

Propuesta de un sistema de transformación de plantas de papa (*Solanum tuberosum* sp. *andigena* var. Pastusa suprema) mediado por *Agrobacterium tumefaciens*

A system for transformation potato plants (*Solanum tuberosum* sp. *andigena* var. Pastusa suprema) mediated through *Agrobacterium tumefaciens*

Alfredo López¹ y Alejandro Chaparro²

Resumen: Se ha demostrado que la transformación de papa (*Solanum tuberosum*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es dependiente del genotipo y que la mayoría de protocolos de transformación reportados son ineficientes al aplicarlos en la subespecie *andigena*. En esta propuesta se manejaron los procesos iniciales de mejoramiento genético de la nueva variedad colombiana de papa Pastusa suprema (*Solanum tuberosum* sp. *andigena*) que es altamente androestéril, característica de gran importancia para los organismos modificados genéticamente. Esta variedad resultó de la hibridación interespecífica de tres especies de papa (*Solanum stoloniferum*, *Solanum phureja* var. Yema de huevo y *Solanum tuberosum* sp. *andigena* var. Parda pastusa). Se transformaron explantes internodales mediante el vector pCambia2301 que posee un gen reportero de la β -glucuronidasa y un gen de resistencia a la kanamicina. Se obtuvo un porcentaje de transformación inicial de $31 \pm 2,5\%$, que se expresó mediante formación de callo sobre medios de selección y una frecuencia final con base en el ensayo GUS de 30%. Este es el primer reporte de transformación de un híbrido interespecífico de tres especies diferentes.

Palabras clave: híbrido interespecífico, transformación, genotipo, kanamicina, GUS.

Abstract: It has been demonstrated that *Agrobacterium tumefaciens* mediated-transformation of potato (*Solanum tuberosum*) was depended upon the genotype. In addition, most of the proposed protocols were inefficient to transform the *andigena* subspecies. In this proposal, the initial processes of genetic improvement of the new Colombian variety Pastusa suprema, which highly andro-sterile characteristic is of great importance for genetically modified organisms, were handled. This variety was produced across the inter-specific hybridization of three different species of potato (*Solanum stoloniferum*, *Solanum phureja* var. Yema de huevo y *Solanum tuberosum* sp. *andigena* var. Parda pastusa). Stem explants was transformed using the vector pCambia 2301, which has the gene reporter of β -glucuronidase and the gene of resistance to kanamycin. Percentage initial transformation was expressed as formation of callus on a selection medium of $31 \pm 2.5\%$ with a final 30% frequency using GUS assay. It is the first report of a transformation process of an inter-specific hybrid derived from three different species.

Key words: inter-specific hybrid, transformation, genotype, kanamycin, GUS.

Introducción

LA PAPA ES UNO DE LOS CULTIVOS alimenticios más importantes del mundo (Estrada, 2000). Es el cuarto cultivo en el mundo después del trigo, el arroz y el maíz, con una producción anual aproximada de 300 millones

de toneladas (Banerjee *et al.*, 2006). Colombia produjo 2.834.820 t en el año 2002 en un área sembrada de 163.841 ha (CEVIPAPA, 2006).

La producción de papa se ve fuertemente reducida esencialmente por la presencia de enfermedades y ata-

Fecha recepción: 02 de agosto de 2006
Aceptado para publicación: 06 de junio de 2007

¹ Microbiólogo, Grupo de Ingeniería Genética de Plantas, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. e-mail: alopezmo@unal.edu.co

² Profesor asistente, Grupo de Ingeniería Genética de Plantas, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. e-mail: achaparro@unal.edu.co

ques de insectos plaga. En Colombia, las principales pérdidas económicas se deben al ataque de la Polilla guatemalteca (*Tecia solanivora* Lepidoptera: Gelechiidae). Esta plaga se presenta en más del 80% de las zonas cultivadas del país y genera una disminución de los rendimientos superior al 30%. Este insecto no sólo está presente en América Latina, sino también en África, Asia y en el sureste de Europa, y fue reportado en Colombia por primera vez en 1985 (Arévalo, 2003). Para su control, los agricultores acuden al uso de una gran cantidad de plaguicidas químicos que se aplican con demasiada frecuencia. Este hecho, además de incrementar sustancialmente los costos de producción, origina una serie de problemas secundarios, entre ellos el desarrollo de resistencia a los plaguicidas (Sánchez *et al.*, 2000).

En el contexto de las múltiples estrategias agrupadas bajo el concepto de manejo integrado de plagas (MIP) se propone la obtención de variedades de plantas que posean resistencia a los insectos plaga. Una tecnología que se viene explorando recientemente, y que puede servir como complemento al MIP para ofrecer soluciones parciales al problema, es la utilización de plantas transformadas con genes que confieren resistencia a los insectos plaga (Chaparro *et al.*, 2003).

En el transcurso de los últimos 15 años se han obtenido cultivares transgénicos de papa con resistencia a diferentes factores bióticos (virus, bacterias, hongos, nematodos e insectos) y abióticos (estrés fisiológico, sequía, salinidad, frío), y con modificaciones en algunos procesos de desarrollo (crecimiento, floración, tuberización) (Ritter, 2000), aunque un gran porcentaje de estos trabajos se han realizado casi exclusivamente con variedades de *Solanum tuberosum sp. tuberosum*. Existen algunos pocos reportes sobre trabajos en especies de *Solanum tuberosum sp. andigena*, cultivo que se limita a los países de la región andina de Suramérica (Banerjee *et al.*, 2006). En cuanto a las variedades colombianas los trabajos de transformación son escasos; actualmente la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá y la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) –en convenio con la Universidad Nacional sede Medellín–, se encuentran investigando en esta área; estos últimos reportaron en 2001 transformación mediante genes reporteros en algunas de las principales variedades comerciales de papa cultivadas en Colombia: ‘Diacol capiro’ y ‘Parda pastusa’ (Trujillo *et al.*, 2001). La mayoría de métodos reportados para la obtención de plantas transformadas de papa (*Solanum tuberosum sp. tuberosum*) han mostrado ser

ineficientes en las transformaciones de la subespecie *andigena* debido, entre otras causas, a la baja regeneración de brotes sobre el medio usado (Trujillo *et al.*, 2001).

En el año 2002 se liberaron comercialmente tres nuevas variedades de papa subespecie *andigena* desarrolladas por un equipo de investigadores de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, entre las que se destaca la variedad Pastusa suprema resultado de la hibridación de un clon interespecífico (*Solanum stoloniferum* 230490 × *Solanum phureja* var. Yema de huevo) como parental materno con *Solanum tuberosum sp. andigena* var. Parda pastusa como parental paterno (Ñústez, 2005). Esta nueva variedad posee cierta resistencia a *Phytophthora infestans* agente causal de la enfermedad de la Gota y se considera como la de mayor potencial comercial en los mercados colombianos dado que tiene características fenotípicas similares a las de ‘Parda pastusa’, la más importante variedad a nivel nacional (Perfetti *et al.*, 2003). Ensayos realizados en campo con esta variedad han mostrado propiedades de androesterilidad, característica importante para la bioseguridad de los organismos genéticamente modificados en relación con el flujo de genes (Ñústez, 2005).

Aunque existen algunos autores que proponen que los sistemas de transformación son independientes del genotipo (Kumari *et al.*, 1995; De Block, 1988), hay suficiente evidencia que señala que el método de transformación a utilizar está condicionado por el genotipo de la variedad que se esté trabajando (Dale y Harnpson, 1995; Trujillo *et al.*, 2001; Heeres *et al.*, 2002). Por tanto, es necesario evaluar la capacidad de transformación de la nueva variedad Pastusa suprema empleando genes reporteros y marcadores de selección para obtener protocolos estándar que permitan en el próximo futuro la introducción de genes de resistencia a insectos plaga y/o a condiciones bióticas y abióticas adversas, como la sensibilidad a heladas (Navia, 2005).

Materiales y métodos

Material biológico

Las plántulas de papa *in vitro* de la variedad ‘Pastusa suprema’ fueron provistas por el profesor Carlos Ñústez de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. El mantenimiento *in vitro* del material vegetal se realizó utilizando el medio Murashige y Skog (MS) suplementado con tiamina (0,4 mg · L⁻¹), ácido D-pantoténico (2 mg · L⁻¹), inositol (100

mg · L⁻¹) y sacarosa (20 g · L⁻¹) (Trujillo *et al.*, 2001). Se adicionó además ácido giberélico, AG₃ (0,1 mg · L⁻¹) con el fin de estimular la elongación de los tallos y una concentración de Phytigel[®] (Sigma-Aldrich) de 2,5 g · L⁻¹. Las plántulas fueron subcultivadas transfiriendo las porciones caulinares apicales a medio fresco cada cinco semanas; por su parte, los explantes sometidos al proceso de transformación se subcultivaron cada dos semanas. El crecimiento del material vegetal se llevó a cabo a una temperatura promedio 20 ± 3°C con un fotoperíodo de 10 horas. Las bacterias utilizadas en la replicación del plásmido y su transferencia al genoma vegetal, *Escherichia coli* cepa DH5α y *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404, fueron cedidas por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), respectivamente.

Transformación bacteriana y vegetal

El vector pCambia 2301 que contiene el gen marcador *nptII* y el gen reportero *gus*, se introdujo a *E. coli* y *A. tumefaciens* mediante choque térmico con base en los protocolos descritos por Lima (1998) y Lacorte y Romano (1998).

Una vez fue transformada *A. tumefaciens* se cultivó en 20 ml de medio líquido Luria Bertani suplementado con antibióticos (estreptomina y kanamicina, 50 mg · L⁻¹ de cada uno), se incubó a 28°C y se centrifugó a 180 rpm hasta obtener una lectura OD₆₀₀ de 0,8-1,0. El proceso de transformación vegetal se realizó usando la metodología propuesta por Ghislan (2003) con algunas variaciones basadas en las experiencias del grupo de Ingeniería Genética de Plantas de la Universidad Nacional de Colombia (IGP-UN) y en bibliografía obtenida sobre transformaciones genéticas de papa (*Solanum sp. tuberosum* y *andigena*), así: se inició tomando como explantes segmentos internodales de aproximadamente 0,4 a 0,8 cm provenientes de plantas micropropagadas de tres a cuatro semanas de edad (Jiménez, 2006). Para este ensayo se utilizaron 150 explantes derivados de plántulas cultivadas *in vitro* durante cuatro semanas a los cuales se les practicó un pequeño corte longitudinal para exponer las zonas internas del explante a la infección por parte de las bacterias (Beaujean *et al.*, 1998). Se tomaron grupos de 50 explantes y se colocaron en el medio de cocultivo que consistía de medio MS líquido + vitaminas + 20 mg · L⁻¹ de acetosiringona (Dale y Harpson, 1995). Los explantes se pusieron en contacto con la suspensión bacteriana en una proporción 1:50 y se agitaron manualmente durante

30 minutos (Yaya, 2006). Se tomó como control un grupo de 50 explantes a los cuales no se les sometió a cocultivo y se trasladaron directamente a medio de cultivo sólido (MS sin hormonas).

Por su parte, los explantes cocultivados se retiraron y se pusieron a secar en papel absorbente estéril y posteriormente se trasladaron a cajas de Petri que contenían medio de cocultivo sólido. Las cajas con los explantes cocultivados y los controles se incubaron en oscuridad a una temperatura de 20±3°C por un período de 48 horas. Posteriormente, los explantes se transfirieron a un medio de regeneración que consistía en medio MS sólido + vitaminas + hormonas (3,0 mg · L⁻¹ de zeatina ribósido, ZR; 1,0 mg · L⁻¹ de ácido giberélico, AG₃ y 0,02 mg · L⁻¹ de ácido naftalenacético, ANA) (Jiménez, 2006) suplementado con 250 mg · L⁻¹ de cefatoxime por siete días (Visser *et al.*, 1989). Transcurrida una semana, los explantes se trasladaron al mismo medio pero suplementado con 50 mg · L⁻¹ de kanamicina (Andersson *et al.*, 2003). Se hicieron réplicas de 10 explantes cada una para los cocultivados y cinco réplicas de 10 explantes cada una para los controles. El cambio a medio fresco se realizó cada dos semanas. Se evaluaron las condiciones durante el proceso de transformación en cuanto al porcentaje de callogénesis, regeneración, oxidación y/o clorosis. Se evaluaron las diferencias estadísticas entre los tratamientos (con cocultivo y sin cocultivo) mediante la prueba W de Mann Whitney. Se utilizó el programa Stat Graphics[®] versión 4.0 y para todos los análisis se asumió un nivel de confiabilidad de 95%.

Ensayo histoquímico GUS

La actividad del gen *gus* se evidenció por medio del ensayo histoquímico GUS modificado por Lacorte (1998). Se tomaron aleatoriamente el 50% de los explantes viables en proceso de callogénesis de 3 a 4 semanas de edad provenientes de los explantes control y cocultivados para realizar el ensayo. La preparación de 400 μL de la solución de X-Gluc 50 mg · mL⁻¹ se realizó pesando 20 mg de X-Gluc y disolviéndolo en 0,4 ml de DMSO (dimetilsulfóxido). La solución se adicionó a 40 ml de tampón de reacción compuesto por NaH₂PO₄ · H₂O 100 mM, Na₂EDTA · 2H₂O 10 mM, Triton X-100 0,1%, X-Gluc 50 mg · mL⁻¹ 1 mM, aforando a 40 mL con agua destilada estéril.

Los callos se retiraron del medio de regeneración y se enjuagaron con agua destilada estéril para retirar los restos de medio que quedan adheridos, se colocaron a

secar sobre papel absorbente y se depositaron en tubos Eppendorf estériles de 1,5 mL de volumen; a continuación se les adicionó el tampón de reacción citado en un volumen suficiente para cubrir la muestra. Posteriormente se incubaron en oscuridad a una temperatura de 37°C por 17 horas aproximadamente. El tampón de reacción se retiró y se adicionó etanol al 70% para interrumpir la reacción y retirar la clorofila. Después de 17 horas se lavaron las muestras en agua destilada y se transfirieron a glicerol 50% en una caja de Petri. Finalmente las muestras se visualizaron en estereoscopio.

Extracción de DNA vegetal

Se ensayaron diferentes protocolos de extracción de DNA (Edwards *et al.*, 1991; Romano, 1998; Herrera *et al.*, 2000). La escogencia del mejor protocolo se basó en la calidad de la extracción del DNA genómico de plantas micropropagadas analizada por electroforesis en geles de agarosa y se comprobó por la ausencia de inhibidores interferentes por digestión con la enzima *HindIII* y por amplificación de segmentos al azar utilizando iniciadores tipo RAPD.

Análisis molecular por PCR

Se llevaron a cabo tres tipos de reacciones de PCR durante el proceso de transformación con los objetivos de evaluar la calidad del DNA extraído y detectar la presencia del gen endógeno y del transgen. La primera reacción de amplificación corresponde a la efectuada con los *primers* tipo RAPD de 10 oligonucleótidos de secuencias aleatorias (Operon Biotechnologies, Inc.) La secuencia del *primer* utilizado fue: 5'AGGTGACCGT3'. Las reacciones de PCR de 25 µL contenían 200 ng de DNA genómico de plántulas micropropagadas, buffer 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris HCL, pH 8,3), 1,0 mM de MgCl₂, 0,1 µM de dNTPs, 1,0 µM de cada primer y 1,25 U de taq-polimerasa. La segunda reacción de amplificación corresponde a la que se realizó sobre el material transformado y el grupo control para amplificar un fragmento del gen *nptII*. Se utilizaron las mismas condiciones de la mezcla de la primera reacción. La tercera reacción corresponde a la que se hizo para amplificar el gen mitocondrial *cox* que codifica para la citocromo oxidasa en los explantes control y los explantes transformados, así como en plantas micropropagadas para evaluar calidad de la extracción. Los primers utilizados fueron Cox1 5'CGTCGCATTCCAGATTATCCA3' y Cox2 5'CAACTACGGATATATAAAGCCAAAA CTG 3'

(Weller *et al.*, 2000) que definen un fragmento de 96 pb. Esta reacción en explantes control y cocultivados se realizó paralelamente a la amplificación del transgen y sirvió como un control interno de la PCR. Como control negativo se utilizaron muestras provenientes de los materiales no sometidos a cocultivo y como control de la contaminación se usó como muestra agua destilada estéril.

Todas las reacciones de amplificación fueron realizadas utilizando el kit TucanTaq® (Corpogen) y llevadas a cabo en un termociclador (Biorad®), programado para un ciclo de 94°C/1 min, 38 ciclos de 94°C/1 min, 59°C/1 min y 72°C/2 min cada uno, con una extensión final de 72°C durante 7 min para la amplificación del transgen y del gen endógeno; y de un ciclo de 94°C/5 min, 35 ciclos de 94°C/30 seg, 36°C/1 min y 72°C por 1 min 30 seg cada uno, con una extensión final de 72°C durante 5 min para los *primers* tipo RAPD. Los productos de PCR provenientes de la amplificación de los genes *nptII* y *cox* se analizaron en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, usando el buffer 1X Tris Borato EDTA como buffer de corrida. Para la reacción con los *primers* tipo RAPD se usaron las mismas condiciones pero utilizando un gel de agarosa al 1%.

Transformación bacteriana y vegetal

Se obtuvieron cepas transformadas de *E. coli* y *A. tumefaciens* con el vector pCambia2301 utilizando el protocolo de choque térmico, las cuales fueron confirmadas por la extracción del DNA plasmídico y la posterior amplificación del gen *nptII* (datos no mostrados).

El protocolo de transformación vegetal utilizado en este ensayo, que se basó en el propuesto por Ghislan (2003) con algunas modificaciones, avanzó en el camino de obtener un sistema de transformación para la nueva variedad de papa Pastusa suprema. Estas modificaciones se basaron en reportes de transformación de papa (Visser *et al.*, 1989; Dale y Harnpson, 1995; Beaujean *et al.*, 1998; Trujillo *et al.*, 2001; Andersson *et al.*, 2003). El medio de regeneración y el tipo de explante procedente de entrenudos utilizados fue el propuesto por Jiménez (2006). Se ha reportado que trabajar con entrenudos facilita las primeras etapas del proceso debido a que son menos susceptibles a sufrir lesiones durante los diferentes pasos de manipulación (Beaujean *et al.*, 1998).

A los explantes sometidos a transformación se les practicó un pequeño corte para estimular la actividad

de transferencia de *A. tumefaciens* debido a la exudación de compuestos fenólicos que actúan como quimio-atrayentes; se reportó el inicio de formación de una pequeña capa de callo en los sitios de corte y la aparición de pequeños brotes (Visser *et al.*, 1989). Por otro lado, el corte puede permitir que la bacteria infecte las células internas del explante, como se pudo visualizar en los cortes internos de los callos GUS positivo (datos no mostrados). Sin embargo, el corte también puede inducir efectos deletéreos en los explantes más pequeños.

La concentración de la suspensión bacteriana se tomó con base en el trabajo de Trujillo *et al.* (2001), en el cual se evaluaron dos concentraciones (1:50 y 1:10) en la transformación de dos variedades de papa subespecie *andígena*, obteniendo mejores resultados para una variedad con la concentración 1:50, y para otra variedad con la concentración 1:10. Ambas concentraciones fueron válidas, pero para este ensayo se descartó la concentración 1:10 dado que, en una experiencia previa con la variedad 'Diacol capiro' utilizando esa concentración, se comprobó sobreinfección en los explantes (Yaya, 2006). Después del proceso de cocultivo los 150 explantes se colocaron en medios sin selección por una semana. En el transcurso de este tiempo más del 90% de los explantes cocultivados y control empezaron a presentar un ensanchamiento en uno o en ambos extremos mostrando indicios de callogénesis; sólo el 10% de los explantes control presentaron procesos de oxidación leves. No hubo procesos de clorosis.

Investigaciones realizadas por Visser *et al.* (1989) con transformaciones de *Solanum tuberosum sp. tuberosum*, partiendo de segmentos foliares o de entrenudos, en las cuales se evaluó la transferencia directa del cocultivo al medio de selección o dejando una semana en medio de regeneración sin antibióticos, obtuvieron mejores porcentajes de transformación cuando dejaban los explantes una semana sin presión de selección ya que se comenzaba a presentar división celular en los explantes sin estrés por la ausencia del antibiótico (Visser *et al.*, 1989). En este ensayo se observó un hecho similar ya que los explantes empezaron a presentar procesos de división celular e indicios de callogénesis. Sin embargo, en este espacio de tiempo se pudo presentar proliferación de algunas células no transformadas y haber contribuido a la presencia de escapes (explantes no transformados con resistencia natural). Para un próximo ensayo se podría evaluar la variante de disminuir el número de días sin presión de selección o pasar directamente a los medios de selección (Trujillo, 2001; Banerjee, 2006).

Después de la primera semana sin selección los explantes se trasladaron a medios con selección por parte del antibiótico kanamicina a una concentración de 50 mg · L⁻¹. Se escogió debido a que varios reportes citan que dicha concentración es óptima para la obtención de una alta frecuencia de brotes de papa transgénica en combinación con un alto número de brotes regenerados por explante (Ooms, 1987; Tavazza, 1988; Wenzler, 1989; Higgins, 1992, citados por Andersson *et al.*, 2003). En la segunda semana de transformación muchos explantes sufrieron la presencia del antibiótico, lo cual se hizo evidente por la presencia de procesos de oxidación y de clorosis. Se presentaron mayores impactos sobre los explantes cocultivados los cuales tuvieron una drástica disminución en su viabilidad (figura 1). Este comportamiento puede describirse mejor basado en los resultados del análisis de más de 20 variedades de papa obtenidos por Dale y Harnpson (1995) en los que la variación observada en la respuesta de regeneración fue atribuida en un 35 % a la variedad como tal; sin embargo, ello también indica que el 65% restante puede atribuirse a variaciones fisiológicas y otras fuentes de variación, como podría ser la presencia del antibiótico y/o sus diferentes concentraciones o el momento del cocultivo con la cepa de *A. tumefaciens*, ya que este ataque puede causar un efectos deletéreos en el genoma vegetal en el momento de la infección que pueda interferir con los procesos regenerativos (Tzfira y Citovsky, 2006).

En la tercera semana de transformación continuaron los efectos del antibiótico sobre algunos de los explantes control y los sometidos a transformación, pues aparecieron procesos de oxidación y pérdida de viabilidad. Sin embargo, como se observa en la figura 1, los explantes control y cocultivados no mostraban hasta ese

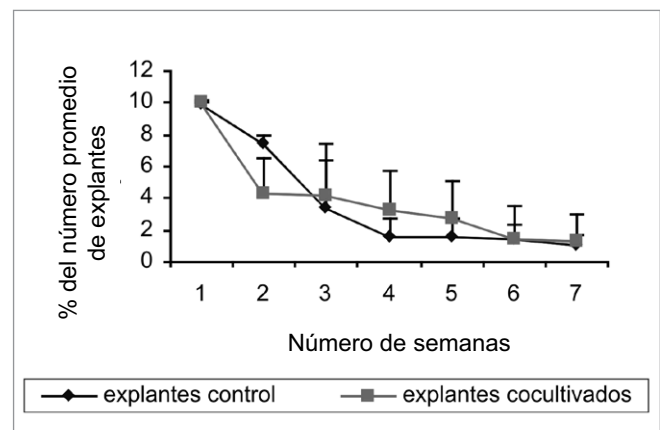


Figura 1. Viabilidad de los explantes a través del tiempo.

momento diferencias sustanciales entre ellos ($3,4 \pm 3,01$ vs. $4,2 \pm 3,1$). Por esta razón se decidió aumentar levemente la concentración del antibiótico a $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para poder detener el crecimiento en los controles de los escapes, explantes que presentan una tolerancia natural frente a algunos antibióticos, sin llegar a afectar el crecimiento de los explantes transformados. En la cuarta semana de transformación la callogénesis en los explantes viables fue más visible (figura 2). En la quinta semana de transformación se hicieron más notorios los efectos del aumento del antibiótico sobre los callos cocultivados debido a que empezaron a perder viabilidad, descartando de esta forma los callos que podrían ser escapes; posiblemente por esta razón 2% de los callos transformados que permanecieron viables comenzaron a mostrar indicios de regeneración (figura 3). A pesar del aumento en la concentración del antibiótico no se observó ningún cambio en los explantes de las réplicas control que permanecieron viables desde la tercera semana; aparentemente en estos callos (6%) no se afectó su tolerancia natural y también empezaron a manifes-

tar indicios de regeneración (figura 4). En las siguientes semanas del proceso de transformación no se presentó ningún cambio, manteniéndose constante el número de regenerantes y, por tanto, el porcentaje de regeneración. Los regenerantes que se presentaron, tanto en los callos control como en los callos transformados, permanecieron viables pero no siguieron creciendo en las dos semanas siguientes. Sin embargo, como se observó en las figuras 1 y 2, los callos sin proceso de regeneración empezaron a presentar procesos de oxidación y perdieron viabilidad. Al final los porcentajes de viabilidad ($P = 0,654$) y callogénesis ($P = 0,947$) en controles y cocultivados no mostraron diferencias estadísticamente significativas, demostrando posiblemente que la concentración de antibiótico usada para esta variedad no permitió una selección adecuada.

Durante el proceso de transformación utilizado en este ensayo se reportaron porcentajes de callogénesis de $31 \pm 2,52\%$ y de regeneración del $2 \pm 0,77\%$. Comparando los resultados obtenidos en el presente trabajo con otros reportes de transformación en papa (tabla 1), resulta que los porcentajes de regeneración obtenidos son relativamente bajos, pero similares a los obtenidos por Dale y Harnpson (1995) con la variedad Pentland dell. Es importante señalar que la variedad Pastusa suprema, a la que corresponde el presente trabajo, pertenece a la subespecie *andigena*, mientras la variedad Pentland dell es de la subespecie *tuberosum*. Por otro lado, se obtuvieron porcentajes de callogénesis similares a los reportados por Valderrama (2004) para ‘Parda pastusa’ y ‘Diacol capiro’.

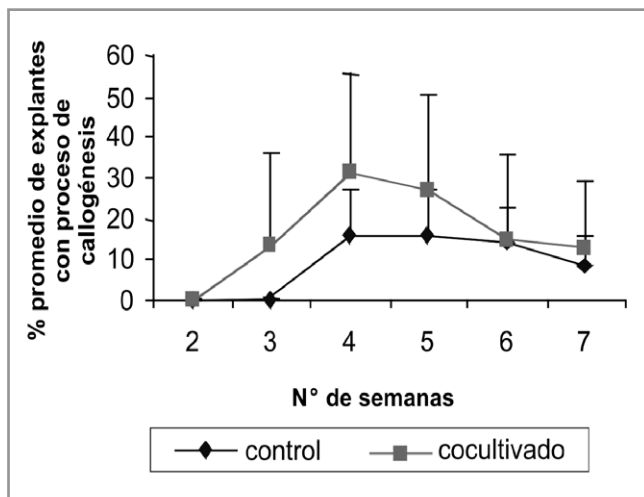


Figura 2. Comportamiento de la callogénesis a través del tiempo.

Ensayo GUS

El ensayo GUS fue aplicado entre la tercera y cuarta semana de cultivo a los explantes con procesos de callogénesis para analizar si el gene foráneo fue transferido,

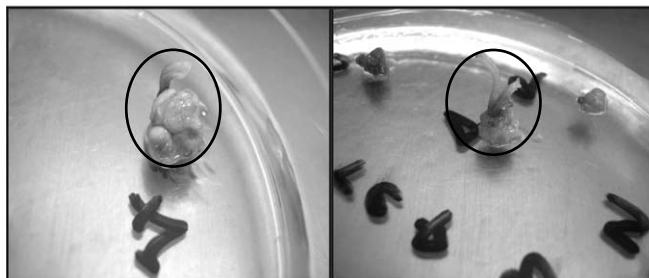


Figura 3. Callos cocultivados en la quinta semana de transformación con principios de regeneración.

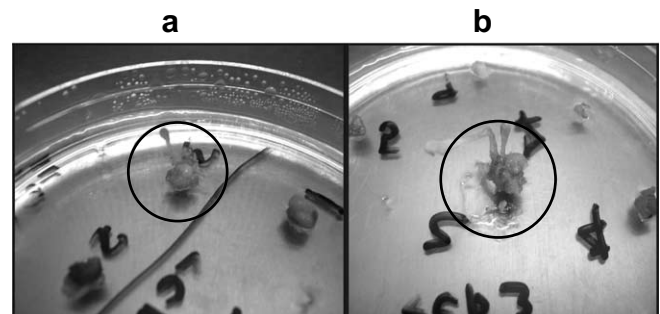


Figura 4. Callos control en la quinta semana de transformación con principios de regeneración: a) callo con un solo regenerante; b) callo con dos regenerantes.

Tabla 1. Porcentajes de callogénesis, regeneración y transformación reportados para las subespecies de *Solanum tuberosum* y diferentes variedades de papa utilizando kanamicina como marcador de selección.

Especie <i>Solanum</i>	Variedad	Explante	% Callogénesis	% Regeneración	% Transformación	Referencia
andigena	Parda	hoja	80	34	0-15 GUS (+)	(Trujillo et al., 2001)
	Diacol	hoja	47	28	47-58 GUS (+)	
andigena	Linea 7540	hoja	86.2 +/- 4.3	58 +/- 7.5	Sobre callo: 86.2 Sobre reg: 35.6 +/- 4.8	(Banerjee et al., 2006)
andigena	Diacol	hoja	33	33	40 PCR (+)	(Valderrama, 2004)
	Parda	hoja	29	29	42.8 PCR (+)	
	Pan Az	hoja	42	42	72 PCR (+)	
	Purace	hoja	34	34	9 PCR (+)	
tuberosum	Desiree	hoja	88.7 +/- 3.7	6.8 brotes	Sobre callo: 88.7 +/- 3.7	(Beaujean et al., 1998)
	Binje	hoja	95.2 +/- 2.8	9.3 brotes	Sobre callo: 95.2 +/- 2.8	
	Kapta vandel	hoja	74.7 +/- 3.4	8.2 brotes	Sobre callo: 74.7 +/- 3.4	
tuberosum	Desiree	hoja/entrenudo	No reportado	3.3/9.0	65-100 % GUS(+)	(Dale et al., 1995)
	P. dell	hoja/entrenudo	No reportado	22/43	0	
	P. crown	hoja/entrenudo	No reportado	3.5/0	65-100 % GUS(+)	
	Record y Mari pipe	hoja/entrenudo	No reportado	0/0	0	
tuberosum	Beroline	entrenudo	100	100	100 (PCR +)	(De Block, 1988)
	Bintje	entrenudo	100	100	99 (PCR +)	
	Desiree	entrenudo	100	100	100 (PCR +)	
	R.burbank	entrenudo	100	100	100 (PCR +)	
andigena	Pastusa suprema	entrenudo	31 +/- 2.52	2 +/- 0.77	Sobrecallo 31 +/- 2.5 30 (GUS +)	López, 2006

transcrito y traducido, y se hallaba codificando la enzima necesaria para metabolizar el sustrato. La presencia del intron de la catalasa ubicado en el medio de los exones GUS, asegura que el gen sólo se pueda expresar en un ambiente eucariota, puesto que en plantas el intron en el gen *gus* es eficientemente procesado, transcribiendo un RNA mensajero maduro y traduciendo la proteína GUS (Gilissen *et al.*, 1998).

De los 13 callos cocultivados y evaluados, cuatro fueron positivos para la prueba GUS (figura 5); esto da

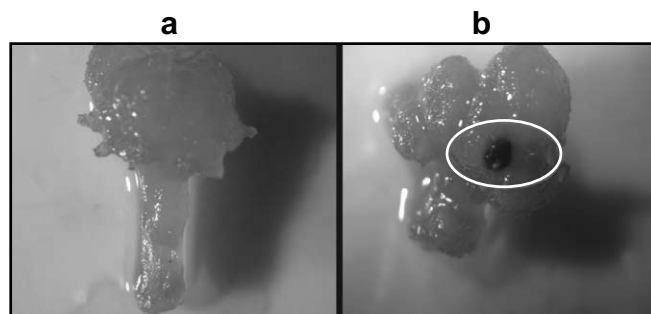


Figura 5. Callos utilizados en ensayo GUS: a) callo control que no expresa el gen *gus*; b) callo cocultivado que expresa el gen *gus*.

como resultado una frecuencia de expresión GUS del 30%. La presencia de la coloración azul indicó que el sustrato había sido metabolizado y, por lo menos, el gen *gus* llegó al ambiente cromosómico del genoma de la papa. Por otra parte, si el gen no hubiese sido integrado en el genoma nuclear, después de más de tres semanas de constante división, habría sido eliminado del ambiente cromosómico.

Extracción del DNA vegetal

Con las tres metodologías ensayadas se logró obtener DNA, a partir del cual se consiguió realizar digestión con la enzima *Hind III* (datos no mostrados); además, la amplificación con los *primers* tipo RAPD fue positiva para todas. Sin embargo, como se observa en la figura 6, se observó un mejor patrón de bandas con el procedimiento propuesto por Herrera *et al.* (2000). Por esta razón se escogió este protocolo para realizar la extracción de DNA de los callos potencialmente transformados. Por otro lado, este protocolo elimina impurezas que puedan interferir con la PCR tales como polifenoles, proteínas, restos de detergentes y sales (acetato de amonio o acetato de sodio) (Innis y Gelfand, 1990).

Análisis molecular por PCR

En primer lugar se realizó la amplificación del gen endógeno *cox* a partir de DNA aislado con cada uno de los protocolos. La amplificación se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de la amplificación del gen *nptII* para que sirviera como control interno de la amplificación del gen de interés. Se observó amplificación del gen endógeno (figura 7) a partir del DNA aislado con cada uno de los protocolos.

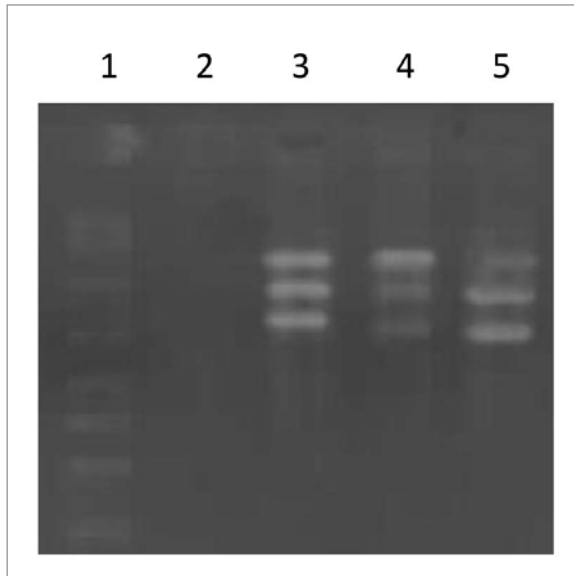


Figura 6. Amplificación por PCR utilizando *primers* tipo RAPD: carril 1) marcador de peso molecular 50-2000pb; carril 2) control absoluto (agua); carril 3) amplificación del DNA (Herrera *et al.*, 2000); carril 4) amplificación del DNA (Romano, 1998); carril 5) amplificación del DNA (Edwards *et al.*, 1991).

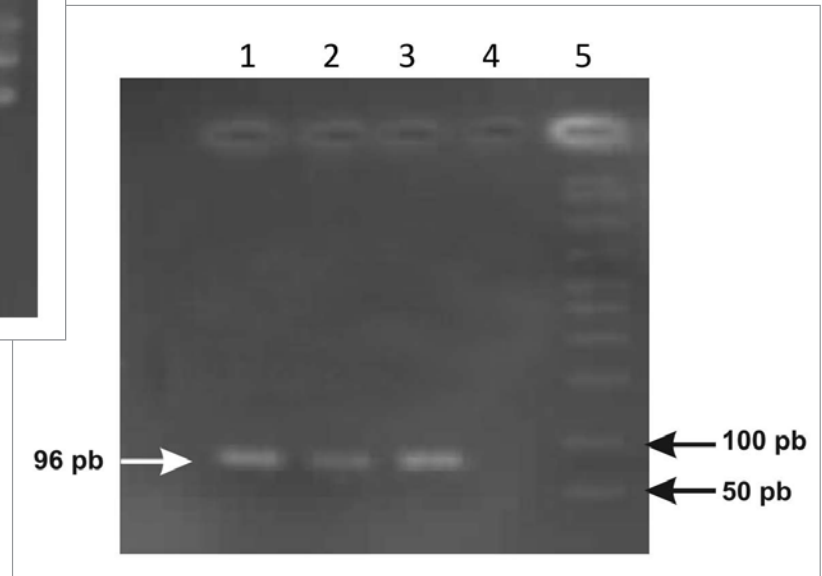


Figura 7. Amplificación del gen *cox* por PCR: carril 1) amplificación del *cox* en DNA CIP; carril 2) amplificación del gen *cox* en DNA (Romano, 1998); carril 3) amplificación del gen *cox* en DNA Edwards *et al.*, 1991); carril 4) control absoluto; carril 5) marcador de peso molecular de PCR.

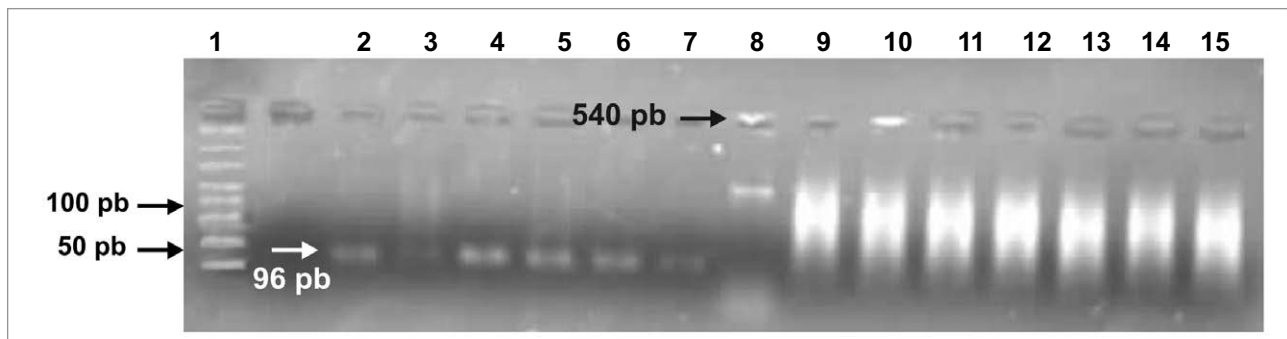


Figura 8. Análisis por PCR de los callos con índice de regeneración: carril 1) control absoluto; carriles 2 a 7) amplificación del gen *cox* en todas las muestras de DNA analizadas; carril 8) amplificación del gen *nptII* a partir de pDNA; carriles 9 a 15) reacciones negativas para el gen *nptII* en todas las muestras de DNA analizadas.

La extracción de DNA (Herrera *et al.*, 2000) se realizó a partir de callos derivados de explantes cocultivados en medios de selección, así como de callos derivados de explantes sin cocultivo en medios sin selección. Estas extracciones de DNA se utilizaron para realizar la amplificación del gen endógeno *cox* y del gen *nptII* (figura 8).

Como se puede observar en la figura 8 se obtuvo la amplificación del gen *cox* a partir de todas las muestras analizadas, pero no del gen *nptII*. Para eliminar cualquier artefacto del resultado en los ensayos de amplificación del gen *nptII* se hicieron algunas modificaciones: variación de la concentración de DNA entre 50-400 ng, reamplificaciones a partir de los productos de la primera amplificación, empleo de estimulantes de la reacción como diferentes concentraciones de DMSO (Innis

y Gelfand, 1990). Sin embargo hasta el momento no se ha logrado obtener ninguna amplificación (datos no mostrados). Una posible explicación de este hecho, reportado también por Ming-Tsair (1996), es que el gen se haya perdido por efecto de replicación y reparación del cassette de expresión, debido a eventos previos a la integración en el genoma hospedero o a que se haya presentado una delección parcial del T-DNA (Vries-Uijtewaal *et al.*, 1989).

Conclusiones

Aunque algunos autores afirmen que los procesos de transformación son independientes del genotipo (De Block, 1988; Kumari *et al.*, 1995), los valores obtenidos en este ensayo y los reportados para otros estudios de transformación en papa aportan mayor evidencia que los procesos de transformación son dependientes del genotipo, es decir de la variedad que se va a trabajar. Cada componente del proceso (tipo de explante, concentración de la bacteria, medio de cocultivo y tiempo de contacto, componentes del medio de selección y tiempos en general) dependen tanto de la especie, como de la subespecie o variedad que se vaya a trabajar (Figueira *et al.*, 1994; Dale y Harnpson, 1995; Trujillo *et al.*, 2001; Heeres *et al.*, 2002). Con base en estos resultados es recomendable, en el momento de aplicar cualquier protocolo de transformación en papa, realizar las respectivas modificaciones para ser adaptado a la variedad que se vaya a trabajar.

Finalmente, se avanzó hacia la obtención de un sistema de transformación para la variedad 'Pastusa suprema' a pesar de las características particulares del material biológico: a) pool genético complejo resultante de una doble hibridación, siendo uno de los parentales un híbrido interespecífico; b) es una variedad muy nueva, sin protocolos de cultivo de tejidos ni de transformación genética; c) probabilidad que sea un genotipo recalcitrante para transformación como han sido reportadas algunas variedades de papa: 'Aracy' y 'Baronesa' (Figueira *et al.*, 1994), 'Record' y 'Maris Piper' (Dale y Harnpson, 1995).

Debido a los problemas de enfermedades producidas por virus, bacterias y hongos (Estrada, 2000), el ataque de insectos plaga y las consecuencias económicas que conllevan (Sánchez *et al.*, 2000), este trabajo abre perspectivas para obtener plantas transgénicas de la variedad Pastusa suprema con genes de interés

agronómico. En Colombia son de interés aquellos genes que confieran resistencia a insectos lepidópteros, en especial a *T. solanivora*, así como a condiciones de estrés de tipo abiótico que es una de las mayores limitantes económicas (Martínez *et al.*, 2003). Para el caso de 'Pastusa suprema' es relevante transferir genes que aporten resistencia a heladas, característica negativa de esta variedad (Navia, 2005).

Literatura citada

- Andersson, M., A. Trifonova, A. Andersson, M. Johansson, L. Bulow y P. Hofvander. 2003. A novel selection system for potato transformation using a mutated AHAS gene. *Plant Cell Rpt.* 22, 261-267.
- Arévalo A. 2003. Análisis de la problemática en Colombia de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*. pp. 2425 En: CEVIPAPA (eds). Memorias *Tecia solanivora* II Taller Nacional. Bogotá, 190 p.
- Beaujean, A., R.S. Sangran, A. Lecardonnel y B.S. Sangran-Norreel. 1998. *Agrobacterium* mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. *J. Expt. Bot.* 49(326), 1589-1595.
- Banerjee, A.K., S. Prat y D. Hannapel. 2006. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. *sp. andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Plant Sci.* 170, 732-738.
- CEVIPAPA. 2006. En: <http://www.cevipapa.org.co/estadisticas/estadisticas.php#>; consulta: junio 2006.
- Chaparro A, X. Sinisterra, O. Quintero y J. Santos. 2003. Transformación de papa criolla variedad 'Yema de huevo' con un gen que codifica para un inhibidor de proteasas derivado del pomelo. pp. 114-117. En: CEVIPAPA (eds). Memorias *Tecia solanivora* II Taller Nacional. Bogotá, 190 p.
- Dale, P. y K. Harnpson. 1995. An assessment of morphogenic and transformation efficiency in a range of varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.) *Euphytica* 85, 101-108.
- De Block M. 1988. Genotype independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor. Appl. Genet.* 76, 767-774.
- Edwards, K., C. Johnstone y C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR análisis. *Nucleic Acids Res.* 19(6), 1349.
- Estrada, N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. PROINPA, CIP, CID. La Paz, 372 p.
- Figueira, E.S., L.F. Figueiredo y D.C. Monte Neshich. 1994. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) cv. Mantiqueira using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Rpt.* 13(12), 666-670.
- Ghislan M. Comunicación escrita. Mejoramiento y recursos genéticos. Centro Internacional de la Papa. -CIP-. e-mail: m.ghislan@cgiar.org; consulta: julio 2003.
- Gilissen, L., L.J. Metz, W.J. Stiekema y J.P. Nap. 1998. Review Biosafety of *E. coli* B-glucuronidase (GUS). *Plants Transgenic Res.* 7, 157-163.
- Heeres P., M. Schippers-Rozenboom, E. Jacobsen y R. Visser. 2002. Transformation of a large number of potato varieties: genoty-

- pedependent variation in efficiency and somaclonal variability. *Euphytica* 124, 13-22.
- Herrera, M., M. Ghislain y D. Zhang. 2000. Molecular biology laboratory protocols: Plant genotyping, crop improvement and genetic resources department training manual. International Potato Center (CIP). 3^a edition. Lima, Perú.
- Innis, M. y D. Gelfand. 1990. Substances affecting PCR: inhibition or Enhancement. PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press Inc.
- Jiménez, J. 2006. Regeneración de *Solanum tuberosum* L. variedad 'Pastusa suprema' a partir de explantes internodales. Trabajo de grado. Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Kumari, A., M. Miller, P. Whitty, J. Lyon y P. Davie. 1995. *Agrobacterium* mediated transformation of five wild *Solanum* species using *in vitro* microtubers. *Plant Cell Rept.* 14, 324-328.
- Lacorte, C. 1998. β -glucuronidase (GUS). pp. 128-129. En: Braileiro y Carniero (eds.). Manual de transformação genética de plantas. EMBRAPA, SPI/Embrapa, Cenargen, Brasilia. 309 p.
- Lacorte C. y E. Romano. 1998. Transferencia de vectores para *Agrobacterium*. pp 103-106. En: Braileiro y Carniero (eds.). Manual de transformação genética de plantas. Embrapa, SPI/Embrapa, Cenargen, Brasilia. 390 p.
- Lima, F.J. y E.L. Rech. 1998. Isolamento de vectores para transformação direta. pp. 1821. En: Braileiro y Carniero (eds.). Manual de transformação genética de plantas. Embrapa, SPI/Embrapa, Cenargen. Brasilia. 309 p.
- Martínez, H., C. Barrios y X. Acevedo. 2003. Características y estructura de la cadena de la papa en Colombia. Documento del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Observatorio de Agrociudades, Bogotá.
- Ming Tsair, C., LiangJwu, C. y HsinHsiung, C. 1996. Expression of *Bacillus thuringiensis* (B.t.) insecticidal crystal protein gene in transgenic potato. *Botanical Bul. Academia Sinica* 37, 1723.
- Navia, S. 2005. Entrevista en crónica: La papa 'Pastusa suprema' llega a los platos de los colombianos. En: www.portafolio.com.co. Bogotá; consulta: abril de 2006.
- Ñúñez, C. 2005. Comunicación personal. Director grupo de investigación en papa. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Perfetti, J., C. Téllez y C. Correa. 2003. Sistema de inteligencia de mercados. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Perfil del producto papa. Corporación Colombia Internacional. Bogotá. En: http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/2005113143530_perfil_papaOk.pdf; consulta: mayo 2006.
- Ritter, E. 2000. Aplicación de la biotecnología en la mejora genética de la patata. En: Pascualena J. y E. Ritter (eds.). Libro de Actas del Congreso Iberoamericano de Investigación y Desarrollo en Patata. Patata 2000. 3-6 julio, Vitoria-Gasteis, España.
- Romano, E. 1998. Extração de DNA de tecidos vegetais. pp 171. En: Braileiro y Carniero (eds.). Manual de transformação genética de plantas. Embrapa, SPI/Embrapa, Cenargen. Brasilia. 309 p.
- Sánchez, G., E. Londoño, L.A. Peña y E. Espitia. Manejo Integrado de Plagas. En: Manejo integrado del cultivo de la papa. Manual técnico. Corpoica, Bogotá. 160 p.
- Trujillo, C., E. Rodríguez, S. Jaramillo, R. Hoyos, S. Orduz y R. Arango. 2001. One step transformation of two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. *sp. andigena*). *Plant Cell Rpt.* 20, 637-641.
- Tzfira, T. y V. Citovsky. 2006. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion Biotechnol.* 17, 147-154.
- Valderrama A.M. 2004. Desarrollo de líneas de papa con posible resistencia a *Tecia solanivora* utilizando el gen *cryIAC* de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Visser, R., E.L. Jacobsen, A. Hesselting-Meinders, M.J. Schans, B. Witholt y W.J. Feenstra. 1989. Transformation of homozygous diploid potato with an agrobacterium tumefaciens binary vector system by adventitious shoot regeneration of leaf and stem segments. *Plant Mol. Biol.* 12, 329-337.
- Vries-Uijtewaal, L.J., W. Gilissen, E. Flipse, K. Sree Ramulu, W.J. Stiekema y B. de Groot. 1989. Fate of introduced genetic markers in transformed root clones and regenerated plants of monohaploid and diploid potato genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 78, 185-193.
- Weller, S.A., J.G. Elphinstone, N.C. Smith, N. Boonham y D.E. Stead. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, realtime, fluorogenic PCR (taqman) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(7), 2853-2858.
- Yaya, M.L. 2006. Desarrollo de un sistema de selección positiva para plantas transgénicas de papa (*Solanum tuberosum sp. andigena* var. 'Diacol capiro'). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas con énfasis en Genética. Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.