

# Transformación eficiente de segmentos de tallos de papa de la variedad Désirée, utilizando fosfinotricina como marcador de selección

✉ Natacha Soto, Gil A Enríquez, Aleines Ferreira, Miriel Corrada, Alejandro Fuentes, Kenia Tiel, Merardo Pujol

División de Plantas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB  
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, AP 6162, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba  
E-mail: natacha.soto@cigb.edu.cu

## RESUMEN

Se desarrolló una metodología rápida y eficiente para la transformación genética de segmentos internodales de tallos de papa (*Solanum tuberosum* L.), de la variedad Désirée, mediante *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando fosfinotricina (PPT, glufosinato de amonio) como agente de selección. Esta metodología provocó una eficiencia de transformación del 68% y la inducción de brotes después de 4 a 5 semanas en presencia de 2 mg/L de fosfinotricina. Se empleó exitosamente el ensayo del clorofenol rojo en segmentos de hojas de plantas transformadas, lo cual demostró la expresión del gen *bar*. La presencia de este gen en el genoma de los clones resistentes se confirmó mediante reacción en cadena de la polimerasa. Además, se observó la elevada resistencia de clones transgénicos hasta la concentración de 500 mg/L de fosfinotricina, con un desarrollo fenotípico normal. Estas plantas transgénicas se transplantaron a casas verdes, y después de ser asperjadas con el herbicida Finale® (Bayer CropScience), a una concentración de 2.5 L/ha, se mantuvieron vigorosas y de color verde, a diferencia del control no transgénico, que murió después de 7 días.

**Palabras clave:** papa, transformación genética, resistencia a herbicida, Finale®, PPT, fosfinotricina

*Biotecnología Aplicada* 2007;24:132-138

## ABSTRACT

**Efficient transformation of potato stems segments from cultivar Désirée, using phosphinothricin as selection marker.** A fast and efficient methodology for transforming internodal segments in stems of potato (*Solanum tuberosum* L.) Désirée cultivar, with *Agrobacterium tumefaciens* and by using phosphinothricin (PPT, glufosinate ammonium) as selection agent, was developed. Shoots obtained with 68% transformation efficiency were induced 4 to 5 weeks later in the presence of phosphinothricin at 2 mg/L. The chlorophenol red assay was successfully employed in segments of leaves from transformed plants, demonstrating the expression of the *bar* gene, and its presence was confirmed in the genome of explants by polymerase chain reaction. Moreover, increased resistance of transgenic clones at phosphinothricin concentrations up to 500 mg/L was observed, also showing a normal phenotypic development. These transgenic plants were transplanted into greenhouses where they also showed to be resistant to the Finale® herbicide (Bayer CropScience) at a concentration 2.5 L/ha, growing green and vigorously as did not the non-transgenic control plants that died 7 days after treatment.

**Keywords:** potato, genetic transformation, herbicide resistance, Finale®, PPT, phosphinothricin

## Introducción

La papa (*Solanum tuberosum* L.), por su alta productividad y su elevado contenido de carbohidratos, vitaminas y proteínas, constituye uno de los cultivos de mayor importancia para la alimentación mundial. En Cuba, anualmente se plantan alrededor de 13 000 hectáreas de papa, con un rendimiento medio entre 18 y 25 toneladas por hectárea, que equivale a 300 000 toneladas anuales [1]. Sin embargo, los rendimientos pueden aumentar hasta el 30% si se disminuye la elevada incidencia de las malezas [2].

Las malezas constituyen un problema a escala mundial, ya que afectan los rendimientos y la calidad de numerosos cultivos de interés económico. Esta situación ha constituido el impulso principal del desarrollo de plantas transgénicas resistentes a herbicidas. El uso de estas plantas y la aplicación dirigida de los herbicidas puede incrementar significativamente las cosechas de interés [3]. Aún no se comercializan variedades transgénicas de papa resistentes a herbicidas, por lo que la aplicación de

esta estrategia productiva constituye un reto para nuestro país.

Se han descrito diferentes metodologías para la obtención de papa transgénica mediante la utilización de *Agrobacterium tumefaciens* como vector. La mayoría de estas metodologías emplean como marcador de selección genes que confieren resistencia a antibióticos [4, 5], por lo que hay poca información sobre el comportamiento del cultivo en presencia de herbicidas como agentes de selección [6-10]. Entre los agentes de selección de gran utilidad por su doble función para seleccionar las células transformadas y eliminar las malezas, se describió la fosfinotricina (PPT; glufosinato de amonio), compuesto activo de herbicidas comerciales tales como Basta® o Finale®. La obtención de cultivos comerciales resistentes a fosfinotricina es de gran importancia, porque estos herbicidas son de amplio espectro en el control de malezas, poseen baja toxicidad para el hombre, los animales y el medio ambiente, y por ello, tienen gran aceptación por los

1. Enríquez G, Soto N, Doreste V, Hernández L, Pérez M, Peral R, et al. Transformación genética de variedades comerciales de papa. Resultados de la biotecnología de la papa en Cuba. En: Ana Estévez (ed.). El cultivo de la papa en Cuba (2005):236-61.

2. Paredes E, Pérez E, García R, La O. Programa de manejo sostenible de malezas con el uso racional de herbicidas en el cultivo de la papa (1999).

3. Mulwa MR, Mwanza ML. Review: Biotechnology approaches to developing herbicide tolerance/selectivity in crops. African Journal of Biotechnology (2006); 5(5):396-404.

4. Ooms G, Burrell M, Karp A, Bevan M, Hille J. Genetic transformation in two potato cultivars with T-DNA from disarmed *Agrobacterium*. Theoretical and Applied Genetics (1987); 73:744-50.

agricultores [11]. La enzima que se identificó para la inhibición de la actividad del PPT fue la fosfinotricina acetiltransferasa (PAT), la cual se codifica por el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* [12]. La PPT es también un análogo del glutamato que inhibe irreversiblemente la actividad de la glutamina sintetasa, enzima responsable de la asimilación de amonio y la regulación del metabolismo del nitrógeno en las plantas. La inhibición de la glutamina sintetasa provoca la muerte de los tejidos no transformados, y las plantas mueren por la acumulación de amonio [13].

Los protocolos de transformación de la papa que emplean la fosfinotricina como agente de selección, publicados hasta la fecha, promueven el uso de dos tipos de explantes: hojas [14, 15] y discos de tubérculos [16]. Sin embargo, se ha descrito que los segmentos internodales de tallo con explantes, cuya manipulación *in vitro* es más fácil, constituyen un elevado potencial de regeneración [17, 18] y pueden ser un material atractivo para lograr una elevada eficiencia en el proceso de transformación [19].

Por esa razón, nos propusimos optimizar una metodología de transformación genética de la papa, a partir de segmentos internodales de tallos de la variedad *Désirée*, utilizando la fosfinotricina como agente de selección. Mediante un protocolo de regeneración modificado en nuestro laboratorio [20], se obtuvieron plantas transgénicas resistentes a elevadas concentraciones de fosfinotricina. Estas plantas se caracterizaron por su actividad fosfinotricina acetiltransferasa.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Para este trabajo se utilizaron plantas de papa de la variedad *Désirée* propagadas *in vitro* en un medio de propagación (PP), subcultivadas en un medio fresco cada 4 semanas. El pH del medio se ajustó a 5.7 antes del proceso de autoclaveo, y la esterilización se realizó a una temperatura de 121 °C y una atmósfera de presión. Estas plantas se cultivaron en un fotoperíodo de 16 h luz, con una temperatura de 25 °C.

### Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados se optimizaron en nuestro laboratorio [20]:

- Medio de propagación (PP): sales MS [21], 0.4 mg/L de tiamina, 100 mg/L de mio-inositol, 2 mg/L de pantotenato de calcio, 30 g/L de sacarosa y 6 g/L de fitoagar.

- Medio de inducción de callos (SC): sales MS, 0.4 mg/L de tiamina, 100 mg/L de mio-inositol, 20 g/L de sacarosa, 3.5 mg/L de BAP (bencil aminopurina), 0.01 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) y 6 g/L de fitoagar.

- Medio de inducción de brotes (SB): sales MS, 0.4 mg/L de tiamina, 100 mg/L de mio-inositol, 20 g/L de sacarosa, 3.5 mg/L de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) y 6 g/L de fitoagar.

- Medio de inducción de callos (JC): sales MS, 0.4 mg/L de tiamina, 100 mg/L de mio-inositol, 20 g/L de sacarosa, 4 g/L de manitol, 3.5 mg/L de BAP, 0.2 mg/L de ácido indolacético (AIA), 6 g/L de fitoagar.

## Transformación genética de segmentos internodales de papa

Para los experimentos de transformación genética se empleó la cepa At 2260 de *Agrobacterium tumefaciens* que portaba el plásmido pCAMBIA 3300 (CAMBIA, Australia). Este vector contiene el gen *bar*, que expresa la enzima fosfinotricina acetiltransferasa (PAT). Este gen se encuentra bajo las señales de regulación del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y del terminador 35S (Figura 1). Se incubó la bacteria en un medio líquido Luria-Bertani (LB) [22] con 50 mg/L de rifampicina, 100 mg/L de estreptomina y 30 mg/L de kanamicina; durante 16 h a 28 °C con agitación (100 rpm), hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.7 y 0.9 a 620 nm.

Se tomaron segmentos internodales de tallos, de plantas de 4 a 5 semanas de edad, y solamente se utilizaron los primeros seis segmentos (de 5 a 7 mm) a partir del ápice, según como describen Enríquez y cols. (1997) [20]. Previamente se determinó que la concentración mínima letal de PPT, para la inhibición de la morfogénesis de los explantes de papa es 2 mg/L. Los segmentos internodales se cortaron y se sumergieron en una solución bacteriana diluida 1:20 en las sales MS durante 10 minutos, para la infección. Luego, los explantes infestados se colocaron en el medio SC para el co-cultivo en la oscuridad y con una temperatura de 22 °C durante 48 horas. Estos explantes se lavaron dos veces con agua estéril y una vez con agua más clorofórán (500 mg/L), y se eliminó el exceso de agua poniéndolos sobre un papel de filtro estéril. Se cultivaron a la luz durante 10 a 15 días en un medio SC con 500 mg/L de clorofórán y 2 mg/L de PPT. Después se transfirieron al medio SB con 500 mg/L de clorofórán y 2 mg/L de PPT, hasta la formación de brotes.

Los brotes regenerados de aproximadamente 1 cm de altura se individualizaron y se pusieron a enraizar en un medio PP con 500 mg/L de clorofórán y 2 mg/L de PPT. Las plantas enraizadas fueron propagadas *in vitro* y se pusieron a enraizar en una concentración superior de PPT (5 mg/L).

### Ensayo de clorofenol rojo

Para realizar el ensayo del clorofenol rojo (CR) [23] se usaron fragmentos de hojas *in vitro* de clones de papa resistente a 5 mg/L de PPT. Este indicador de pH se resuspendió en etanol y se añadió al medio JC después de preparado, el cual quedó a una concentración de 50 mg/L y con una coloración rojo

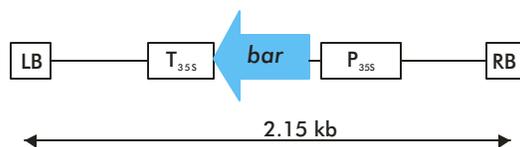


Figura 1. Fragmento del T-DNA del vector pCAMBIA 3300 que porta el gen *bar*. LB: borde izquierdo; RB: borde derecho; T<sub>35S</sub>: terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV); *bar*: gen de la fosfinotricina acetiltransferasa; P<sub>35S</sub>: promotor 35S del CaMV.

5. Stiekema W, Heidekamp F, Louwerse J, Verhoeven H, Dijkhuis P. Introduction of foreign genes into potato cultivars Bintje and Désirée using an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. *Plant Cell Report* (1988); 7:47-50.

6. Hutchinson P, Denny J, Beutler B. Efficacy and Economics of weed control programs in Glyphosate-Resistant potato (*Solanum tuberosum*). *Weed Technol* (2002); 17(4):854-65.

7. D'Halluin K, De Block M, Denecke J, Janssens J, Leemans J, Reynaerts A, et al. The *bar* gene as selectable and screenable marker in plant engineering. *Methods In Enzymology*. ed. Academic Press, NY; 1992.

8. Craig W, Gargano D, Scotti N, Nguyen TT, Lao NT, Kavanagh TA, et al. Direct gene transfer in potato: a comparison of particle bombardment of leaf explants and PEG-mediated transformation of protoplasts. *Plant Cell Rep* (2005); 24(10):603-11.

9. Lutz K, Knapp J, Maliga P. Expression of *bar* in the plastid genome confers herbicide resistance. *Plant Physiol* (2001); 125(4):1585-90.

10. De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gosselé V, et al. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J* (1987); 6(9):2513-8.

11. Bayer Crop Science. Technical information Glufosinate-ammonium (2005); 38.

12. Thompson C, Movva N, Tizard R, Cramer R. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J* (1987); 6:2519-23.

13. Díaz A, Lacuesta M, Muñoz-Rueda A. Comparative effects of phosphinothricin on nitrate and ammonium assimilation and on anaplerotic CO<sub>2</sub> fixation in N-deprived barley plants. *J Plant Physiology* (1996); 149:9-13.

14. De Block M. Genotype-independent leaf disc transformation in potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor Appl Genet* (1988); 76:767-74.

15. Figueira E, Figueiredo L, Monte-Neshich D. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) cv. Mantiqueira using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Reports* (1994); 13(12):666-70.

16. Sawahel W. Ultrasound-mediated stable transformation of potato tuber discs. *Biotechnology Techniques* (1996); 10(11): 821-4.

púrpura. Posteriormente, se incorporó la fosfotricina (5 mg/L) a la esterilización del medio, sin que influyera sobre el color del medio de cultivo. La evaluación se realizó a las 72 horas, y durante ese tiempo las hojas estuvieron sometidas a un fotoperíodo de 16 h luz por 8 h de oscuridad y a una temperatura de 25 °C.

Como control de la coloración del medio, se empleó una placa con el medio JC más CR (sin explantes), y otras dos placas con PPT y sin PPT (con explantes no transformados) como controles de la transgénesis. Para el ensayo se tomaron tres placas por cada clon transformado y diez fragmentos de hojas por cada placa.

### Análisis de plantas resistentes a fosfotricina mediante la reacción en cadena de la polimerasa

El ADN genómico de plantas de papa resistentes a 2 mg/L de PPT y del control no transformado, de 5 a 6 semanas, se purificó a partir de 1 g de tejido de hoja, siguiendo el protocolo de Dellaporta (1983) [24]. Como cebadores se utilizaron los oligonucleótidos complementarios a la región 5' y 3' del gen *bar* [25]. Las secuencias empleadas fueron las siguientes: 5'-CGAGACAAGCACGGTCAACTTC-3' (cebador directo) y 5'-AACCCACGTCATGCCAGTTC-3' (cebador reverso). El producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) esperado debe ser un fragmento de 402 pb correspondiente al gen *bar*. Las reacciones tuvieron un volumen final de 30 µL y contenían la mezcla siguiente: tampón 10X de Taq ADN Pol (Promega); 1.75 mM de MgCl<sub>2</sub>; 25 pmol de cada cebador (directo y reverso); 200 µM de desoxiligonucleótidos (Promega); 1 U de Taq ADN Pol (Promega) y 200 a 600 ng de ADN genómico. Esta reacción se desarrolló en un equipo de PCR (PTC-100TM MJ Research) programado para un ciclo de 5 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 62 °C y 1 min a 72 °C, y al final, una extensión a 72 °C durante 10 min. Los productos de la PCR se analizaron en geles de agarosa tipo I (Sigma) al 0.8%.

### Evaluación de la resistencia *in vitro* de las plantas transgénicas a altas concentraciones de PPT

Para este ensayo se utilizaron diferentes concentraciones de PPT (2, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 mg/L). Se cogieron yemas de plantas *in vitro* propagadas en PP con 2 mg/L de PPT, se colocaron 2 yemas por frasco de cristal y 4 frascos por concentración. Como controles se emplearon plantas no transgénicas de la variedad *Désirée* en cada concentración y plantas transgénicas de cada clon en un medio PP sin selección. Se observó el desarrollo de las hojas y las raíces, y se midió la altura de las plantas.

### Ensayo de resistencia al herbicida comercial Finale® en condiciones de casas verdes

El ensayo de resistencia al herbicida Finale® se realizó con 10 clones transgénicos (8 plantas/clon) y el control no transgénico (20 plantas), las cuales se trasplantaron a macetas en casas verdes. El herbicida comercial Finale® (Bayer CropScience, que contenía 150 g/L de glufosinato de amonio) se usó para as-

perjar estas plantas, a una dosis de 2.5 L/ha (dosis de campo).

## Resultados y discusión

### Influencia de la eficiencia de regeneración sobre la eficiencia de transformación

El empleo de la fosfotricina como agente de selección es una alternativa para la transformación de cultivos de importancia económica como la papa, para la cual se emplea frecuentemente la kanamicina [26-29] en la selección de plantas transgénicas. La utilidad dual de este herbicida permite su aplicación en la selección de los transformantes y también en el control de las malezas, una vez que las plantas transgénicas se cultiven a escala de campo. Sin embargo, existen pocos reportes de obtención de plantas de papa resistentes a fosfotricina [14-16], y ninguno de ellos describe el uso de los segmentos de tallos como explantes. Se ha descrito que los segmentos internodales de tallo constituyen explantes que poseen un elevado potencial de regeneración [17, 18], y pueden ser un material atractivo para lograr elevada eficiencia en el proceso de transformación [1, 14, 19].

Para este estudio se utilizó un protocolo optimizado de regeneración de tallos [20], que constó de dos pasos: inducción de callos en el medio SC y formación de brotes en el medio SB. Este protocolo permitió la formación de callos amarillos y verdes de 10 a 15 días después de la infección con *Agrobacterium tumefaciens*, en el medio SC que contenía 500 mg/L de clorofán y 2 mg/L de PPT (Figura 2A). A los 30 días de la infección, se observó el crecimiento de brotes normales (Figuras 2D y 2E), y se obtuvieron entre 2.9 y 4.3 brotes por cada explante que regeneró en presencia del PPT. Más del 60% de los explantes regeneraron brotes en un medio de selección con PPT (Tabla 1); y en resultados previos se observó que los mayores niveles de regeneración se alcanzaron en los segmentos 2 y 3 de los entrenudos, a partir del ápice de la planta.

La mayoría de los protocolos para la transformación de papa publicados utilizan un sistema de dos pasos con medios de cultivo diferentes: uno para la inducción de callos y otro para la formación de brotes. Este sistema ha resultado eficiente a partir de segmentos de tallos [17, 18, 30, 31] y de hojas [32-34] en diferentes variedades de papa, a pesar de emplearse diferentes combinaciones hormonales en algunos casos. Sin embargo, al utilizarlo en la transformación de dos variedades de papa *Andina* resultó ineficiente, y solo lograron una mejor frecuencia de regeneración en kanamicina (28 y 34%) al utilizar un solo medio de cultivo con Zeatina y AIA [35].

Una combinación de BAP y ANA, similar a la utilizada en el medio SC, también resultó ser efectiva en la inducción de callos a partir de segmentos de hojas en una variedad de papa *Andina* [32], pero se requirió la combinación de ANA, ZR (ribósido de zeatina) y GA<sub>3</sub> para la formación de brotes. Sin embargo, en este trabajo se utilizó solamente GA<sub>3</sub> en la formación de brotes y se obtuvo una frecuencia de regeneración en PPT superior (Tabla 1) a la reportada para la variedad *Andina* (58%) en kanamicina [32]. La adición de GA<sub>3</sub> en el medio SB promovió el desarrollo y la elongación

17. Beaujean A, Sangwan R, Lecardonnel A, Sangwan-Norreel B. *Agrobacterium* mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: An efficient protocol of transformation. *Journal of Experimental Botany* (1998); 49(326): 1589-95.

18. Visser R, Jacobsen E, Hesselting Meinders A, Schans M, Witholt B, Feenstra W. Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. *Plant Molecular Biology* (1989); 12:329-37.

19. Romano A, Raemakers K, Visser R, Mooibroek H. Transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using particle bombardment. *Plant Cell Reports* (2001); 20:198-204.

20. Enríquez G, Fuentes A, Selman Housein G, Téllez P, Soto N, Pérez M, et al. Effect of different culture methods on *in vitro* regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Chieftain. *Biotechnología Aplicada* (1997); 14(3):181-4.

21. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* (1962); 15:473-9.

22. Millar J. *Experiments in Molecular Genetics*. NY; 1972.

23. Kramer C, Dimaio J, Carswell G, Shillito R. Selection of transformed protoplast-derived Zea mays colonies with phosphotricin and a novel assay using the pH indicator chlorophenol red. *Planta* (1993); 190:454-8.

24. Dellaporta S, Wood J, Hicks B. A plant miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep* (1983); 4:19-21.

25. Takumi S, Shimada T. Production of transgenic wheat through particle bombardment of scutellar tissues: frequency is influenced by culture duration. *Plant Physiol* (1996); 49:418-23.

26. Chang M, Culley D, Choi J, Hadwiger LA. *Agrobacterium*-mediated co-transformation of a pea basic chitinase and b-1-3-glucanase in potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Russet Burbank) using a single selectable marker. *Plant Science* (2002); 163:83-9.

27. Gustafson V, Mallubhotla S, Mac Donnell J, Sanyal-Bagchi M, Chakravarty B, Wang-Pruski G. Transformation and Plant Regeneration from Leaf Explants of *Solanum tuberosum* L. cv. 'Shepody'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (2006); 85(3):361-6.

28. Rakosy-Tican L, Aurori C, Thieme R, Capdefien C, Aurori A, Antonova O. The usefulness of reporter gene gfp for optimizing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of potato cultivars. *Biotechnol Agron Soc Environ* (2003); 7(4):188-95.

29. M' Hamdi M, Rouvière C, Rojas-Beltrán J, Du Jardin P. Optimisation de la transformation génétique de la pomme de terre par *Agrobacterium tumefaciens*. Utilisation de la résistance à l'hygromycine comme marqueur sélectif. *Biotechnol Agron Soc Environ* (2003); 3-4:183-8.

de los brotes regenerados (Figuras 2D y 2E), lo cual sucede también en otras variedades de papa [20, 36]. En cambio, Newell y colaboradores (1991) [30], quienes utilizaron una combinación hormonal similar a la utilizada en este trabajo, en segmentos de tallos de las variedades *Désirée* y *Kennebec*, lograron una frecuencia de transformación en kanamicina (13 y 14%) inferior a la reportada en este estudio con PPT (68%) (determinada por el porcentaje de explantes que regeneran brotes en PPT). El medio de regeneración es uno de los requerimientos más importantes para lograr una transformación eficiente, por eso estos resultados coinciden con los de otros autores [15, 37] en que existe una interacción entre el genotipo y el protocolo de regeneración utilizado.

En la mayoría de los segmentos internodales infestados, se observó una reducida formación de callos sobre el medio SC con 2 mg/L de PPT (Figuras 2A y 2C). Al inicio de su desarrollo, en algunos explantes estos callos eran muy pequeños y esféricos (similares a callos embriogénicos) (Figura 2B), y en otros explantes se formaba una masa de callos compacta de color verde (Figura 2C), de donde emergían los brotes. A pesar de esta diferencia, en todos los casos se obtuvieron plantas normales. En la variedad *Russet Burbank* se obtuvieron callos similares y ninguno de los brotes analizados resultó ser una quimera [30]. Algunos autores afirman que las células de papa cultivadas son muy sensibles a la variación somaclonal, y que la disminución de la proliferación de callos puede reducir esa variación [17, 38]. La formación de callos está relacionada con la metilación de importantes genes que inducen la diferenciación celular, lo cual provoca una pérdida progresiva de la totipotencia y la formación de brotes aberrantes [39]. Estudios que comparan genotipos transgénicos y no transgénicos en segmentos de tallos de papa muestran que el proceso de transformación tiene un efecto significativo sobre la formación de callos [40].

En los controles no transformados sin selección se obtuvo el 100% de formación de callos en un extremo o en ambos extremos de los entrenudos, de los cuales emergieron brotes después de 10 días en el medio SB de regeneración, con una eficiencia de regeneración del 100% (se refiere al porcentaje de explantes que regeneran) y con 7.15 brotes por explante (datos no mostrados). A diferencia de esto, en el control negativo no hubo formación de callos ni brotes en los explantes, los cuales tomaron una coloración parda, y su necrosis total ocurrió 30 días después de permanecer en un medio SB con 2 mg/L de PPT.

En total, en este trabajo se obtuvieron 452 brotes regenerados en presencia del herbicida (correspondiente a 3 experimentos) (Tabla 1), y se seleccionó un grupo de 100 brotes (clones) para poner a enraizar en un medio PP con claforán y PPT (2 mg/L). Después de 7 días bajo esa presión de selección, crecieron y enraizaron 68 clones que dieron lugar a plantas normales, con una eficiencia de transformación del 68% (se refiere al porcentaje de plantas regeneradas que enraizaron en 2 mg/L de PPT). Los datos obtenidos muestran la elevada eficiencia de este protocolo de transformación de tallos con selección directa en PPT, con respecto a otros protocolos de transformación de papa que emplean hojas como explantes [14, 33]. Por ejemplo, al

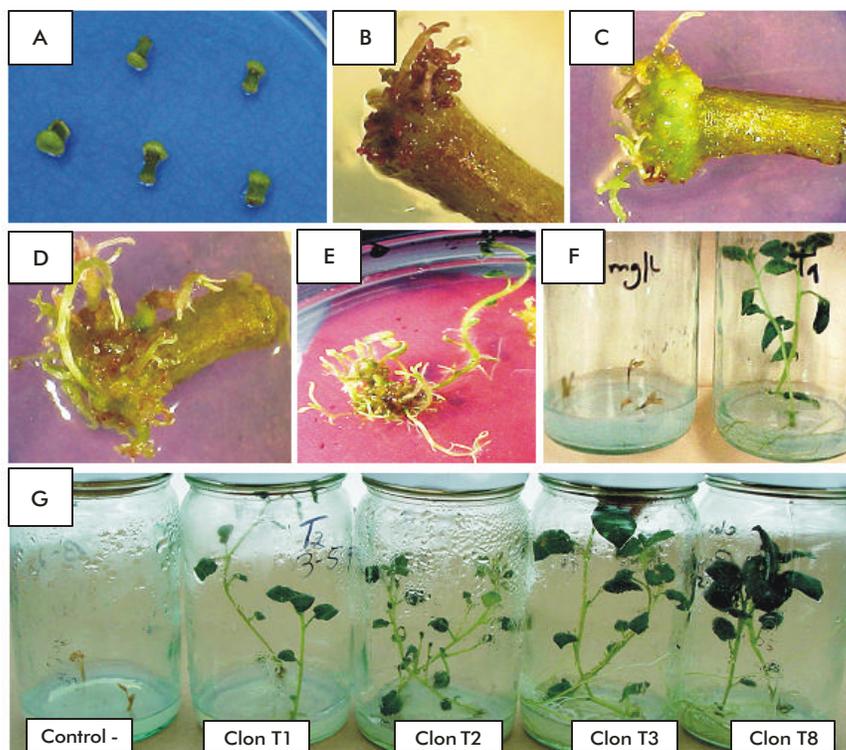


Figura 2. Regeneración *in vitro* de plantas transgénicas de papa: crecimiento *in vitro* y selección en PPT.

A. Formación de callos en segmentos internodales de tallos después de 15 días en un medio SC con claforán y 2 mg/L de PPT.  
B, C, D y E. Formación de brotes en un medio SB con 500 mg/L de claforán y 2 mg/L de PPT (B y C: 20 días y D y E: 30 y 40 días).  
F. Planta no transgénica enraizada en un medio PP con 2 mg/L de PPT (izquierda) y planta transgénica enraizada en un medio PP sin selección (derecha).  
G. Plantas transgénicas enraizadas en un medio PP con 100 mg/L de PPT; a la izquierda, el control no transgénico.

transformar las variedades *Bintje* y *Désirée* (regeneración en tres pasos), De Block (1998) [14] obtuvo una eficiencia de transformación del 30%, en un medio de inducción de callos con 5 y 10 mg/L de PPT (esta eficiencia se midió por la formación de callos en presencia del compuesto activo). Cuando Barrell y cols. (2002) [33] seleccionaron hojas directamente en 10 mg/L de PPT, tampoco obtuvieron brotes. Estos autores [14, 33] coinciden en que la fosfotricina es menos eficiente que la kanamicina como marcador de selección en la papa (se refieren a la regeneración de brotes en PPT), lo cual difiere con los resultados del presente estudio con la variedad *Désirée*.

De las 68 plantas o clones enraizados en 2 mg/L de PPT, 15 clones (22%) enraizaron en 5 mg/L de PPT. Hubo cuatro de estos clones (resistentes a 5 mg/L) que

30. Newell C, Rozman R, Hinchey M, Lawson E, Haley L, Sanders P, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Solanum tuberosum* L. cv. Russet Burbank. Plant Cell Reports (1991); 10(1): 30-34.

31. Ducreux L, Morris W, Taylor M, Millam S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Solanum phurej*. Plant Cell Report (2005); 24:10-4.

32. Banerjee A, Prat S, Hannapel A. Efficient production of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L. ssp. *andigena*) plant via *Agrobacterium* mediated transformation. Plant Science (2006); 170:1732-8.

33. Barrell P, Shang Youngjin, Cooper P, Conner A. Alternative selectable markers for potato transformation using minimal T-DNA vectors. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (2002); 70:61-8.

Tabla 1. Frecuencia de regeneración de brotes a partir de segmentos de tallos seleccionados en 2 mg/L de PPT

Experimentos	Número de explantes	Número de explantes con callos (%)	Número de explantes con brotes (%)	Total de brotes regenerados en PPT	Número de brotes/explantes con brotes
I	60	60 (100)	50 (83.3)	145	2.9
II	60	60 (100)	36 (60)	156	4.3
III	50	40 (80)	39 (78)	151	3.8

crecieron y desarrollaron raíces más rápido que el resto, los cuales se propagaron *in vitro* para realizar un ensayo de sensibilidad a concentraciones superiores de PPT.

### Influencia del marcador de selección PPT sobre la eficiencia de transformación

La aplicación del ensayo visual del CR permitió hacer una identificación rápida de los tejidos transformados que expresan el gen *bar*. Este ensayo se basó en cambios de coloración que ocurren en el medio de cultivo. Cuando se preparó el medio JC con CR, se ajustó el pH a 6 y se observó una coloración roja, como se muestra en la figura 3A. Al disminuir el pH, la coloración roja del medio con PPT cambió a un color amarillo alrededor de los segmentos de hojas de plantas transformadas. Todos los clones evaluados fueron positivos al ensayo. Esta coloración amarilla fue progresando hasta cubrir todo el medio, como se muestra en la figura 3B. La acidificación del medio es un indicador de que las células están fisiológicamente activas [41], y se evidenció la expresión de la enzima PAT, la cual detoxificó el PPT presente en el medio. Este cambio de coloración también ocurrió en el control positivo (planta no transgénica) en el medio sin PPT (Figura 3D). Además, se observó que la coloración amarilla alrededor de los explantes transformados fue superior a la observada alrededor del control positivo. Esto pudiera deberse al efecto estimulante que ejerce el PPT sobre el metabolismo de las células que portan el gen *bar*. No hay datos experimentales que fundamenten este fenómeno. Sin embargo, varios autores han reportado el efecto positivo que ejercen algunos compuestos con propiedades herbicidas (a concentraciones subletales) sobre la morfogénesis de ciertos tejidos vegetales en diferentes cultivos [42, 43]. Por ejemplo, se observó que la fosfinitricina a concentraciones entre 0.5 mg/L y 1 mg/L estimula la producción de embriones somáticos del cultivo de la uva [44]. A este herbicida le fue atribuido un efecto similar a las citoquininas en el cultivo de tejidos del arroz [45, 46], y además estimuló la diferenciación de brotes y la subsiguiente regeneración de plantas en *Antirrhinum majus* L. [47].

Kramer y colaboradores (1993) señalaron que es importante no demorar más de 72 horas en la evaluación de este ensayo, para evitar así la toxicidad del CR sobre los callos. Es por eso que lo consideran un método no destructivo [23, 48]. Este tipo de ensayo permitió analizar en poco tiempo un número elevado de plantas transgénicas de maíz que portaban el gen *bar* [48].

Las hojas que no resistieron los niveles de PPT presentes en el medio, aumentaron los valores de pH por encima de 6 (producto de la acumulación de amonio), lo que reforzó el color del medio de cultivo de rojo a rojo-violeta (Figura 3C). En este caso solo estuvieron las hojas provenientes de plantas no transformadas, que constituyeron el control negativo. La naturaleza no transgénica del control negativo se confirmó, además, por PCR, como se muestra en la figura 4.

Paralelamente, se analizaron por PCR las 68 plantas enraizadas en 2 mg/L de PPT, y el 98% de ellas resultó positivo mediante la amplificación de una banda de aproximadamente 402 pb, correspondiente al gen *bar*, lo cual demostró la presencia de este gen en las plantas de papa transformadas (Figura 4). La mayoría de los clones enraizados en 2 mg/L de PPT fueron positivos

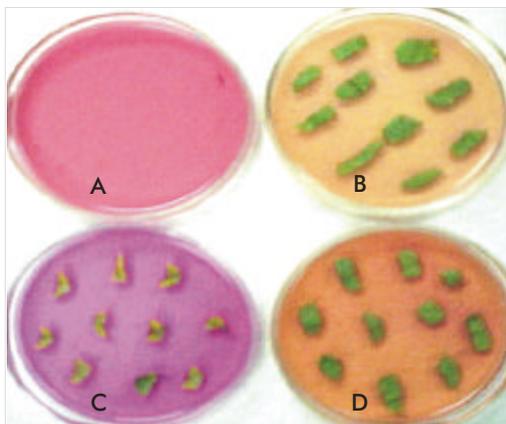


Figura 3. Ensayo biológico del Clorofenol Rojo (CR).

A. Control inicial de la coloración del medio JC con CR.  
B. Explantes de planta transgénica en selección con PPT (5 mg/L).  
C. Explantes de planta no transgénica en selección con PPT (5 mg/L), usados como control negativo.  
D. Explantes de planta no transgénica usados como control positivo.

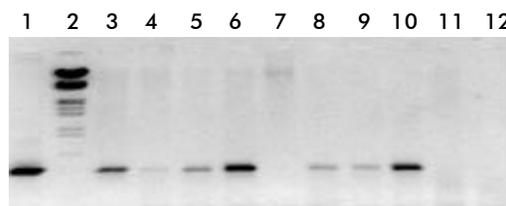


Figura 4. Productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico de plantas de papa *Désirée*. Amplificación de la banda de 402 pb correspondiente al gen *bar* con los oligonucleótidos específicos. Visualización en un gel de agarosa al 0.8%.

Línea 1. Corresponde al plásmido pCAMBIA 3300 usado como control positivo.  
Línea 2. Corresponde al marcador de peso molecular  $\lambda$ EcoRIHindIII.  
Líneas 3 a 10. Corresponden al ADN extraído de plantas enraizadas en un medio PP con 2 mg/L de PPT.  
Línea 11. Corresponde al ADN extraído de una planta no transformada, usada como control negativo.  
Línea 12. Corresponde a la mezcla de PCR sin ADN.

por PCR, y 15 de ellos enraizaron en una concentración de 5 mg/L de PPT. De los clones resistentes a 5 mg/L de PPT, se seleccionaron los 4 clones que crecieron más rápido en esa concentración, para realizar un ensayo de sensibilidad a altas concentraciones de PPT en condiciones *in vitro*.

Como resultado, las 32 plantas transgénicas evaluadas (8 plantas/clon) desarrollaron raíces en todas las concentraciones de PPT probadas, similar al control transgénico sin selección (Figura 2F); aunque el crecimiento de estas raíces fue más abundante en los clones T3 y T8 (Figura 2G).

Después de 30 días en el medio PP con selección, tres de los clones evaluados tuvieron un crecimiento normal hasta la concentración de 500 mg/L; con excepción del clon T1, el cual no resistió la máxima concentración probada (Figura 5). El crecimiento normal de estos clones se evidenció en el color verde oscuro de sus hojas (Figura 2G), las cuales eran de

34. Wenzler H, Mignery G, May G, Park W. A rapid and efficient transformation method for the production of large numbers of transgenic potato plants. *Plant Science* (1989); 63:79-85.

35. Trujillo C, Rodríguez-Arango E, Jaramillo S, Hoyos R, Orduz S, Arango R. One step transformation of two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. subsp *andigena*). *Plant Cell Reports* (2001); 20: 637-41.

36. JayaSree T, Pavan U, Ramesh M, Rao A, Jagan Mohan Reddy K, Sadanandam A. Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (2001); 64:13-7.

37. Hulme J, Higgins E, Shields R. An efficient genotype independent method for regeneration of potato plants from leaf tissue. *Plant cell tissue and organ culture* (1992); 31: 161-7.

tamaño y forma similar a la réplica transgénica en un medio sin selección (Figura 5); así como en la altura alcanzada por las plantas. Esto demuestra la resistencia de las plantas transgénicas a la PPT y confirma el evento de transformación. La mayoría de estos clones resistentes alcanzó una altura superior al control réplica sin selección, hasta la concentración de 100 mg/L de PPT (Figura 5).

La mayoría de estos clones resistentes alcanzó una altura superior al control réplica sin selección, hasta la concentración de 100 mg/L de PPT (Figura 5). La elevada resistencia a PPT (hasta 500 mg/L) observada en el enraizamiento de estos clones, es superior a la reportada por otros autores en clones transgénicos de la variedad de papa *Mantiqueira* (10 mg/L) [15]. Y es superior también a la resistencia a fosfotricina reportada por De Block (1988) [14], en hojas de plantas transgénicas de la variedad Désirée que formaron callos en 50 mg/L de PPT.

### Resistencia de las plantas transgénicas al herbicida comercial Finale® en condiciones de casas verdes

Finalmente se transfirieron a casas verdes 80 plantas transgénicas (8 plantas/clon) que expresan el gen *bar* bajo el promotor 35S y 20 plantas del control no transgénico. Estas fueron asperjadas con Finale® a una concentración de 2.5 L/ha, equivalente a la dosis que se utiliza en campo para el control de malezas. Todas las plantas transgénicas fueron resistentes al herbicida (Figura 6). Las plantas no transgénicas mostraron síntomas de clorosis a los 2 o 3 días, y murieron 7 días después de la aplicación, a diferencia de las plantas transgénicas que mantuvieron siempre su coloración verde (Figura 6). Resultados similares se observaron en plantas transgénicas de la variedad *Mantiqueira* que portan el gen *bar* [15], obtenidas a partir de hojas. Aunque estas plantas mostraron síntomas de clorosis en los primeros días de la aplicación, recuperaron su coloración verde una semana después.

### Conclusiones

Los resultados de este trabajo han permitido la optimización de una metodología sencilla y reproducible para la transformación genética de segmentos de tallos de papa de la variedad *Désirée*. Se logró una frecuencia de regeneración de brotes que alcanzó el 83.3% en presencia de 2 mg/L de PPT, y una eficiencia de transformación del 68%. Esta metodología con PPT tiene la ventaja de que la regeneración ocurre en poco tiempo (alrededor de 6 semanas), lo que favorece el desarrollo de plantas normales. Se evidenció una alta correlación entre los clones seleccionados en 5 mg/L de PPT y positivos al ensayo de CR, con los resultados de la PCR. Además, hubo una elevada resistencia a la PPT (hasta 500 mg/L) sin que se afectara el crecimiento y desarro-

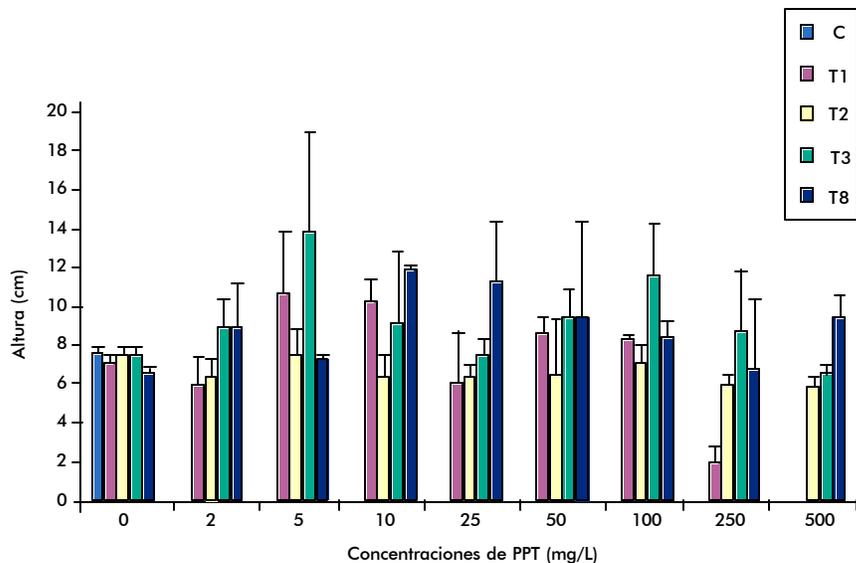


Figura 5. Altura alcanzada por las plantas de papa en un medio de propagación (PP) con diferentes concentraciones de PPT. Las columnas representan los clones transgénicos evaluados (T1, T2, T3 y T8) y el control no transgénico (C). Por cada clon se evaluaron 8 plantas.



Figura 6. Plantas transgénicas (izquierda) y no transgénicas (derecha) en casas verdes, una semana después de haber sido asperjadas con una dosis de 2.5 L/ha del herbicida Finale®.

llo *in vitro* de esas plantas. En la literatura consultada no se reportan resultados de estudios con cultivos transgénicos que portan el gen *bar* y que fueron transformados mediante *Agrobacterium tumefaciens* que muestren estos niveles de resistencia *in vitro* a la PPT. La resistencia al herbicida se demostró también en casas verdes, donde las plantas transgénicas se asperjaron con 2.5 L/ha de Finale® y mantuvieron su coloración verde. Todos estos resultados avalan las ventajas de utilizar segmentos de tallos de papa para obtener plantas resistentes a altas concentraciones del herbicida. Es importante señalar que en estos clones de papa resistentes al herbicida Finale® no se observaron aberraciones fenotípicas asociadas con el proceso de transformación.

38. Sheerman S, Bevan M. A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors. *Plant Cell Reports* (1998); 7:13-6.

39. Lambe P, Schie H, Mutambel H, Fouche J, Deltour R, Foidart J. DNA methylation as a key process in regulation of organogenic totipotency and plant neoplastic progression? *In Vitro Cell Dev Biol* (1997); 33:155-62.

40. Turhan H. Callus induction and growth in transgenic potato genotypes. *African Journal of Biotechnology* (2004); 3(8):375-8.

41. Ryu DD, Lee SO, Romani RJ. Determination of growth rate for plant cell cultures: comparative studies. *Biotech Bioeng* (1990); 35:305-11.

42. Jiménez V. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* (2005); 47:91-110.

43. Rakoczy-Tojanowska M. The effects of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits. *Cellular & Molecular Biology Letters* (2002); 7:1111-20.

44. Hébert-Soulé D, Kikkert J, Reisch B. Phosphinothricin stimulates somatic embryogenesis in grape (*Vitis sp.* L.). *Plant Cell Reports* (1995); 14:380-4.
45. Toldi O, Tóth S, Oreifig A, González A, Kiss E, Jenes B. Phosphinothricin: a herbicide or a synthetic cytokinin? *Journal of Experimental Botany (Supplement)* (1999); 50:56.
46. Toldi O, Tóth S, Oreifig A, Kiss E, Jenes B. Production of phosphinothricin-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) through the application of phosphinothricin as growth regulator. *Plant Cell Reports* (2000); 19:1226-31.
47. Hoshino Y, Mii M. Bialaphos stimulates shoot regeneration from hairy roots snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Report* (1998); 17:256-61.
48. Wright M, Launis K, Bowman C, Hill M, Dimairo J, Kramer C, et al. A rapid visual method to identify transformed plants. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* (1996); 32:11-13.

---

Recibido en abril de 2007. Aprobado en octubre de 2007.