



## CIENCIAS AGRARIAS Y DE LA PESCA

### Artículo Original de Investigación

# Evento de modificación de soya transgénica para mayor resistencia a la roya asiática

Natacha Soto Pérez <sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0366-924X>  
Gil Alberto Enríquez Obregón <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9502-2760>  
Yuniet Hernández Avera <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8058-1033>  
Celia Delgado Abad <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6493-3753>  
Yamilka Rosabal Ayan <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-2819-767X>  
Rodobaldo Orti10z Pérez <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7266-7929>  
Merardo Pujol Ferrer <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5429-7095>  
Aleines Ferreira Fabrè <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2461-7481>  
Abel Hernández Velázquez <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4664-5192>

<sup>1</sup> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). La Habana, Cuba

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Mayabeque, Cuba

\*Autor para la correspondencia: [natacha.soto@cigb.edu.cu](mailto:natacha.soto@cigb.edu.cu)

### RESUMEN

**Introducción.** La roya asiática causada por el hongo *Phakopsora pachyrhizi* es la enfermedad más destructiva que afecta a la soya. El desarrollo de plantas transgénicas que portan defensinas ha ofrecido una alternativa para proteger al cultivo frente a hongos patógenos. Las defensinas son pequeños péptidos antimicrobianos presentes en las plantas, que han desempeñado un rol en su mecanismo de defensa natural. **Métodos.** Se transformaron ejes embriogénicos de soya con el gen de defensina *NmDef02* aislado de *Nicotiana megalosiphon* mediante una metodología de transformación por balística optimizada que selecciona brotes resistentes al herbicida glifosato. Los clones transgénicos se analizaron molecularmente. Se evaluó la nodulación en plantas transgénicas inoculadas con la bacteria fijadora de nitrógeno *Bradyrhizobium japonicum*. Los clones transgénicos se evaluaron en campo frente a la infección natural con *P. pachyrhizi*, con licencia del Centro Nacional de Seguridad Biológica. **Resultados.** Se obtuvieron clones transgénicos resistentes a glifosato con elevada eficiencia de transformación. Se confirmó la integración y expresión del transgen mediante PCR, Southern blot y qRT-PCR. Se logró la nodulación en raíces de plantas transgénicas inoculadas con la bacteria *B. japonicum*. La expresión constitutiva del gen *NmDef02* en los clones transgénicos indujo una elevada resistencia a *P. pachyrhizi* en campo, siendo superior en las plantas del clon Def1. **Conclusiones.** Por vez primera se transformaron plantas de soya con defensina, mediante una metodología de transformación adaptada a genotipos cubanos. La expresión del transcripto en plantas de soya no afectó la nodulación por *B. japonicum*, fundamental para la fijación de nitrógeno atmosférico. Ha constituido el primer reporte de resistencia a la roya asiática en plantas transgénicas de soya que expresan la defensina *NmDef02*.

**Palabras clave:** defensina; *Phakopsora pachyrhizi*; soya; resistencia

#### Revisores<sup>a</sup>

Marisol Freire Seijo  
Instituto de Biotecnología de las Plantas.  
Universidad Central Marta Abreu de Las  
Villas. Villa Clara, Cuba

#### Editor

Amanda Gómez Bahamonde  
Academia de Ciencias de Cuba. La  
Habana, Cuba

#### Traductor

Yoañ Karell Acosta González  
Academia de Ciencias de Cuba. La  
Habana, Cuba

<sup>a</sup> N. del E.: En este apartado figuran los nombres de los árbitros que accedieron a revelar su identidad, como expresión de apertura progresiva del proceso de revisión por pares. No aparecen aquellos que optaron por el anonimato



# Modification event of transgenic soybean that confers resistance to asian rust

## ABSTRACT

**Introduction.** Asian rust caused by the *Phakopsora pachyrhizi* fungus is the most destructive disease affecting soybeans. The development of transgenic plants that carry defensins offers an alternative to protect the crop. Defensins are small antimicrobial peptides present in plants that play a role in their natural defense mechanism. **Methods.** Soybean embryonic axes were transformed with the NmDef02 defensin gene isolated from *Nicotiana glauca*, using an optimized ballistics transformation methodology that selects shoots resistant to the herbicide glyphosate. The transgenic clones were analyzed molecularly. Nodulation was evaluated in transgenic plants inoculated with the nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. The transgenic clones were evaluated in the field against natural infection with *P. pachyrhizi*, licensed by the National Center for Biological Safety. **Results and Discussion.** Glyphosate resistant transgenic clones with high transformation efficiency were obtained. Integration and expression of the transgene was confirmed by PCR, Southern blot and qRT-PCR. Efficient nodulation was achieved in roots of transgenic plants inoculated with *B. japonicum* bacterium. The severity of rust, fungal biomass and defoliation in plants were significantly lower in the transgenic clones. The constitutive expression of the NmDef02 gene in the transgenic clones induced a high resistance to *P. pachyrhizi* in the field, being higher in plants of the clone Def1. It is concluded that it is the first time that soybean plants have been transformed with a defensin, using a transformation methodology adapted to Cuban genotypes. The expression of the transcript in soybean plants does not affect nodulation by *B. japonicum*, which is essential for atmospheric nitrogen fixation. It is the first report of resistance to Asian rust in transgenic soybean plants that express the defensin NmDef02.

**Keywords:** defensin; *Phakopsora pachyrhizi*; soybean; resistance

## INTRODUCCIÓN

La soya (*Glycine max* (L.) Merr.) es un cultivo de gran importancia mundial por su significativo aporte en proteínas y aceites. En los últimos años hubo un notable incremento en la producción de soya en Cuba. <sup>(1)</sup> Sin embargo, las condiciones climáticas tropicales han favorecido la incidencia de enfermedades en este cultivo, que han afectado los rendimientos. La roya asiática causada por el hongo *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & Sydow) es la enfermedad foliar más destructiva de la soya, causa defoliación temprana afectando el peso y la calidad de las semillas. <sup>(2)</sup> El *P. pachyrhizi*, podría reducir los rendimientos en más del 80 % cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de la enfermedad. <sup>(3)</sup> La presencia de *P. pachyrhizi* en Cuba se informó en 2009. <sup>(4)</sup> Actualmente no existen cultivares de soya resistentes a esta enfermedad, los fungicidas modernos no han controlado eficazmente este patógeno y han tenido un impacto negativo en el medioambiente.

Para contrarrestar la infección por hongos, las plantas desarrollaron un sistema de inmunidad innata que ha recono-

cido la presencia del patógeno y comenzado una respuesta de defensa. Las defensinas son pequeños péptidos antimicrobianos que juegan un papel fundamental en esa inmunidad innata de las plantas. Las defensinas pueden inhibir el crecimiento de microorganismos e insectos fitopatógenos, también pueden estar involucrados en la adaptación al estrés abiótico. <sup>(5)</sup> La inhibición del crecimiento de hongos patógenos por las defensinas vegetales no está asociada a toxicidad en células de mamíferos o plantas. <sup>(6)</sup> Varios genes que codifican defensinas se aislaron de plantas silvestres y se transfirieron con éxito a cultivos de importancia económica como tabaco, tomate, papa, arroz, frijol, entre otros, produciendo resistencia a diferentes patógenos. <sup>(7,8)</sup> Las plantas de tabaco y papa transformadas con la defensina NmDef02 aislada de *Nicotiana glauca* mostraron resistencia a *Phytophthora infestans* en condiciones de invernadero y campo. <sup>(7)</sup>

En Cuba no se dispone de una metodología de transformación genética de soya y hasta el momento en la literatura científica no se ha informado de la existencia de plantas transgénicas de soya resistentes a hongos patógenos mediante la producción de defensinas. Considerando el poten-

cial antifúngico de la defensina NmDef02 y la importancia de obtener cultivares resistentes a la roya asiática, este trabajo tuvo como objetivo obtener plantas transgénicas de soya que expresen el gen de defensina NmDef02 y evaluarlas frente al hongo *P. pachyrhizi* bajo condiciones de infección natural en campo. También se evaluó la efectividad de la nodulación por *Bradyrhizobium japonicum* en plantas de soya que han portado la defensina, porque la asociación con esta bacteria es fundamental para la fijación de nitrógeno atmosférico. <sup>(1)</sup>

## MÉTODOS

### Material vegetal y plásmido utilizado

Se usaron semillas de soya (*Glycine max* (L.) cultivar DT-84 suministradas por el INCA. Se utilizaron ejes embriogénicos de semillas maduras como explantes para su transformación por bombardeo, según la metodología establecida en el laboratorio. <sup>(9)</sup> El vector pCP4EPS-DEF que porta los genes *cp4epsps* y *NmDef02* se utilizó para la transformación genética. <sup>(10)</sup>

### Transformación, selección y regeneración de plantas

Se bombardearon 150 explantes con el vector pCP4EPS-DEF y se seleccionaron en medio MSB5 con 20 mg/L de glifosato. Los controles DT-84 sin bombardear se cultivaron en las mismas condiciones. Los brotes regenerados se transfirieron a MSB5 sin selección para el enraizamiento. <sup>(9)</sup> Las plantas se pasaron a macetas con materia orgánica y zeolita en un invernadero para obtener las semillas de la generación T<sub>1</sub> y las siguientes generaciones. Se aplicó glifosato (360 g/L) para seleccionar plantas resistentes.

### Análisis de la integración del gen NmDef02 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se aisló ADN genómico total de los clones transgénicos y del control no transgénico, utilizando el protocolo CTAB. <sup>(11)</sup> La mezcla de la reacción, condiciones de PCR y cebadores para el gen de la defensina se describieron previamente. <sup>(10)</sup> Los productos de la reacción se chequearon en gel de agarosa 2 %.

### Expresión relativa del gen NmDef02 mediante qRT-PCR

Se extrajo ARN total de 6 clones transgénicos y del control por protocolo Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, EEUU). El ADNc se sintetizó por el kit Super-Script III (Invitrogen, EEUU). Las reacciones y condiciones para determinar la expresión relativa de la defensina mediante qRT-PCR, se describieron previamente. <sup>(10)</sup>

Se utilizó la  $\beta$ -actina de soya como gen de referencia. <sup>(10)</sup> Se usó un PCR Rotor-Gene 3000 (Corbett, Sydney, Australia) y los valores se analizaron con el programa Q-Gene 96. <sup>(12)</sup>

### Análisis por Southern blot

La transferencia del Southern y la hibridación se hizo según Sambrook *et al.* (1989). <sup>(13)</sup> El ADN genómico (15  $\mu$ g) se extrajo por CTAB de las plantas (T<sub>5</sub>) seleccionadas con glifosato. Se digirió con enzima *EcoRV* y se transfirió a membrana de nylon (Hybond N, Amersham Biosciences). La hibridación se realizó con el gen *cp4epsps* como sonda, marcada con [32P]-dATP, utilizando el kit de marcaje de cebadores aleatorios de ADN (Promega, EEUU). La sonda se obtuvo por PCR con cebadores del gen *cp4epsps* y dio un fragmento de 887 pb. El producto de la reacción se purificó por el kit Gel SV Sistema Clean-Up Wizard (Promega).

### Evaluación de la nodulación en plantas transgénicas de soya inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum*

Se evaluó la eficiencia de la nodulación por *B. japonicum* (cepa Semia 5080) en plantas transgénicas de soya que portan la defensina. El procedimiento utilizado se describió previamente por Soto *et al.* <sup>(10)</sup> Se puso control no transgénico (DT-84) y control sin inocular.

### Evaluación de clones transgénicos frente a la incidencia del hongo *P. pachyrhizi* en condiciones de infección natural, en campo

Clones transgénicos obtenidos por autopolinización (generaciones T3, T4, T5 y T6) y el control no transgénico (DT-84) se cultivaron en parcelas del CIGB (Habana) durante los años 2013-2014, 2014-2015, 2016-2017 y en el INCA (Mayabeque) durante los años 2013-2014, 2014-2015, 2015-2016 para su evaluación frente al hongo *P. pachyrhizi*. Los experimentos de campo fueron autorizados por el Centro Nacional de Seguridad Biológica de Cuba con licencia: LH47-L(95)13. Las semillas inoculadas con *B. japonicum* se sembraron usando un diseño de bloques al azar, descrito previamente por Soto *et al.* <sup>(10)</sup> Las hojas con síntomas de roya asiática se analizaron con el kit Envirologix QuickStixTM (Envirologix, EEUU) para confirmar presencia de *P. pachyrhizi*. Se calculó la severidad de la enfermedad (área de la hoja afectada por roya) según protocolo descrito. <sup>(10)</sup> Se hicieron evaluaciones con 20-30 plantas.

Se usó PCR cuantitativa (qPCR) para medir biomasa de *P. pachyrhizi* y el procedimiento usado se describió previamente. <sup>(14)</sup> Se calculó el porcentaje de defoliación a los 36 y 60 días. Se evaluó la afectación en los rendimientos. <sup>(10)</sup>

### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente por IBM SPSS Statistics 25 usando la prueba ANOVA en el nivel  $P \leq 0,05$ . Las medias de réplicas experimentales se representaron gráficamente y las desviaciones estándar se mostraron como barras de error.

## RESULTADOS

### Transformación y regeneración de plantas

Después de 15 días en medio de selección con glifosato, 19 explantes bombardeados desarrollaron brotes para una frecuencia de transformación de 10,7 %. Se obtuvieron 22 clones resistentes al herbicida con una elevada eficiencia de transformación (13,5 %) <sup>(9)</sup> que se transfirieron a invernadero hasta obtener semillas T<sub>2</sub>. Las plantas transformadas mostraron un crecimiento similar al control no transformado. Se demostró la expresión de la proteína CP4 EPSPS en las 22 líneas enraizadas (T<sub>0</sub>) utilizando el kit de inmunodetección Roundup Ready®. <sup>(10)</sup>

### Integración del transgen y expresión relativa de la defensina *NmDef02* en plantas transgénicas

El ADN de los clones de soya resistentes a glifosato (T<sub>1</sub>) se analizó por PCR y se detectó el fragmento esperado de 140 pb, lo que indicó la presencia del gen *NmDef02* en las plantas transgénicas de soya. Se confirmó la integración estable del fragmento del plásmido que contiene los genes *cp4epsps* y *NmDef02* (5,3Kb) en el genoma de los clones transgénicos (T<sub>2</sub>) mediante Southern blot. El ADN de plantas no transformadas no mostró señal de hibridación. <sup>(10)</sup>

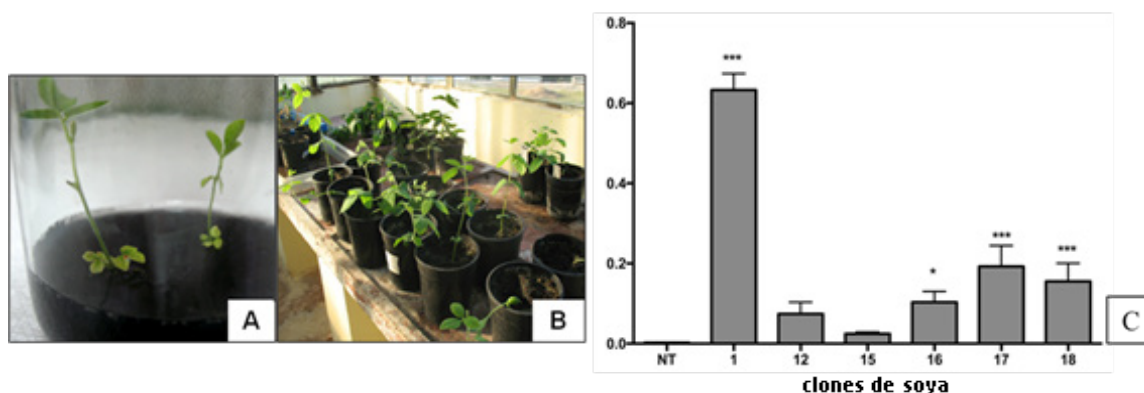
El análisis mediante qRT-PCR mostró que los clones transgénicos presentaron diferentes niveles de expresión relativa de la defensina *NmDef02* (figura 1C). Los clones Def1, 17 y 18 mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) con el control no transgénico, siendo superior en el clon Def1.

### Formación de nódulos en plantas transgénicas inoculadas con *B. japonicum*

Las plantas transgénicas inoculadas con *B. japonicum* mostraron un desarrollo fenotípico similar a las plantas no transformadas utilizadas como control. Se obtuvieron nódulos de diferentes tamaños en todas las plantas inoculadas y mayor cantidad de nódulos en las plantas transgénicas sin diferencias significativas en el peso fresco promedio de los nódulos. Los nódulos tuvieron coloración roja interna debido a la presencia de leghemoglobina. <sup>(10)</sup> Esto es un indicador indirecto del proceso de fijación de nitrógeno atmosférico por el bacteroide. <sup>(1,15)</sup> Por tanto, se demuestra que la defensina *NmDef02* no ha afectado la nodulación inducida por *B. japonicum*.

### Resistencia de los clones transgénicos al hongo *P. pachyrhizi* en campo

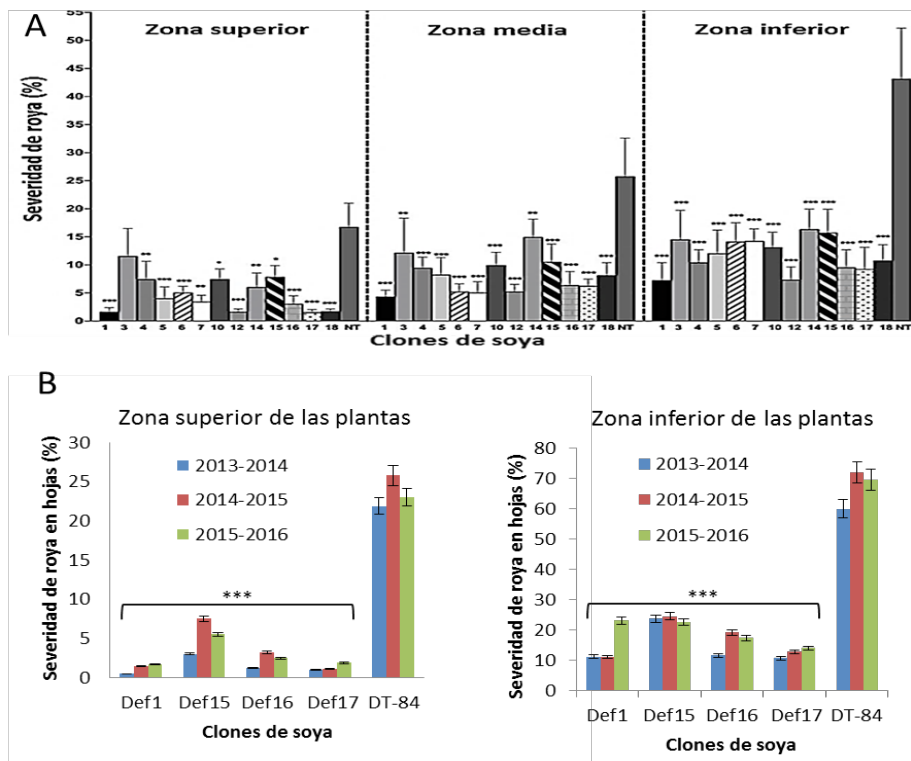
La presencia del hongo *P. pachyrhizi* se confirmó mediante tiras de inmunodetección Enviroligix QuickStixTM, en experimentos de La Habana y Mayabeque. En todos los experimentos, las plantas no transgénicas tuvieron un 100 % de afectación por roya asiática, lo que demostró la elevada susceptibilidad de este cultivar al hongo. Aunque los clones transgénicos mostraron pústulas en las hojas cercanas al suelo, tuvieron una severidad por roya significativamente menor que el control DT-84 ( $p < 0,05$ ) siendo menor el número de pústulas en la zona superior de las plantas evaluadas en CIGB, en los clones Def 1, 12, 17 y 18 (figura 2A). La baja severidad por roya, también fue evidente en las plantas evaluados en el



**Fig. 1.** Transformación de soya con el plásmido pCP4EPSPS-DEF A) Plántulas en medio de enraizamiento. B) Plantas transgénicas adaptadas a invernadero. C) Expresión relativa del gen *NmDef02* en plantas transgénicas de soya. 1-18: clones transgénicos. NT: control no transgénico. Las barras representan la media ( $n > 9$ ) y el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas usando ANOVA por la prueba de rango múltiple de Tukey con respecto al control (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Los análisis moleculares mostraron la presencia del transgen en la progenie de estos clones; donde el clon Def1 acumuló los niveles más altos de expresión de la defensina y mostró el grado más alto de resistencia a ambas enfermedades.

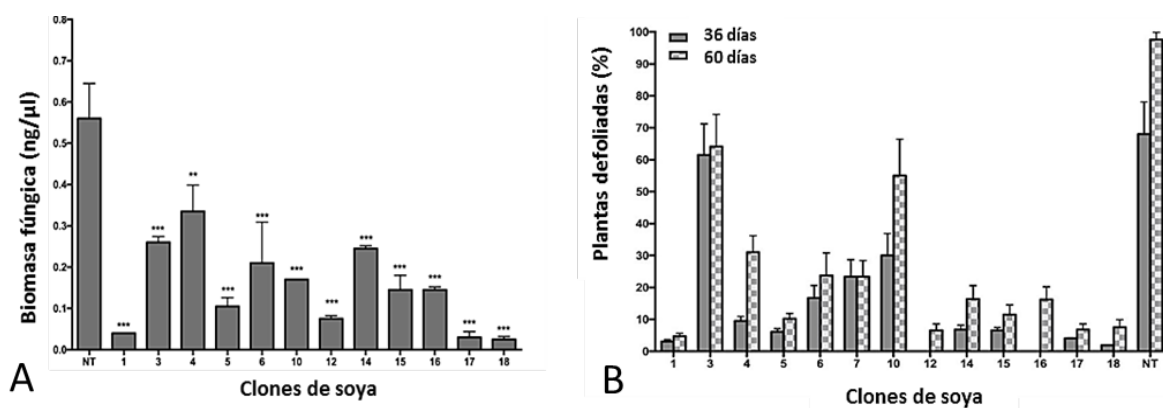
INCA donde los clones transgénicos tuvieron una severidad significativamente menor que el control Dt-84. Los resultados de los 3 años se muestran en la figura 2B. Los clones Def 1 y 17 mostraron mayor resistencia al hongo, que se mantuvo estable hasta la generación T5.

Se demostró por qPCR que los clones transgénicos han tenido una cantidad significativamente menor de biomasa fúngica que las plantas no transgénicas ( $p < 0,05$ ), siendo menor en los clones Def1, 17 y 18 (figura 3). Estos resultados han demostrado que la expresión constitutiva del gen Nm-



(\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Control no transgénico DT-84 (NT)

**Fig. 2.** Afectación por roya asiática en hojas de soja. A) Severidad por roya en la zona superior, media o inferior de plantas evaluadas en CIGB (n=20). B) Severidad por roya en zonas superior e inferior de plantas transgénicas de soja (T3, T4 y T5) evaluadas en el INCA durante 3 años (n=50). Diferencias significativas con el control DT-84 según prueba de Tukey.



(\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Control no transgénico DT-84 (NT).

**Fig. 3.** Evaluación de clones transgénicos en parcela del CIGB. A) Cuantificación de biomasa de *P. pachyrhizi* en plantas transgénicas de soja. (n = 3). B) Defoliación en plantas de soja por incidencia de roya asiática. Evaluación a los 36 y 60 días después de la aparición de los síntomas. 1-18: clones transgénicos; NT: control no transgénico. Diferencias significativas con el control DT-84 según prueba de Tukey.

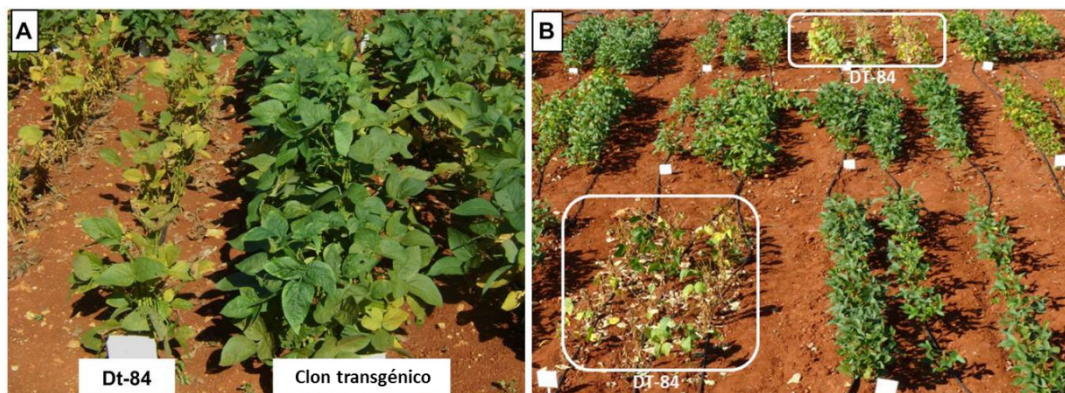


Def02 produjo una disminución en el número de pústulas en las líneas transgénicas, que condujo a una menor biomasa fúngica.

La defoliación precoz fue mayor en plantas no transgénicas a los 60 días después de la infección por roya. Contrariamente, algunos clones transgénicos mostraron una defoliación menor del 10 % en ese mismo tiempo. En este estudio, los clones transgénicos que expresaron la defensina mostraron diferentes niveles de resistencia a *P. pachyrhizi*, siendo mayor en los clones Def1, 12, 17 y 18. La reducida esporulación del hongo observada en algunos clones ha sido evidencia de la resistencia a *P. pachyrhizi*,<sup>(6)</sup> en estos experimentos bajo condiciones de infección natural. Las hojas de plantas transgénicas permanecieron verdes, aunque estuvieran infestadas, contrastando con las plantas no transgénicas que mostraron clorosis intensa en sus hojas seguida de defoliación precoz (figura 4).

La enfermedad afectó el número de ramas, vainas y semillas, así como el peso de semillas por planta en el control no transgénico. Por el contrario, la mayoría de las líneas transgénicas fueron significativamente superiores al control en todos los parámetros relacionados con el rendimiento (tabla 1).

La resistencia de los clones transgénicos (Def1 y Def 17) a la roya asiática también se observó en las generaciones T<sub>5</sub> y T<sub>6</sub>, sembradas en parcela. La presencia de pústulas se observó en todas las hojas de plantas transgénicas y no transgénicas. El control Dt-84 sufrió clorosis y defoliación precoz. Aquí se evaluó la defoliación a los 60 días, donde el control con 907 plantas sembradas tuvo un 95,2 % de plantas defoliadas totalmente. Los clones evaluados mostraron resistencia al hongo con 1,95 % de defoliación en 868 plantas sembradas (Def1) y 0,95% de defoliación en 838 plantas sembradas (Def17). Como el hongo apareció en la etapa de llenado y maduración del grano, no hubo afectación en los rendimientos.



**Fig. 4.** Afectación por *P. pachyrhizi* en campo. A) Plantas no transgénicas (Dt-84) con síntomas de roya asiática. Plantas clon Def1 resistente al hongo. B) Defoliación en plantas no transgénicas (Dt-84) por maduración precoz.

**Tabla 1.** Caracterización morfo-agronómica de plantas transgénicas (Def1-Def18) y no transgénicas (DT-84) afectadas por roya asiática

| Clones | Número de ramas    | Número de vainas      | Número de semillas  | Peso de semilla fresca/planta (g) |
|--------|--------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------------------|
| Def1   | 2,9 <sup>abc</sup> | 45,5 <sup>ab</sup>    | 70,7 <sup>ab</sup>  | 9,5 <sup>abcd</sup>               |
| Def12  | 3,6 <sup>a</sup>   | 39,2 <sup>abcde</sup> | 73,8 <sup>a</sup>   | 8,1 <sup>bcde</sup>               |
| Def16  | 3,5 <sup>ab</sup>  | 38,0 <sup>abcde</sup> | 60,5 <sup>abc</sup> | 10,8 <sup>ab</sup>                |
| Def17  | 3,4 <sup>ab</sup>  | 47,2 <sup>a</sup>     | 81,5 <sup>a</sup>   | 11,7 <sup>a</sup>                 |
| Def18  | 3,1 <sup>abc</sup> | 43,5 <sup>abc</sup>   | 79,2 <sup>a</sup>   | 11,0 <sup>ab</sup>                |
| DT-84  | 0,5 <sup>e</sup>   | 22,0 <sup>f</sup>     | 31,2 <sup>d</sup>   | 4,7 <sup>f</sup>                  |

## DISCUSIÓN

La producción de plantas transgénicas que expresan genes antimicrobianos ha proporcionado una amplia resistencia contra diferentes patógenos, al tiempo que ha reducido el uso de pesticidas químicos.

En el presente estudio, obtuvimos la primera evidencia de resistencia al hongo *P. pachyrhizi* en plantas de soya, transformadas con el gen de defensina *NmDef02* bajo el promotor constitutivo 35S. <sup>(10)</sup> Esto fue posible mediante una metodología de bombardeo de ejes embriogénicos de semillas maduras, optimizada con genotipos cubanos de soya. <sup>(9)</sup>

Entre los promotores constitutivos ha destacado el promotor 35S (CaMV35S) usado en este trabajo para la transformación de soya con el gen *NmDef02*, ha tenido un amplio uso para la expresión de genes de defensinas. <sup>(16)</sup> Los promotores constitutivos han permitido la expresión en la mayoría de los tejidos de la planta y han sido útiles cuando el objetivo ha sido expresar un transgen en toda la planta, como sucedió en este trabajo. Aquí encontramos una alta correlación entre la expresión relativa de *NmDef02*, determinada por qRT-PCR y la alta resistencia a *P. pachyrhizi* en los clones Def1, 17 y 18, evaluados en parcelas de La Habana y Mayabeque, con condiciones climáticas diferentes. Aunque todos los clones transgénicos evaluados expresaron signos de roya asiática, tuvieron menor severidad en comparación con el control no transgénico (Dt-84) durante 5 generaciones.

Nuestros datos han apoyado la idea de que la expresión constitutiva del gen *NmDef02* produjo una disminución en el número de pústulas en los clones transgénicos y esto condujo a una menor biomasa fúngica, <sup>(10)</sup> lo que ha demostrado la resistencia de los clones al hongo, quizás por la reducción de la esporulación. <sup>(17)</sup> La protección de las plantas transgénicas ha sido evidente porque las hojas han conservado su color y vitalidad, evitándose la defoliación prematura.

Se demostró que el cultivar DT-84 utilizado como control no transgénico fue altamente susceptible a este hongo y las plantas de soya sufrieron una defoliación completa antes de concluir su ciclo de maduración. <sup>(10)</sup> La defoliación temprana de estas plantas redujo la productividad al interferir con sus procesos fisiológicos, lo que resultó en menos vainas normales, menos semillas por vaina y menor peso de granos. <sup>(18)</sup>

## Conclusiones

Este ha constituido el primer reporte de transformación genética de soya con un gen de defensina para la resistencia a patógenos fúngicos. En este estudio se obtuvo la primera evidencia de resistencia al hongo *P. pachyrhizi*, en plantas de soya transformadas con el gen de defensina *NmDef02*. También se demostró que la expresión del gen de defensina *Nm-*

*Def02* en plantas de soya, no ha tenido un efecto negativo sobre la nodulación inducida por *B. japonicum*, bacteria que ha jugado un papel fundamental en la tecnología de este cultivo en Cuba. Evidentemente, el uso de plantas transgénicas que expresen esta defensina, reduciría el número de aplicaciones de fungicidas químicos en campo, para un manejo integral de patógenos en soya, con un mínimo impacto ambiental.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Menéndez C, Trujillo LE, Ramírez R, González-Peña D, Espinosa D, Enriquez GA, et. al. Producción de un inoculante líquido de *Bradyrhizobium japonicum* con alto impacto en la siembra mecanizada de la soya en Cuba. *Biología Aplicada*. 2014;31(2):116-20.
2. Hartman GL, Miles MR, Frederick RD. Breeding for resistance to soybean rust. *Plant disease*. 2005;89(6):664-6.
3. Tremblay A, Hosseini P, Li S, Alkharouf NW, Matthews BF. Identification of genes expressed by *Phakopsora pachyrhizi*, the pathogen causing soybean rust, at a late stage of infection of susceptible soybean leaves. *Plant Pathology*. 2012;61:773-86.
4. Pérez L, Martínez E, Pérez M, Martín EL, Borrás HO, Hernández I. First Report of Asian rust of soybean caused by *Phakopsora pachyrhizi* in Cuba. *Plant Pathology*. 2010;59(4):803-.
5. Tavares LS, Santos MO, Viccini LF, Moreira JS, Miller RNG, Franco OL. Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides*. 2008;29:1842-51.
6. Thomma BPHJ, Cammue BPA, Thevissen K. Plant defensins. *Planta*. 2002;216:193-202.
7. Portieles R, Ayra C, Gonzalez E, Gallo A, Rodriguez R, Chacón O, et. al. *NmDef02*, a novel antimicrobial gene isolated from *Nicotiana megalosiphon* confers high-level pathogen resistance under greenhouse and field conditions. *Plant Biotechnology Journal*. 2010;8(6):678-90.
8. Espinosa Huerta E, Quintero Jiménez A, Sánchez García BM, Acosta Gallegos JA, Mora-Avilés MA. Resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum* en frijol común transgénico, expresando el gen defensina de *Arabidopsis thaliana*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2013;4(7):1027-42.
9. Soto N, Delgado C, Hernández Y, Rosabal Y, Ferreira A, Pujol M, et. al. Efficient particle bombardment-mediated transformation of Cuban soybean (INCASoy-36) using glyphosate as a selective agent. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2017;128(1):187-96.
10. Soto N, Hernández Y, Delgado C, Rosabal Y, Ortiz R, Valencia L, et. al. Field resistance to *Phakopsora pachyrhizi* and *Colletotrichum truncatum* of transgenic soybean expressing the *NmDef02* plant defensin gene. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11:562.
11. Doyle J, Doyle J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987;19:11-5.
12. Muller P, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR Biotechniques. 2002;32:1372-9.
13. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Segunda edición. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
14. Ploper LD, Escobar D, Ivancovich A, Diaz CG, Sillon M, Formento N, et. al. Propuesta de protocolo para muestreo y evaluación de la roya asiática de la soja en Argentina. *Avance agroindust-*

trial-Estación Experimental Agro-Industrial Obispo Colombes. 2006;27(3):35-7.

15. Nápoles García MC, González-Anta G, Ferreira A, Rossi A, Hernández Forte I, Costales Menéndez D. Efecto de diferentes inoculantes sobre la nodulación de la soya cultivada en condiciones de estrés. *Cultivos Tropicales*. 2014;35(4):45-51.
16. Zhang Z, Zhao J, Ding L, Zou L, Li Y, Chen G, *et al*. Constitutive expression of a novel antimicrobial protein, Hcm1, confers resistance to both Verticillium and Fusarium wilts in cotton. *Scientific Reports*. 2016;6:20773.
17. Yamanaka N, Yamaoka Y, Kato M, Lemos NG, Passianotto ALdL, dos Santos JV, *et al*. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. *Tropical Plant Pathology*. 2010;35(3):153-62.
18. da Silva AF, Sedyama T, dos Santos Silva FC, Bezerra ARG, Rosa DP, Cruz CD, *et al*. Effect of defoliation from the bottom to the top on the yield of Brazilian soybean cultivars. *African Journal of Agricultural Research*. 2015;10(33):3296-304.

---

Recibido: 13/06/2022

Aprobado: 18/08/2022

---

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran que la investigación se realizó en ausencia de cualquier relación comercial o financiera que pudiera interpretarse como un potencial conflicto de intereses.

#### Contribuciones de los autores

Conceptualización: Gil Alberto Enríquez Obregón, Natacha Soto Pérez

Análisis formal: Yuniet Hernandez Avera, Natacha Soto Pérez

Investigación: Natacha Soto Pérez, Yuniet Hernandez Avera, Celia Delgado Abad, Gil Alberto Enríquez Obregón, Yamilka Rosabal Ayán, Abel Hernández Velázquez

Metodología: Natacha Soto Pérez, Gil Alberto Enríquez Obregón

Administración del proyecto: Gil Alberto Enríquez Obregón, Merardo Pujol Ferrer

Recursos: Aleines Ferreira Fabrè

Supervisión: Gil Alberto Enríquez Obregón, Natacha Soto Pérez, Abel Hernández Velázquez, Rodobaldo Ortiz Pérez

Redacción-borrador original: Natacha Soto Pérez

Redacción-revisión y edición: Natacha Soto Pérez, Merardo Pujol Ferrer, Gil Alberto Enríquez Obregón

#### Financiación

Este trabajo fue financiado por el Gobierno de Cuba.

#### Cómo citar este artículo

Soto Pérez N, Enríquez Obregón GA, Hernández Avera Y, Delgado Abad C, *et al*. Evento de modificación de soya transgénica para mayor resistencia a la roya asiática. *AnAcadCiencCuba* [internet] 2022 [citado en día, mes y año];12(3):e1259. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1259>

