescent Protein (GFP, por sus siglas en inglés) esta proteína ha llegado a revolucionar de tal manera los estudios de microscopía, que los investigadores que la descubrieron y desarrollaron recibieron el premio Nobel de química en 2008 (Chalfie, 2009).

El gen (fragmento de ADN o material genético) que produce la GFP fue aislado de una medusa conocida como *Aequorea victoria* y ha sido ampliamente utilizado en diferentes organismos como nemátodos, plantas, insectos, mamíferos, peces, entre otros (Chalfie, 2009). Para poder utilizar la GFP como marcador, se debe incluir el gen del que se produce esta proteína en el material genético de las células del organismo que será marcado. Por esta razón, se debe contar con un procedimiento que permita incluir material genético externo al genoma del organismo de interés; este tipo de procedimientos se conoce como transformación genética o transgénesis. El primer organismo de la clase oomicetes en ser transformado genéticamente de forma reproducible fue *Phytophthora infestans*, causante de diversas enfermedades en plantas de la familia solanácea (papa, tomate) (Judelson *et al.*, 1993). Posteriormente otras especies del género *Phytophthora* han sido transformadas y se han desarrollado diferentes metodologías con el mismo objetivo. Sin embargo, el éxito de transformación varía entre las diferentes especies e incluso dentro de aislamientos de la misma especie (Judelson & Ah-Fong, 2010). Específicamente, en *P. palmivora* existen dos trabajos publicados respecto a la transformación genética; el primero de ellos data de 1999 y se basa en la producción de protoplastos (células carentes de pared celular), e inclusión de li-

posomas que contienen el material genético de interés (Van West *et al.*, 1999). Esta metodología resultó exitosa en términos de cantidad de colonias transformadas obtenidas. Sin embargo tiene dos fuertes desventajas: i) la producción y regeneración de protoplastos algunas veces afecta la virulencia del patógeno y ii) dos de los reactivos requeridos para el procedimiento se encuentran descontinuados (Judelson & Ah-Fong, 2010, Dunn *et al.*, 2013).

La segunda metodología reportada para la transformación de *P. palmivora*, se basa en la transferencia de material genético mediante el uso la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Cabe anotar que los investigadores que la llevaron a cabo se centraron en la optimización para *P. infestans* y falta investigación para perfeccionarla en *P. palmivora* (Vijn & Govers, 2003). *A. tumefaciens* es una bacteria que comúnmente se encuentra en el suelo o causando enfermedades en plantas, cuyo principal síntoma es la formación de tumores. Este microorganismo ha revolucionado la ingeniería genética (principalmente vegetal) debido a que tiene un mecanismo por el cual puede integrar material genético propio al genoma o material genético de células de otro organismo, gracias a esto se le conoce como el ingeniero genético por naturaleza (revisado por Nester 2014).

En la actualidad, existen moléculas de ADN conocidas como plásmidos binarios, los cuales son moléculas circulares que son transferidas por *A. tumefaciens* al organismo que quiere transformarse, para lograr un organismo que contenga un fragmento de ADN exógeno en su genoma. Una característica esencial de este tipo de plásmidos es que tenga un gen que permita seleccionar las células transformadas exitosamente de aquellas que no se transformaron. Usualmente estos genes confieren resistencia a un antibiótico conocido como “antibiótico de selección”. Por esta razón, es necesario establecer la concentración de antibiótico requerida para un proceso de selección de células transformadas; esto se conoce como determinación de la concentración mínima inhibitoria.

El objetivo de la presente investigación consiste en establecer la concentración mínima inhibitoria del antibiótico de selección G418 y optimizar la transformación genética de *P. palmivora* mediada por *A. tumefaciens* en aislamientos colombianos de *P. palmivora* obtenidos de plantas con PC. Lo anterior con el propósito de mejorar el conocimiento que se tiene de la enfermedad mediante inclusión de proteínas fluorescentes para caracterización histológica y, a su vez, desarrollar nuevas

metodologías encaminadas a la diferenciación de materiales resistentes y susceptibles de palma de aceite a la Pudrición del cogollo.

Materiales y métodos

Aislamientos de *Phytophthora palmivora*

Los aislamientos PCZC145 y PCTu439 se obtuvieron de las colecciones realizadas por el grupo de plagas y enfermedades de Cenipalma. Los cultivos de *P. palmivora* se incubaron en medio V8 clarificado al 20 % a 25 °C de temperatura y fotoperiodo 12h/12h aproximadamente. Los experimentos de transformación se realizaron partiendo de entre 7 y 10 cajas de cultivo de 15 cm de diámetro.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria al antibiótico de selección G418

La evaluación de sensibilidad a G418 se realizó colocando 40 µl de una solución de zoosporas, a una concentración entre 10^4 y 10^6 zoosporas/ml sobre un pozo abierto en el centro de las cajas petri con medio sólido V8 o medio Plich. La evaluación en medio V8 clarificado se realizó bajo las siguientes concentraciones de G418: 10 µg/ml, 12 µg/ml, 14 µg/ml, 16 µg/ml, 18 µg/ml y 20 µg/ml y para el medio de selección Plich utilizando las siguientes concentraciones: 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 7,5 µg/ml, 10 µg/ml y 15 µg/ml. El seguimiento de crecimiento en las colonias se realizó durante 12 días después de la siembra a 25 °C.

Plásmido utilizado

El plásmido pNPTII, utilizado para el procedimiento de transformación fue donado por la Dra. Francine Govers, de la universidad de Wageningen en Holanda (Vijn & Govers, 2003) (Figura 1).

Transformación de *Phytophthora palmivora* (Adaptado de Vijn & Govers, 2003)

Para la transformación genética de *P. palmivora* se cosecharon esporangios con solución petri fría de cultivos

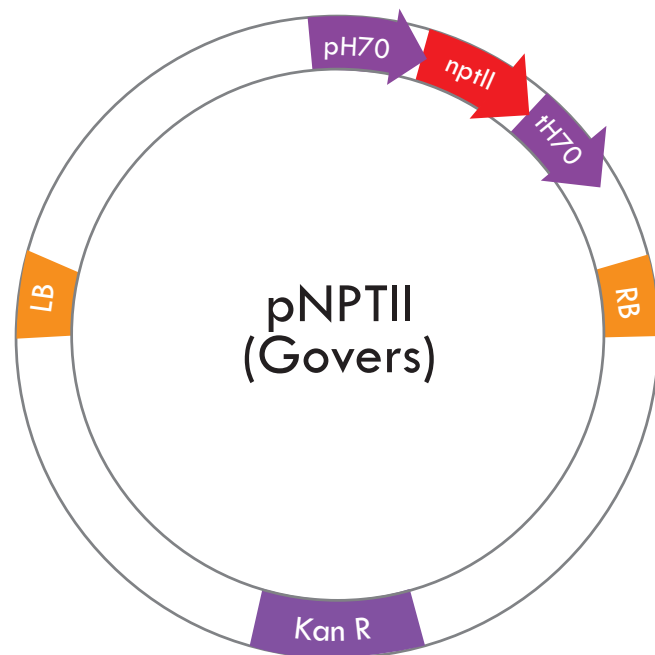


Figura 1. Esquema general del plásmido binario utilizado para la transformación de *P. palmivora*. LB: Left Border, RB: Right Border, nptII: Neomycin Phosphotransferase II (confiere resistencia al antibiótico de selección G418), Kan R+: Resistencia bacteriana a kanamicina.

de entre 10 y 13 días del microorganismo en medio V8. Posteriormente se realizó la liberación de zoosporas colocando la suspensión en agitación tridimensional a temperatura ambiente bajo luz constante por aproximadamente 30 minutos. Este cultivo se infectó con 1 ml de un cultivo de *A. tumefaciens* transformado con el vector pNPTII, luego se realizó el cultivo de las zoosporas inoculadas en medio de cocultivo durante cinco días a 25 °C en oscuridad. Finalmente, se realizó la selección de los transformantes en medio plich suplementado con el antibiótico de selección G418. La confirmación molecular de las colonias transformantes se realizó mediante las técnicas moleculares PCR, RT-qPCR y Southern Blot del gen marcador de selección nptII.

Evaluación molecular de los transformantes obtenidos

Las extracciones de ADN se realizaron con el kit de extracción de Thermo Scientific, las reacciones de PCR se realizaron bajo condiciones estándar del laboratorio de biología molecular de Cenipalma. Las extracciones de ARN se realizaron con el kit RNeasy mini marca Qiagen, posteriormente estos se trataron con ADNase,

- marca Thermo Scientific™, de acuerdo con las recomendaciones de uso de la casa comercial. Finalmente, se realizó la síntesis de ADNc con la enzima Super Script III marca Invitrogen®.

Para la realización del Southern Blot se digirieron 20µg ADN con la enzima de restricción HindIII. La transferencia del ADN a la membrana de nailon se elaboró mediante capilaridad en buffer SSC20X por 16 horas, la hibridación y síntesis de la sonda se realizó con los kit de síntesis de sonda mediante PCR y detección marca Roche®, de acuerdo con las recomendaciones de uso de la casa comercial.

Resultados y Discusión

Determinación de la concentración mínima inhibitoria del antibiótico de selección G418 en los aislamientos PCZC145 y PCTu 439

Antes de realizar un experimento de transformación genética en una célula se debe determinar la concentración ideal (mínima) del antibiótico de selección (que está incluido en la molécula de ADN insertada), con el cual se inhibe la proliferación celular. Lo anterior permite seleccionar las células que en efecto contienen el fragmento de ADN de interés (células transformadas genéticamente) de las que no lo tienen. En *P. palmivora*, la determinación de la concentración mínima inhibitoria del antibiótico G418 se realizó para los aislamientos PCZC145 y PCTu439 en los medios Plich y V8 clarificado, sobre una suspensión de zoosporas obtenida a partir de las cajas de cultivo sin transformar. El crecimiento del micelio se monitoreó macroscópicamente durante 12 días después de la siembra (Figura 2).

Como se observa en la Figura 2, para el aislamiento PCZC 145 la concentración mínima inhibitoria del antibiótico G418 en medio Plich corresponde a 7,5µg/ml. Este tipo de evaluaciones también se realizaron en medio V8 clarificado y para el aislamiento PCTu439 (Tabla 1). El resultado de los ensayos arrojó que los diferentes aislamientos requieren diferentes concentraciones de G418 para poder ser seleccionados; adicionalmente se requiere de mayor concentración de antibiótico de selección en medio V8 clarificado, probablemente por su mayor contenido de nutrientes.

Tabla 1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de G418 en los diferentes medios evaluados.

Concentración mínima inhibitoria		
Aislamiento	Medio Plich	Medio V8 Cl.
PCTu439	10µg/ml	20µg/ml
PCZC145	7,5µg/ml	16µg/ml

Transformación de *P. palmivora* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido nptII

Para el ensayo de transformación genética se utilizaron las cepas de *A. tumefaciens* LBA4404 y AGL1 y los aislamientos de *P. palmivora* PCTu 439 y PCZC 145. Para cada interacción cepa x aislamiento se obtuvieron cuatro cajas de cultivo en medio de inducción con las membranas de nailon y se repartieron en 16 cajas de medio de selección Plich suplementado con 7,5 µg/ml de G418 como antibiótico de selección y cefotaxime 200 µg/ml para controlar el crecimiento de *A. tumefaciens*. Las cajas con medio de selección se incubaron durante siete días en oscuridad a 28 °C, solo en la interacción PCZC 145 con la cepa de *A. tumefaciens* AGL1 se observaron colonias con aspecto normal en el medio de selección (Figura 3A).

Un total de nueve colonias del aislamiento de *P. palmivora* PCZC145 transformado con la cepa de *A. tumefaciens* AGL1 presentaron crecimiento en el medio de selección y fueron transferidos a medio V8 clarificado suplementado con G418 16µg/ml como antibiótico de selección y cefotaxime 200 µg/ml y vancomicina 25 µg/ml para control de *A. tumefaciens* (Figura 3B). Una semana después de la siembra se observó un crecimiento y aspecto normal en las colonias, por lo cual se transfirieron a medio V8 líquido suplementado con los mismos antibióticos. El micelio se mantuvo en crecimiento durante una semana en agitación a 250 rpm a 28 °C y posteriormente se cosechó para realizar extracción de ADN. El ADN extraído se utilizó para la elaboración de un PCR que amplificará el marcador de selección nptII, para determinar cuáles de los aislamientos contie-

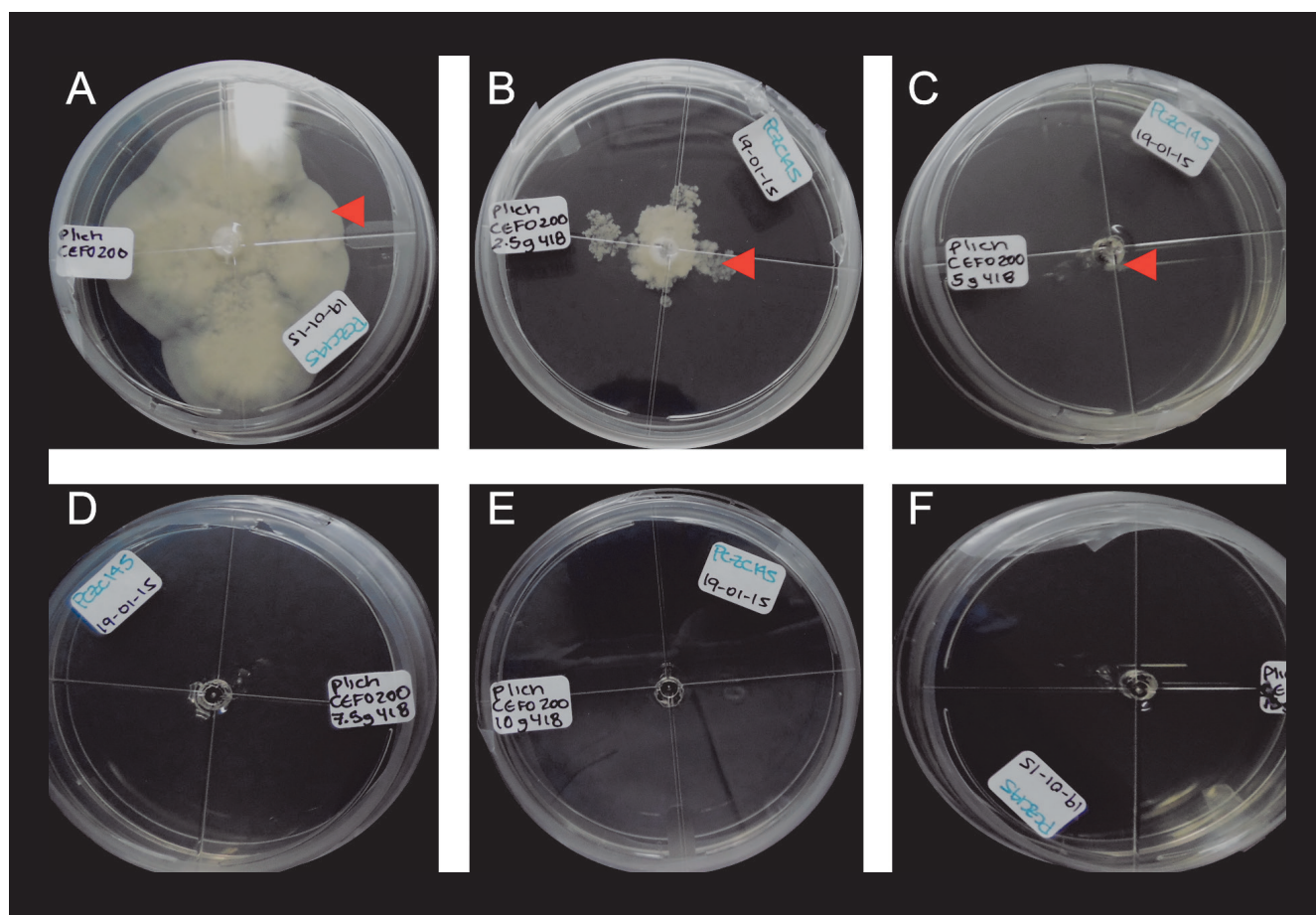
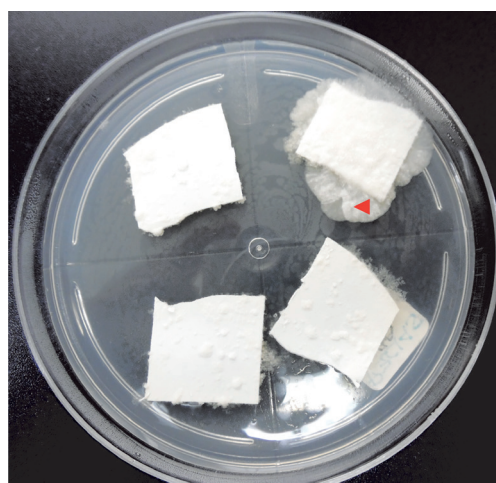
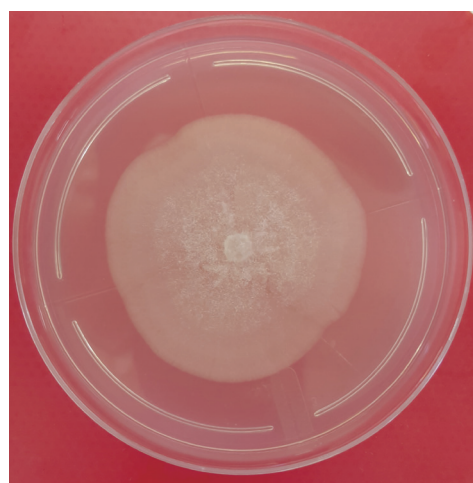


Figura 2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de G418 en medio Plich, del aislamiento de *P. palmivora* aislamiento PCZC 145. A) Sin antibiótico de selección G418, B) concentración de 2.5 µg/ml, C) 5 µg/ml, D) 7.5 µg/ml, E) 10 µg/ml y F) 12.5 µg/ml. Las flechas rojas señalan el micelio observado sobre el medio de cultivo.



A.



B.

Figura 3. Colonias de *P. palmivora* obtenidas durante la transformación. A) La flecha roja señala el crecimiento de una colonia transformante en medio de selección Plich. B) Colonia transferida a medio V8 suplementado con 16 µg/ml de G418 a 6 días después de la siembra.

nen la molécula de ADN. Adicionalmente se realizó un PCR con los *primers* yph1s/2a como control positivo de amplificación de las muestras de ADN, ya que amplifican un gen contenido naturalmente en *P. palmivora* (gen endógeno) (Figura 4).

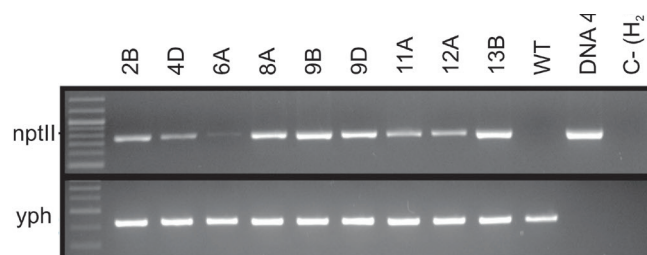


Figura 4. PCR del marcador *nptII* en los transformantes obtenidos con *A. tumefaciens*. WT: Control con ADN de aislamiento sin transformar.

En la Figura 4 se observa que nueve de los nueve posibles transformantes de *P. palmivora* contienen el marcador de selección, indicándonos que el procedimiento de transformación fue exitoso. Seguido de la evaluación molecular por PCR, se iniciaron ensayos para determinar la expresión del gen *nptII*, el cual codifica para la proteína que confiere resistencia al antibiótico G418.

De todos los posibles transformantes obtenidos se logró obtener ARN totalmente libre de ADN, este ARN se utilizó como molde para realizar la síntesis de primera cadena de ADN complementario (ADNc). Para verificar la síntesis de ADNc se realizó un PCR con los *primers* yph1s/2a los cuales tienen la ventaja de amplificar un tamaño diferente si el ADN molde es ADNg (400pb aprox.) o ADNc (150pb aprox.). Como se observa en la Figura 5, el ADNc de todos los transformantes obtenidos se sintetizó correctamente, en consecuencia se procedió con determinar la expresión del gen marcador de selección *nptII*. Los resultados de expresión del marcador de selección en todos los transformantes indicaron la transcripción correcta del gen *nptII*, con excepción del 12A, lo cual puede deberse a que este se expresa de forma muy baja por su localización en el genoma y los niveles no son detectables mediante esta técnica. Adicionalmente, se observó que tanto el control WT (colonia de *P. palmivora* no transformada) como los controles positivos y negativos de la reacción se comportaron satisfactoriamente.

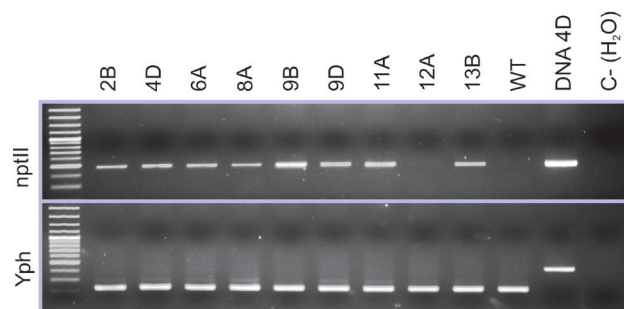


Figura 5. Expresión del gen marcador de selección *nptII* en los transformantes obtenidos. WT: Control con ADN de aislamiento sin transformar.

Para culminar con la evaluación molecular de los transformantes se procedió a realizar la técnica Southern Blot, la cual tiene las siguientes ventajas; i) baja sensibilidad y en consecuencia una probabilidad nula de tener falsos positivos, ii) determina el número mínimo de copias del material genético exógeno por integraciones en genoma, iii) confirma la integración del ADN exógeno en el genoma. En la Figura 6 se observan diferentes eventos de transformación con inserciones sencillas (una banda) o múltiples (dos o más bandas). Adicionalmente se puede concluir que existe integración estable en el genoma de *P. palmivora*, lo cual indica que se obtuvieron exitosamente transformantes del aislamiento PCZC145.

Los resultados en conjunto demuestran que es posible la transformación de aislamientos colombianos de *Phytophthora palmivora* con *A. tumefaciens*. En los aislamientos transformados obtenidos, se logró detectar las integraciones estables en el genoma y la expresión de los genes exógenos (gen *nptII*). Adicionalmente se observó un crecimiento macroscópico y microscópico normal en los aislamientos transformados obtenidos, y su estabilidad a través de pases sucesivos en medio de selección.

Conclusión

Mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens* se lograron insertar fragmentos de ADN de interés en el genoma de *Phytophthora palmivora*. Esta metodología es de gran utilidad para mejorar la caracterización histológica del proceso infeccioso de la enfermedad, y a su vez puede ser utilizada como una

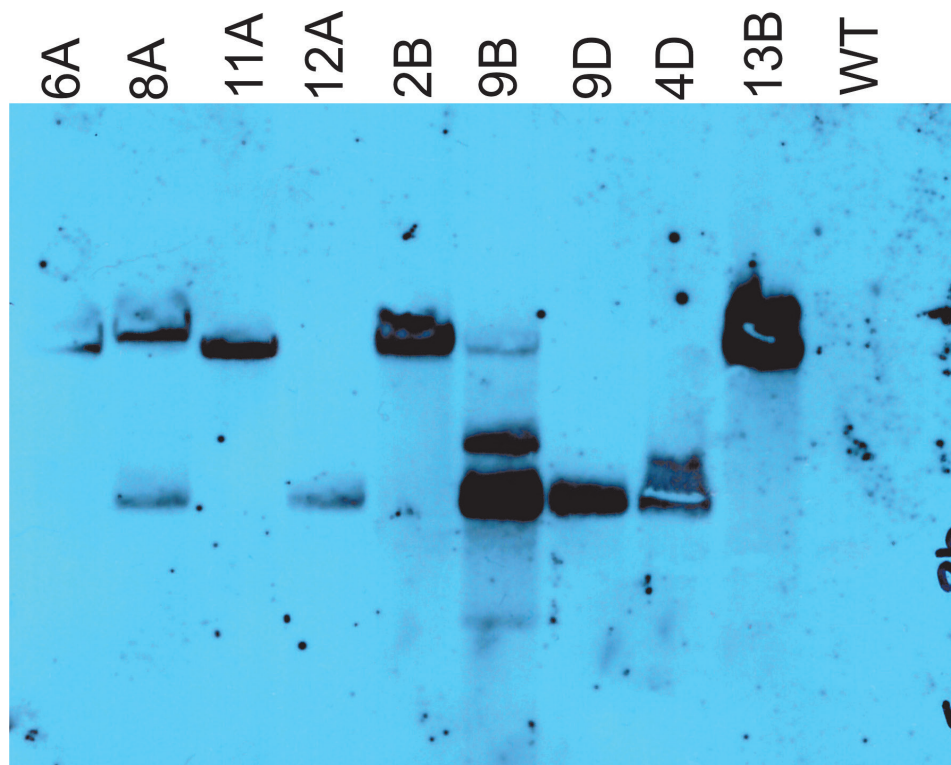


Figura 6. Southern blot realizado a las colonias transformantes obtenidas durante el ensayo de transformación. WT: Aislamiento no transformado.

herramienta más en el desarrollo de protocolos que permitan la evaluación de materiales de palma de aceite, con mayores probabilidades de presentar resistencia a la Pudrición del cogollo.

Agradecimientos

Se agradece al Programa de Plagas y Enfermedades de Cenipalma, por proveer amablemente los aislamientos de *P. palmivora*, y a los auxiliares de laboratorio D. Guevara, D. Ramos y J. Tafur por brindar su apoyo en la realización de los experimentos. Este trabajo es financiado por Colciencias Contrato 713-2011 y el Fondo de Fomento Palmero administrado por Fedepalma.

Bibliografía

Bottin A, Larche L, Villalba F, Gaulin E, Esquerré-Tugayé M-T, Rickauer M, 1999. Green fluorescent protein (GFP) as gene expression reporter and vital marker for

studying development and microbe-plant interaction in the tobacco pathogen *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *FEMS Microbiology Letters* **176**, 51-6.

Chalfie M, 2009. GFP: Lighting up life. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 10073-80.

Chen N, Hsiang T, Goodwin P, 2003. Use of green fluorescent protein to quantify the growth of *Colletotrichum* during infection of tobacco. *Journal of Microbiological Methods* **53**, 113-22.

Drenth A, Torres GA, López GM, 2013. *Phytophthora palmivora*, la causa de la Pudrición del cogollo en la palma de aceite. *Palmas* **34**, 8.

Dunn AR, Fry BA, Lee TY, et al., 2013. Transformation of *Phytophthora capsici* with genes for green and red fluorescent protein for use in visualizing plant-pathogen interactions. *Australasian Plant Pathology* **42**, 583-93.

Judelson H, Coffey M, Arredondo F, Tyler B, 1993. Transformation of the oomycete pathogen *Phytophthora*

● *megasperma* f. sp. *glycinea* occurs by DNA integration into single or multiple chromosomes. *Current Genetics* **23**, 211-8.

Judelson HS, Ah-Fong AMV, 2010. Progress and challenges in oomycete transformation. In: Lamour K, Kamoun S, eds. *Oomycete genetics and genomics*. United States: Wiley - Blackwell, 20.

Kamoun S, Van West P, Govers F, 1998. Quantification of late blight resistance of potato using transgenic *Phytophthora infestans* expressing β -glucuronidase. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 521-5.

Martínez G, Sarria GA, Torres GA, Varón F, 2010. *Phytophthora palmivora* es el agente causal de la Pudrición del cogollo de la palma de aceite. *Palmas* **31**, 11.

Nester EW, 2014. Agrobacterium: nature's genetic engineer. *Frontiers in plant science* **5**.

Sarria G, Martinez G, Varon F, Drenth A, Guest D, 2015. Histopathological studies of the process of *Phytophthora*

palmivora infection in oil palm. *European Journal of Plant Pathology*, 1-13.

Sarria GA, Torres GA, Aya HA, et al., 2008. *Phytophthora* sp. es el responsable de las lesiones iniciales de la Pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite en Colombia. *Palmas* **29**.

Torres GA, Sarria GA, Varon F, Coffey MD, Elliott ML, Martinez G, 2010. First Report of Bud Rot Caused by *Phytophthora palmivora* on African Oil Palm in Colombia. *Plant Disease* **94**, 1163-.

Van West P, Reid B, Campbell TA, et al., 1999. Green fluorescent protein (GFP) as a reporter gene for the plant pathogenic oomycete *Phytophthora palmivora*. *FEMS Microbiology Letters* **178**, 71-80.

Vijn I, Govers F, 2003. Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Pathol* **4**, 459-67.



Director general: José Ignacio Sanz Scovino, Ph.D.
Revisión de textos: Comité de Publicaciones de Cenipalma
Coordinación editorial: Yolanda Moreno Muñoz - Esteban Mantilla
Diagramación: Jenny Angélica Ramírez Jácome
Impresión: Javegraf

Esta publicación contó con el apoyo de Fedepalma y el Fondo de Fomento Palmero