

**Expresión Gus en explantes de (*Solanum phureja* Juz. et. Buk) var. Criolla
Colombia, transformados con *Agrobacterium tumefaciens***

IVAN DARIO BARRERO FARFAN

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
BUCARAMANGA
2007**

**Expresión gus en explantes de *Solanum phureja* (juz. et. buk) var. Criolla
Colombia, transformados con *Agrobacterium tumefaciens***

IVAN DARIO BARRERO FARFAN

**Trabajo de grado presentado como requisito
para el título de Biólogo**

**Dr. Alejandro Chaparro Giraldo
Director**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
BUCARAMANGA
2007**

AGRADECIMIENTOS

A Alejandro Chaparro Giraldo por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por su enseñanza de vida y por su apoyo y colaboración en todo momento.

A Mary Luz Yaya Lancheros, por sus valiosas discusiones en el laboratorio y por sus contribuciones en este trabajo.

A los miembros del Grupo de Ingeniería Genética de plantas de la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo y colaboración en la realización de este proyecto.

A mis padres Elba Esperanza Farfán Castillo y Alberto Barrero por su comprensión, paciencia, cariño, enseñanzas y apoyo brindados en el transcurso de la carrera.

A mi hermano John Jairo Barrero Farfán por su trabajo y apoyo financiero durante estos años de mi carrera.

A Martha Patricia Murillo Jiménez, mi novia, amiga y esposa por su comprensión, apoyo y fortaleza en los momentos más difíciles de mi carrera.

A Irwin Rodolfo Duarte Sánchez, Guillermo Andrés Cuadros y Alix Johana Herrera por su valiosa y sincera amistad.

A los profesores de la Escuela de Biología UIS por su trabajo, compromiso y dedicación.

CONTENIDO

INTRODUCCION	8
1. MATERIALES Y METODOS	10
1.1 Propagación in Vitro de plántulas de papa criolla (<i>Solanum phureja</i>) Var. Criolla Colombia.	12
1.2 Condiciones de callogénesis y regeneración	12
1.3 Curva de sensibilidad a kanamicina	13
1.4 Transformación con agrobacterium tumefaciens	14
1.5 Ensayo de expresión gus	15
1.6 Análisis estadístico	16
2. RESULTADOS	15
2.1 Curva de sensibilidad a kanamicina	17
2.2 Ensayo de expresión GUS transitorio y estable	19
3. DISCUSION	21
BIBLIOGRAFIA	27

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Plásmido pCAMBIA2301	11
FIGURA 2.	Porcentaje de Calogénesis en los tratamientos con Kanamicina.	17
FIGURA 3.	Peso fresco vs Peso seco	18
FIGURA 4.	Viabilidad de los explantes vs Oxidación	20
FIGURA 5.	Expresión Gus estable	22
FIGURA 6.	Expresión Gus transitoria	22

RESUMEN

TITULO: Expresión gus en explantes de *Solanum phureja* (juz. et. buk) var. Criolla Colombia, transformados con *Agrobacterium tumefaciens*

Autor: Iván Darío Barrero Farfán **

Palabras claves: *Solanum phureja*, Actividad Gus, Expresión estable y transitoria, *Agrobacterium tumefaciens*, Variedad Criolla Colombia.

La expresión transitoria y estable del gen *gusA*-intron en explantes internodales de Papa criolla var. Criolla Colombia cocultivados con *Agrobacterium tumefaciens* es reportada. Con el fin de determinar la susceptibilidad de esta variedad a la transformación mediada por *A. tumefaciens*, explantes internodales de *Solanum phureja* fueron infectados con la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* que contiene el plásmido pCAMBIA2301. Este plásmido contiene el gen de resistencia a kanamicina *ntpII* y el gen reportero *gusA*-intron. La selección de los explantes potencialmente transgénicos fue realizada en medios con kanamicina. La eficiencia de transformación estable y transitoria fue calculada con base en la actividad GUS (β -glucuronidasa), detectada por el ensayo histoquímico X-gluc. La expresión transitoria y estable del gen *gusA*-intron fue observada en células del explante más bien que en tejidos completos. La eficiencia de transformación estable y transitoria obtenida fue del 6%. El porcentaje de regeneración fue bajo en comparación a los porcentajes reportados para Papa de año (*Solanum tuberosum*). No obstante el uso de explantes en buen estado fisiológico y el control de las condiciones de temperatura, humedad y luminosidad durante el proceso de regeneración puede incrementar el porcentaje de regeneración en esta nueva variedad. Estos resultados demuestran que la Papa criolla (*S. phureja* Juz. et. Buk) variedad Criolla Colombia es susceptible a la infección por *A. tumefaciens* y apropiada para realizar ensayos de transformación genética

* Proyecto de Grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Alejandro Chaparro Giraldo.

ABSTRACT

TITLE: Gus expression in *Solanum phureja* explants (juz. et. buk) cultivar Criolla Colombia, transformed with *Agrobacterium tumefaciens**

Author: Iván Darío Barrero Farfán **

Key words: *Solanum phureja*-Actividad-Gus-Expresión estable-transitoria-*Agrobacterium tumefaciens*-Variedad Criolla Colombia.

The stable and transient expression of the *gusA*-intron reporter gene in internodal explants of “Papa Criolla” cultivar Criolla Colombia co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* is reported. In order to determine the susceptibility of this cultivar to the *A. tumefaciens*-mediated transformation, internodal explants of *Solanum phureja* were infected by *A. tumefaciens* containing the vector pCAMBIA2301. This vector contains the kanamycin resistance gene *ntpII* and the reporter gene *gusA-intron*. The Selection of potential transgenic explants was performed on kanamycin-containing media. The stable and transient transformation efficiency was calculated on the basis of the GUS (β -glucuronidase) activity, detected by the histochemical X-Gluc essay. Transient and stable expression of the *gusA*-intron gene is observed in explants cells rather than in whole tissues. The stable and transient transformation efficiency obtained was 6%. The regeneration percentage was low in comparison to the results reported in Papa de año (*Solanum phureja*) Nonetheless, to employ explants in good physiological conditions and to control the temperature, humidity and luminosity conditions during the regeneration process could increase the regeneration efficiency in this cultivar. These results demonstrated that “Papa Criolla” (*Solanum phureja* Juz. et. Buk) Cultivar Criolla Colombia is susceptible to the *Agrobacterium tumefaciens* infection and to suitable to carry out transformation essays.

* Proyecto de Grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Alejandro Chaparro Giraldo

INTRODUCCIÓN

La papa criolla (*Solanum phureja*) es una especie diploide originaria de América tropical, derivada de *Solanum stenotomum* (Franco-Lara y Barker 1999), se distribuye desde el norte de Bolivia hasta el suroccidente venezolano con un centro de diversidad genética al sur de Colombia en el departamento de Nariño. (Carrasco y Pineda 1993, Carrasco 1994). Este cultivo presenta importantes características agronómicas y nutritivas, un significativo mercado interno en Colombia y un alto potencial como producto de exportación (Carrasco y Pineda 1993, Franco-Lara y Barker 1999, Ducreux et al., 2005). Razones por las cuales Colombia solicitó y obtuvo, la exclusión de *S. phureja* del Tratado Internacional sobre Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura de la FAO (TIRF) (<http://www.fao.org/>).

La variedad Criolla Colombia es una nueva variedad de papa criolla, liberada comercialmente durante el primer semestre del año 2005, que presenta un mayor período de reposo respecto a otras variedades cultivadas, alto rendimiento por cosecha, fresca duradera, consistencia sólida del producto y resistencia a enfermedades que atacan el cultivo como la gota. Esta variedad fue seleccionada a partir de la multivariedad yema de huevo. Este trabajo de mejoramiento genético fue realizado por el grupo de Investigación en Papa de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

La Ingeniería Genética ofrece la posibilidad de introducir genes específicos a las plantas sin alterar las características agronómicas propias de las variedades empleadas, permitiendo modificar y aumentar el pool de las variedades disponibles en poco tiempo (John y Veilleux 2003). La modificación genética de las variedades cultivadas a través de la ingeniería genética tiene un alto potencial para solucionar los problemas causados por el ataque de plagas; Reflejo de ellos son las cerca de 56 millones de ha mundiales sembradas con cultivos modificados genéticamente para resistencia a insectos (James 2006). Diferentes autores han producido variedades transgénicas de *Solanum tuberosum* resistentes a insectos (Kondrak et al, 2005, Meiyalaghan et al., 2005, Reed et al., Valderrama et al., 2007), hongos (Conrath et al., 2003, Johnson et al., 2003, Osusky et al., 2004) y virus (Franco y Lara 1999, Mlotshwa et al., 2002). Similarmente, variedades transgénicas de *Solanum phureja* con mayor producción de carotenos han sido reportadas. (Ducreux et a., 2005 a,b).

La producción de una planta transgénica implica el desarrollo de un sistema de regeneración y de transformación (Stanton 2003). Diferentes autores han encontrado que el porcentaje de regeneración y la eficiencia de transformación dependen del genotipo (Heeres et al., 2002, Nam et al., 1997, Trujillo et al., 2001), del explante o tejido y de la variedad empleada (Dale y Hampson 1995, Mysore et al., 2000). Por lo cual es necesario evaluar el potencial regenerativo de cada una de las variedades que pretenden ser involucradas en un programa de

transformación genética y determinar si son susceptibles a la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Las características agronómicas de Papa criolla (*Solanum phureja*) var. Criolla Colombia la hace una excelente candidata para realizar ensayos de transformación Genética. No obstante es necesario primero evaluar y determinar la susceptibilidad de esta variedad a la transformación mediada por *A. tumefaciens*. Con el fin de determinar la eficiencia de transformación transitoria y estable, explantes internodales fueron infectados con la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 que contiene el plásmido pCAMBIA2301 (Figura 1). La selección mediante kanamicina y la expresión gus determinaron una frecuencia de transformación del 6 %. Se reporta así por primera vez, los procesos iniciales de transformación genética para esta nueva variedad de Papa Criolla.

FIGURA 1. Plásmido pCAMBIA2301

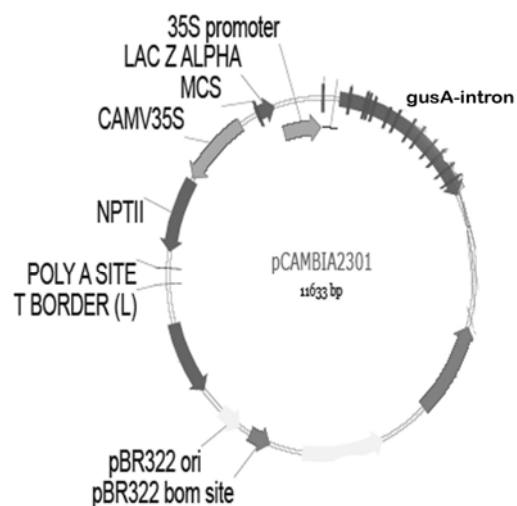


Figura 1. Plásmido pCAMBIA2301. Este vector contiene el gen reportero *gusA-intron* y el gen *ntpII* que codifica la proteína Neomicina Fosfotransferasa. Esta última proteína confiere resistencia al antibiótico kanamicina. La expresión de ambos genes está regulada por el promotor constitutivo CaMV35S. Tomado y reproducido con permiso de CAMBIA. (www.cambiar.org).

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 PROPAGACIÓN IN VITRO DE PLÁNTULAS DE PAPA CRIOLLA (*Solanum phureja*) VAR. CRIOLLA COLOMBIA.

Los individuos In Vitro de Papa criolla (*S.. phureja*) var. Criolla Colombia fueron propagados cada 4 semanas mediante el cultivo de segmentos terminales y los dos primeros entrenudos en medio sólido MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con 25 gr/l de azúcar comercial y 0.1 mg/l de ácido giberélico (AG3) y ajustado a pH 5,6. Las poblaciones fueron mantenidas a una temperatura de 20 °C ± 3 °C, un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y una humedad relativa de 55 ± 5 %. (Díaz-Granados Daza 2006, Díaz-Granados y Chaparro-Giraldo en prensa)

1.2 CONDICIONES DE CALLOGÉNESIS Y REGENERACIÓN

Las condiciones de regeneración para este ensayo fueron establecidas con base en el trabajo desarrollado por Díaz-Granados y Chaparro-Giraldo (en prensa) para la variedad yema de huevo. Los explantes fueron mantenidos en medios sólidos MS (Murashige y Skoog 1962) suplementados con 2 mg/l de Zeatina ribósido, 0.04 mg/l de ANA, 0.02 mg/l de AG3, 20 gr/l de Sacarosa y 50 mg/l de ácido

ascórbico a pH 5,6. Como agente gelificante se adicionó phytigel (2,8 gr/l). (Díaz-Granados y Chaparro-Giraldo en prensa). Los explantes se mantuvieron en frascos de vidrio con el sistema tapa-tapón para permitir el intercambio gaseoso (Chaparro-Giraldo, 1999) y en cajas de petri. Los explantes fueron mantenidos en un cuarto de cultivo a una temperatura de $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Los explantes se cambiaron de medio cada 3 semanas para evitar el agotamiento de los nutrientes y los reguladores de crecimiento.

1.3 CURVA DE SENSIBILIDAD A KANAMICINA.

Con base en las recomendaciones de López-Molinillo (2006) se determinó evaluar la sensibilidad de los explantes a la kanamicina mediante una curva de sensibilidad. Segmentos internodales de 0,5 a 1 cm. derivados de plántulas in Vitro de 4 semanas fueron colocados en medios de regeneración con 4 diferentes concentraciones de Kanamicina (25, 50, 75 y 100 mg/L). Como control se emplearon medios de regeneración sin kanamicina. Semanalmente se evaluó el porcentaje de clorosis, oxidación y callogénesis. Los explantes se cambiaron de medio cada tres semanas. Después de la séptima semana se tomó el peso fresco y seco de los explantes por réplica para los diferentes tratamientos con kanamicina y el tratamiento control.

1.4 TRANSFORMACIÓN CON *Agrobacterium tumefaciens*.

Para los ensayos de transformación genética se emplearon los protocolos descritos previamente por Díaz-Granados Daza (2006) y por Ducreux et al., (2005). El primer ensayo de transformación se realizó con base en el protocolo descrito por Díaz-Granados Daza (2006). Explantes internodales de 0.5 a 1 cm. provenientes de plántulas de 6 semanas de edad fueron cocultivados con la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 previamente transformada con el plásmido pCAMBIA2301. (López-Molinello 2006). La bacteria se cultivo previamente en medio Luria-Bertani con 50 mg/L de kanamicina y estreptomicina durante 17 horas a 28 C° y 250 rpm, hasta obtener un OD600nm de 0.6. La suspensión bacteriana se diluyó en medio MS suplementado con 20 mg/L de asetosiringona, utilizando una concentración de bacteria precrecida de 1/50 para el cocultivo. Los explantes se agitaron manualmente en esta suspensión durante 30 minutos, posteriormente los explantes se secaron en papel absorbente y se transfirieron a medios de regeneración suplementados con cefatoxina (250 mg/L) y Kanamicina (50 mg/L).

Para el segundo ensayo de transformación, el cocultivo se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ducreux et al., (2005). En este ensayo se emplearon explantes internodales provenientes de plántulas de 5 semanas de edad. La bacteria se cultivó previamente como se describió anteriormente hasta alcanzar un OD600nm de 1.2. Esta suspensión bacteriana fue concentrada mediante

centrifugación y luego resuspendida en medio MS. Luego esta suspensión bacteriana fue adicionada al medio de cocultivo (MS), suplementado con 20 mg/l de acetosiringona. Se empleó una concentración bacteriana de 1:50 para el cocultivo. Los explantes fueron mantenidos en esta solución de 5 a 10 minutos sin agitación y como paso adicional se incluyó un cocultivo sólido de 48 horas en luz. Posteriormente los explantes fueron transferidos a medios de regeneración. Para ambos protocolos, los explantes cocultivados fueron mantenidos en una cámara de crecimiento para plantas (Phytotron Sanyo) con las siguientes condiciones: temperatura de $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, humedad del $60 \pm 2\%$ y una iluminación de 3000 Lux.

1.5 ENSAYO DE EXPRESIÓN *Gus*.

Este ensayo se realizó con base en el protocolo descrito por Lacorte (1998). 50 mg de X-Gluc fueron disueltos en 1 ml de Dimetil sulfóxido (DMSO). Esta solución se adicionó a 100 ml de tampón de reacción ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100mM, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM, Triton X-100 0.1%, X.Gluc 50 mg/ml 1mM). Se tomaron 10 explantes sin cocultivo como control. Después de 72 horas del cocultivo, se tomaron 100 explantes para el ensayo de expresión transitoria y 15 callos de 11 semanas para el ensayo de expresión estable. Los explantes y callos se retiraron del medio de regeneración y se lavaron con agua destilada estéril. Después fueron secados en papel absorbente y se colocaron en

tubos eppendorf estériles de 0.6 ml, cubiertos por el tampón de reacción. Posteriormente, fueron incubados en oscuridad a una temperatura de 37°C por 36 horas. Después se adicionó etanol al 70 % para interrumpir la reacción y retirar la clorofila. Luego de 24 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 un estereoscopio.

1.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

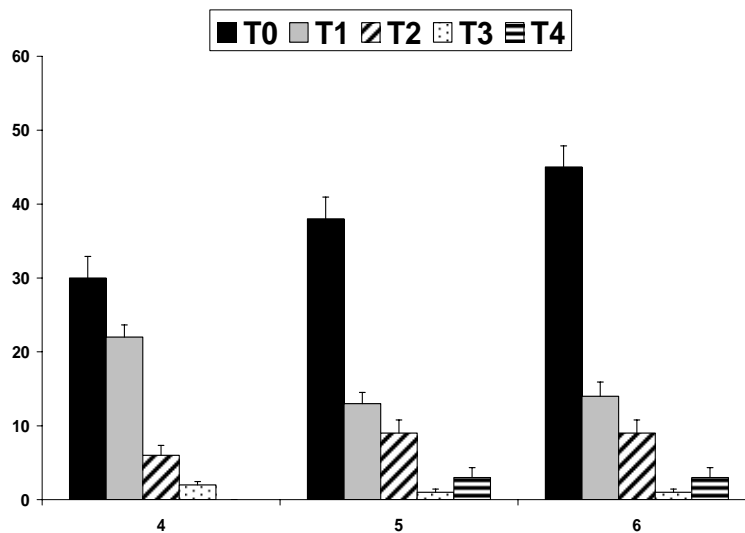
Con los datos obtenidos en la curva de sensibilidad a kanamicina para las variables peso seco y peso fresco, se realizó una prueba de Normalidad de Shapiro-Wilks. Basados en estos resultados, se realizó una prueba no paramétrica de kruskall-Wallis para establecer si hubo diferencias estadísticas significativas entre el peso fresco y seco de los explantes para los diferentes tratamientos con kanamicina. Finalmente, se determinó mediante un gráfico de Whisker-Box la diferencia entre las medianas de los tratamientos con kanamicina y el control. (STATIGRAPHS v4.0). Las pruebas se realizaron asumiendo un nivel de confiabilidad del 95%.

2. RESULTADOS

2.1 CURVA DE SENSIBILIDAD A KANAMICINA.

El tratamiento control presentó un menor porcentaje de oxidación y clorosis respecto a los tratamientos con kanamicina (resultados no mostrados). El porcentaje de calogénesis para el tratamiento control fue mayor que para el resto de los tratamientos. El menor porcentaje de calogénesis lo presentó el tratamiento 3. (Figura 2).

FIGURA 2. Porcentaje de Calogénesis en los tratamientos con Kanamicina.

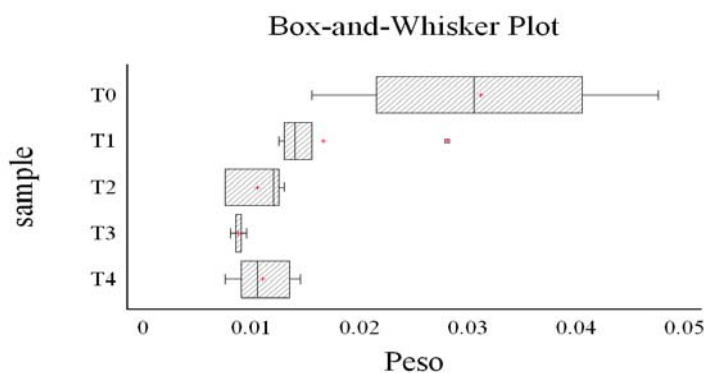


Numero de callos con procesos de calogénesis a la cuarta, quinta y sexta semana en los diferentes tratamientos. T0=Control, T1=25 mg/l, T2=50mg/L, T3= 75 mg/L y T4=100 mg/L. las barras de error representan la desviación estándar (SD).

Las variables peso seco y peso fresco para los tratamientos con kanamicina, no presentaron una distribución normal de acuerdo a la prueba de Shapiro Wilks ($p \leq 0,05$), por lo tanto se realizó una prueba no-paramétrica de Kruskal Wallis. Para la variable peso fresco, no se encontraron diferencias significativas. ($P=0.088 \geq 0.05$). En contraste, para la variable peso seco se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos ($P < 0.01$).

La ganancia de peso seco fue mayor para el tratamiento control, mientras los tratamientos con kanamicina tuvieron una ganancia menor de peso seco (Figura 3). El tratamiento 3 presentó la menor ganancia de peso seco, mientras el resto de los tratamientos con kanamicina tuvieron una distribución de valores de peso seco similar. Estos resultados corroboran el efecto tóxico que ejerce la kanamicina sobre la síntesis de proteínas en el cloroplasto y la mitocondria en plantas

FIGURA 3. Peso fresco vs Peso seco



(Brasileiro y Aragão 2000, Miki & Hough 2004). Dado que el tratamiento 1 presento un mayor porcentaje de calogénesis, se determino emplear una concentración de

Gráfico de Whisker-Box para la variable seco para los diferentes tratamientos con kanamicina y el control (T0). Se partió de 10 réplicas para el tratamiento control y 5 réplicas para los tratamientos con kanamicina. Cada réplica tenía 10 explantes.

kanamicina de 50 mg/L para los ensayos de transformación genética con el fin de disminuir el porcentaje de escapes.

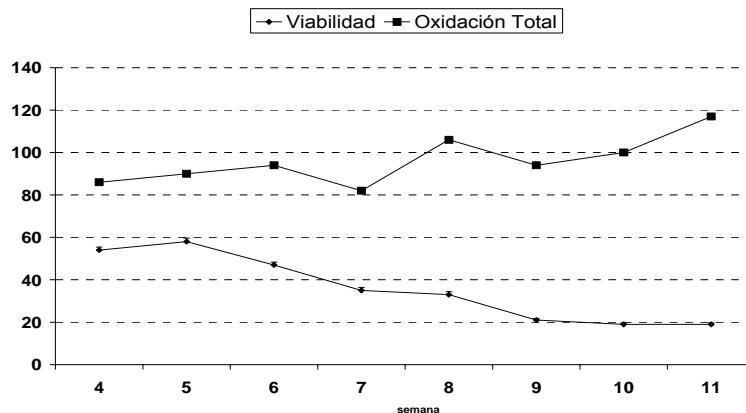
2.2 EXPRESIÓN GUS TRANSITORIA Y ESTABLE.

En el tratamiento control para el primer ensayo de transformación, los explantes no cocultivados en la tercera semana ya eran inviables en medios de selección con kanamicina. En los explantes cocultivados del primer ensayo de transformación, se observaron signos de callogénesis a partir de la 4 semana, mientras en el segundo ensayo de transformación se observaron callos a la tercera semana. En el primer ensayo de transformación solo el 32% de los explantes cocultivados eran viables y los signos de clorosis y oxidación eran evidentes en la mayoría de los explantes durante la 4 semana. En la sexta semana se observaron los primeros regenerantes. Los explantes que presentaron regenerantes tenían aproximadamente 4 regenerantes por callo. Después de 11 semanas de selección en Kanamicina (50 mg/L), solo 19 explantes de 190 eran viables y solo dos de estos explantes presentaban regenerantes. El porcentaje de

oxidación del ensayo fue del 52% y fue el proceso que más afectó la viabilidad de los explantes. (Figura. 4).

Dado el bajo porcentaje de regeneración presentado por los explantes cocultivos a las 11 semanas en el primer ensayo de transformación, se decidió realizar el ensayo GUS sobre 15 explantes viables que presentaban procesos de calogénesis hasta ese momento. Los explantes con regenerantes no fueron empleados para el ensayo GUS porque este ensayo es destructivo. De los 15 callos cocultivos sometidos al ensayo GUS, 11 de ellos presentaron evidencias del metabolismo del sustrato x-gluc por la presencia del precipitado insoluble azul

FIGURA 4. Viabilidad de los explantes vs Oxidación



Numero de explantes cocultivos viables y con oxidación total a través del tiempo. Desde la cuarta semana hasta la onceava semana en medios de selección con kanamicina. Se partió se 190 explantes de entrenado cocultivos con *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (pCAMBIA2301) y 10 explantes por réplica. Las barras de error representan la desviación estándar (SD).

(Fig. 5). Los focos de coloración azul obtenidos fueron muy pequeños y comprendían células de la corteza del explante (Figura 5). De acuerdo con los resultados de la expresión del gen *gusA-intron*, se determinó que la eficiencia de transformación fue del 6.8%.

En el ensayo de transformación transitoria, después de 72 horas del cocultivo sólido, solo 6 explantes de 100 presentaron la coloración azul que evidencia el metabolismo del sustrato x-gluc. La coloración fue observada en células corticales de los explantes. (Fig. 6). Para este ensayo se determinó una eficiencia de transformación del 6%. Para los explantes control no se detectó la coloración azul que evidencia la degradación del sustrato X-gluc y la expresión del gen *gusA-intron*.

3. DISCUSION

El porcentaje de callogénesis observado después de 7 semanas fue significativamente menor al reportado por Díazgranados y Chaparro-Giraldo (2006) bajo las condiciones citadas en ese trabajo. Una de las posibles causas que pudieron afectar este porcentaje fueron las variaciones en la temperatura que se presentaron en el cuarto de cultivo durante la regeneración de los explantes.

FIGURA 5. Expresión Gus Estable

FIGURA 6. Expresión Gus transitoria

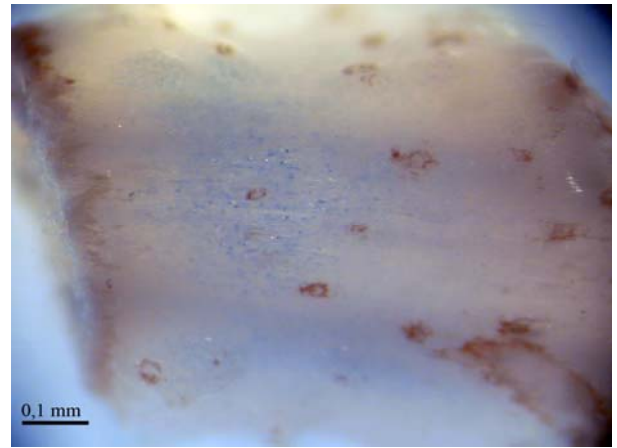
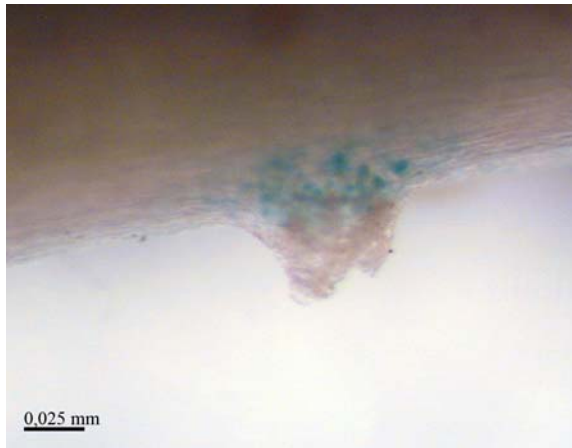


Figura 5. Expresión estable del gen gus-intron en células corticales de explantes internodales cocultivados con *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (pCAMBIA2301) después de 11 semanas. Aumento de 50X.

Figura 6. Expresión transitoria del gen gus-intron en células corticales de explante cocultivado con *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (pCAMBIA2301) después de 72 horas. Aumento de 20X.

Carvajal-Bernal (2004) reportó la obtención de callos y regenerantes de *Solanum phureja* (Var. Yema de Huevo) después de lograr controlar las condiciones de temperatura y humedad en el cuarto de crecimiento. De la misma manera Gómez y colaboradores (1997) citan que además de un adecuado balance de citoquininas y auxinas, la temperatura, la iluminación y el estado fisiológico de los explantes también influyen en la respuesta morfogénica. Otra posible causa de esta bajo

porcentaje de regeneración fue que Díaz-Granados y Chaparro-Giraldo (En prensa) trabajaron con la multivariada yema de huevo clon 1, mientras en este trabajo se empleo la variedad Criolla Colombia. Dado que ambas variedades no son la misma, se espera que la respuesta morfogénica no sea uniforme. Dale y Hampson (1995) y Heeres y colaboradores (2002) evaluaron la susceptibilidad a la transformación mediada por *A. tumefaciens* y la capacidad morfogénica en 34 diferentes variedades de *S. tuberosum* para 3 tipos de explantes provenientes de: discos de tubérculo, entrenudos y hojas, estos autores reportan variaciones en los procesos de regeneración y de transformación asociados con el tipo de explante y variedad empleada para los ensayos de transformación genética.

El bajo porcentaje de regeneración obtenido en el ensayo de transformación estable a las 11 semanas, puede ser explicado por dos posibles hipótesis. Primero, el proceso de selección con kanamicina pudo afectar la respuesta morfogénica de los explantes, debido a su efecto tóxico sobre la fidelidad en la traducción de proteínas en el cloroplasto y la mitocondria (Brasileiro y Aragão 2001, Miki y Mchugh 2004). Segundo, basados en los resultados de la expresión del gen *gusA*-intron en grupos de células de los explantes más bien que en tejidos completos y dado que los genes de resistencia a kanamicina *ntpII* (Neomicina fosfotransferasa) y el gen reportero *gusA*-intron están presentes en el mismo vector (Fig. 1), se puede sugerir que la expresión de la proteína neomicina

fosfotransferasa fue también baja y por lo tanto insuficiente para metabolizar la kanamicina y contrarrestar los efectos tóxicos mencionados previamente.

La expresión del gen *gusA-intron* en células de explantes más bien que en tejidos completos se espera, puesto que no se realizó el ensayo GUS sobre plantas completas con tejidos diferenciados, sino sobre explantes y callos, donde es normal encontrar células transformadas y no transformadas. Por otro lado, la inclusión de una fase de cocultivo sólido puede aumentar la eficiencia de transformación y por lo tanto la Actividad GUS. Esta fase de cocultivo sólido tiene como objetivo que *A. tumefaciens* permanezca más tiempo con las células y aumente el porcentaje de infección. A pesar de que, Ducreux y colaboradores (2005) y Franco-Lara (1999) incluyeron en sus ensayos de transformación una fase de cocultivo sólido, en este trabajo se decidió excluir la fase de cocultivo sólido basados en los resultados obtenidos por Carvajal-Bernal (2004) quien observó que el cocultivo sólido disminuía la viabilidad de los explantes. Otros autores (Deng et al., 1995 y Hansen 2000) también reportan procesos de necrosis y de oxidación en células de Maíz y *Vitis vinifera* después del cocultivo con *A. tumefaciens*.

Respecto a la eficiencia de transformación obtenida de acuerdo con el ensayo histoquímico se puede afirmar que es más alta que la eficiencia de transformación reportada por Ducreux et al., (2005). Estos autores reportan 30 líneas

transgénicas a partir de 1000 explantes distribuidos en 6 ensayos de transformación, lo cual implica una eficiencia de transformación aproximada del 3%. Franco y Lara (1999) no reportaron la eficiencia de transformación ni el número de líneas transgénicas obtenidas en sus ensayos de transformación. Actualmente, solo dos artículos reportan la obtención de líneas transgénicas de *S. phureja* y ninguno ha reportado la expresión del gen reportero *gusA-intron* en esta especie de papa. Los porcentajes de regeneración y de transformación en papa criolla (*Solanum phureja*) son bastantes bajos en comparación con los obtenidos en la subespecie de Papa de año (*Solanum tuberosum*). (Banerjee et al., 2006, Valderrama 2004). Trujillo y Colaboradores (2001) reporta eficiencias de transformación del 15 al 50% basado en el ensayo de expresión del gen GUS.

Finalmente, con base en los resultados de la expresión del gen *gusA-intron* y la obtención de explantes viables en kanamicina, se puede concluir que *A. tumefaciens* infectó células de explantes internodales derivados de plántulas de *S. phureja* variedad Criolla Colombia y que esta variedad es apropiada para realizar ensayos de transformación empleando genes de interés agronómico. De la misma manera, se puede sugerir, con base en las experiencias previas del Grupo de Ingeniería Genética de Plantas y en este trabajo que la eficiencia de transformación se puede incrementar, empleando explantes en buen estado fisiológico y controlando las condiciones ambientales de temperatura, humedad y luz durante las etapas de regeneración. En los diferentes trabajos desarrollados en

el grupo de Ingeniería Genética de Plantas y en observaciones realizadas en el laboratorio, se ha detectado que la Papa Criolla (*S. phureja*) es bastante sensible a los cambios de temperatura, y humedad. Variaciones mínimas en el ambiente induce procesos de estrés en la planta, afectando la respuesta morfogénica y la viabilidad de los explantes. En contraste, Papa de año (*Solanum tuberosum*) siempre ha presentado una mayor resistencia a los cambios en las condiciones In-Vitro de Cultivo. Dado esta susceptibilidad de *S. phureja* en las condiciones iniciales de regeneración, también se sugiere que aplicar el proceso de selección con antibióticos 10 o 12 días después puede aumentar la viabilidad de los explantes. Con base en los altos porcentajes de oxidación observados durante el proceso de regeneración también es aconsejable mantener los explantes en oscuridad los primeros días después del cocultivo con el fin de disminuir los procesos de oxidación. Por último, la inclusión de una fase de cocultivo sólido durante 36 o 48 horas podría aumentar la infección de *A. tumefaciens*. No obstante, para evitar que los explantes pierdan viabilidad por el cocultivo se debe realizar el cocultivo líquido por 5 o 10 minutos y secar bien los explantes para evitar sobreinfección durante el cocultivo sólido.

BIBLIOGRAFIA

ASHOURI A. Transgenic-Bt potato plant resistance to the colorado potato beetle affect the aphid parasitoid *Aphidius nigripes*. *Commun Agric Appl Biol Sci*. 2004; 69(3):185-9. Links

BANERJEE AK, PRAT S, HANNAPEL DJ. Efficient production of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L. ssp. *andigena*). *Plant Sci*. 2006;170: 732-738.

BRASILEIRO ACM, CARNEIRO VTC. Introdução à transformação genética de plantas En: BRASILEIRO A, V. CARNEIRO, editors. *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Brasília. EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-Cenagen; 1998 p 128-129.

BRASILEIRO ACM, ARAGÃO FJL. Marker genes for in vitro selection of transgenic plants. *J. Plant Biotechnol*. 2001; 3(3):113-121.

CARRASCO CA. Descripción de clones de papa criolla 'yema de huevo' *Solanum phureja* colectados en diferentes campos de cultivo. *Rev. Papa*. 1994; 10: 6–13.

CARRASCO CA, PINEDA R. Papa criolla 'yema de huevo': una multivariedad nativa. *Rev. Papa*. 1993; 7: 14–19.

CARVAJAL D. Estudios orientados a la transformación de papa criolla (*Solanum phureja*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. (Tesis de pregrado). Bogotá: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2004.

CONRATH U, LINKE C, JEBLICK W, GEIGENBERGER P, QUICK WP, NEUHAUS HE. Enhanced resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani* in leaves and tubers, respectively, of potato plants with decreased activity of the plastidic ATP/ADP transporter. *Planta*. 2003;217(1):75-83.

CHAPARRO-GIRALDO A. Efeitos pleiotrópicos em plantas transgênicas de batata (*Solanum tuberosum* L.) Cv. Bintje associados à expressão da leghemoglobina de soja no interior dos cloroplastos. (Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas). São Paulo: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo;1999.

DALE PJ, HAMPSON KK. An assessment of morphogenetic and transformation efficiency in a range of varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Euphytica*. 1995; 85:101-108.

DE LA RIVA G, CABRERA-GONZÁLES J, VÁZQUEZ-PADRÓN R, AYRA-PARDO C. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. Electron. J. Biotechnol.1998;1(3):1-16.

Deng, W, PU XA, GOODMAN RN, GORDON MP, NESTER EW. T-DNA genes responsible for inducing a necrotic response on grape vines. Mol. Plant-Microbe Interact. 1995; 8:538–548.

DIAZGRANADOS C, CHAPARRO-GIRALDO A. Desarrollo de un sistema de regeneración en papa criolla *Solanum phureja* Juz. et. Buk. Var. yema de huevo clon 1. Acta Biológica Colombiana. En prensa.

DIAZ-GRANADOS DAZA C. Producción de plantas transgénicas de *Solanum phureja* variedad Yema de Huevo mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. (Tesis de Maestría). Bogotá: Departamento de Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2006.

DUCREUX LJ, MORRIS WL, HEDLEY PE, SHEPHERD T, DAVIES HV, MILLAM S, TAYLOR MA. Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of beta-carotene and lutein. J Exp Bot. 2005a ;56 (409):81-9.

DUCREUX L, MORRIS W, TAYLOR M, MILLAM S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Solanum phureja*. *Plant Cell Rep.* 2005b ; 24:10–14

FRANCO-LARA L, BARKER H. Characterisation of resistance to potato leafroll virus accumulation in *Solanum phureja*. *Euphytica.* 1999; 108: 137–144.

GELVIN S. *Agrobacterium* and Plant Genes Involved in T-DNA Transfer and Integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2000; 51:223–256.

GELVIN S. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003; 51:223-256

GOMEZ LM, JARAMILLO E, JARAMILLO S, HOYOS R. Regeneración de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) a partir de tejido foliar en las variedades Diacol Capiro y Parda Pastusa. *Revista Papa.* 1997; 17. Disponible en: <http://www.redepapa.org/documentosred.html>.

HANSEN G. Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2000; 13: 649–657.

HEERES P, SCHIPPERS-ROZENBOOM M, JACOBSEN E, VISSER R. Transformation of a large number of potato varieties: genotype-dependent variation in efficiency and somaclonal variability. *Euphytic*. 2002; 124: 13–22.

JAMES C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. *ISAAA Brief* No. 35. ISAAA: Ithaca, NY. 2006.

JEFFERSON RA, KAVANAGH TA, BEVAN WM. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*. 1987; 6(13):3901-3907.

JOERSBO M. Advances in the selection of transgenic plants using non-antibiotic marker genes. *Physiol Plant*. 2001;111:269-272.

JOHNSON AT, VEILLEUX RE. Integration of transgenes into sexual polyploidization schemes for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Euphytica*. 2003; 133: 125–138.

KONDRÁK M, KUTAS J, SZENTHE B, PATTHY A, BÁNFALVI Z, NÁDASY M, GRÁF L, ASBÓTH B. Inhibition of Colorado potato beetle larvae by a locust proteinase inhibitor peptide expressed in potato. *Biotechnol Lett*. 2005; 12:829-34.

LACORTE C. 1998. β –Glucuronidase (GUS). En: BRASILEIRO A, V. CARNEIRO, editors. Manual de Transformação Genética de Plantas. Brasília. EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-Cenagen; 1998 p 128-129

LOPEZ-MOLINILLO A. Transformación Genética Mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y recuperación de plantas transgénicas de Papa (*Solanum tuberosum sp andigena* var. Pastusa suprema). (Tesis de maestría en Ciencias Microbiológicas). Bogotá: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia;2006.

MEIYALAGHAN S, TAKLA MF, JAIMESS O, YONGJIN S, DAVIDSON MM, COOPER PA, BARRELL PJ, JACOBS ME, WRATTEN SD, CONNER AJ. Evaluation of transgenic approaches for controlling tuber moth in potatoes. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 2005;70 (4):641-50.

MIKI B, MCHUGH V. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, Alternatives and biosafety. *J. Biotechnol.* 2004;107: 193–232.

MLOTSHWA S, VERVER J, SITHOLE-NIANG I, PRINS M, VAN KAMMEN AB, WELLINK J. Transgenic plants expressing HC-Pro show enhanced virus sensitivity while silencing of the transgene results in resistance. *Virus Genes.* 2002;25(1):45-57.

MYSORE SK, KUMAR CT, GELVIN S. Arabidopsis ecotypes and mutants that are recalcitrant to *Agrobacterium tumefaciens* root transformation are susceptible to germ-line transformation. Plant J. 2000; 21(1): 9-16.

MURASHIGE T, SKOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant. 1962; 15: 473-497

NAM J, ANN G, MATTHYSSE B, STANTON BG. Differences in Susceptibility of Arabidopsis Ecotypes to Crown Gall Disease May Result from a Deficiency in T-DNA Integration. The Plant Cell. 1997; 9: 317-333.

OSUSKY M, OSUSKA L, HANCOCK RE, KAY WW, MISRA S. Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot. Transgenic Res. 2004;13(2):181-90.

PORRAS P. Guía para la papa criolla. Papas Colombianas. 2da edición. Bogota. 65-69. 2000.

REED GL, JENSEN AS, RIEBE J, HEAD G, DUAN JJ. Transgenic Bt potato and conventional insecticides for Colorado potato beetle management: comparative efficacy and non-target impacts. Entomol Exptl Appl. 2001; 100: 89–100.

TRUJILLO C, RODRÍGUEZ-ARANGO E, JARAMILLO S, HOYOS R, ORDUZ S & ARANGO R. One-step transformation of two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. spp. *andigena*). Plant Cell Reports. 2001; 20: 637-641

VALDERRAMA AM. Desarrollo de líneas de papa con posible resistencia a *Tecia solanivora* utilizando el gen cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*. (Tesis de maestría en Biotecnología). Medellín: Facultad de ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellin; 2004.

VALDERRAMA AM, VELÁSQUEZ N, RODRÍGUEZ E, A ZAPATA, ZAIDI MA, ALTOSAAR I, ARANGO R. Resistance to *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) in three transgenic Andean varieties of potato expressing *Bacillus thuringiensis* CryIAc protein. J Econ Entomol. 2007; (1):172-9.

TZFIRA T, CITOVSKY V. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. Mol Plant Pathol. 2000; 1(4): 201-212.

TZFIRA T, CITOVSKY V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 2006;17: 147-154.

ZUPAN J, RUTH TR, DRAPER O, ZAMBRYSKY P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J.* 2000; 23(1): 11-28.