

Transformación genética de papa con el gen *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* para el posible control de la polilla guatemalteca

PERSPECTIVAS EN NUTRICIÓN HUMANA
ISSN 0124-4108 Separata. Octubre de 2004
Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia págs. 139-143

Ana Milena Valderrama F.

Unidad de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB

Esperanza Rodríguez

Unidad de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB

Rafael Arango

Unidad de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB
Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias.
E-mail: rarango@cib.org.co

A nivel mundial existe una mayor demanda en la producción de alimentos como resultado de una creciente población y cambios climáticos que exacerban las necesidades alimentarias. Por estas razones son necesarios grandes avances para suplir estas necesidades; algunos de estos avances pueden derivarse de tecnologías que involucren organismos modificados genéticamente (OMG) (NAS, 2000). El uso de plantas MG ofrece potenciales beneficios para el mejoramiento de características agrono-

micas, la calidad de los alimentos y por ende, la nutrición y salud humana. La tecnología de cultivos MG ha sido usada para producir variedades de plantas con resistencia a plagas y enfermedades, reducción en la maduración de frutas y vegetales, tolerancia a estrés abiótico, incremento de niveles nutricionales de los alimentos, producción de vacunas y compuestos farmacéuticos.

La agricultura moderna ha permitido aumentar dramáticamente la producción de cultivos tradicionales,

pero también ha introducido el uso a gran escala de pesticidas y fertilizantes que son costosos y que pueden afectar la salud humana y el ecosistema. La principal tendencia actual a nivel agropecuario es a encontrar tecnologías que permitan aumentar la producción mundial de alimentos, sin deteriorar el medioambiente (6). Una forma de lograr esto y que ha sido utilizada con éxito durante muchos años es el llamado mejoramiento con técnicas convencionales el cual involucra la selección de ciertas plantas que expresan las características deseadas. Los mejoradores utilizan la reproducción asexual y sexual y otras técnicas (rescate de embriones, mutagénesis química o por irradiación) para el desarrollo de nuevas variedades de plantas. Por otra parte, el mejoramiento no convencional se refiere generalmente al desarrollo de plantas modificadas genéticamente (MG) mediante la inserción de un determinado material usando la tecnología de ADN recombinante. Específicamente, se realiza la introducción de un sólo gen y la modificación de una característica particular. Esta tecnología permite el desarrollo de nuevas variedades de plantas en un menor tiempo al de la forma convencional, y también permite la introducción de material genético de otras especies, familias o incluso reinos, que no es posible mediante el mejoramiento convencional (2).

Aún cuando la tecnología de MG no está disponible para gran variedad de cultivos, comercialmente se pro-

ducen plantas MG que confieren resistencia al ataque de insectos y tolerancia a herbicidas específicos (4). En el año 2003 el área global de cultivos transgénicos fue de 67.7 millones de hectáreas, siendo la soya transgénica la que lidera el área global con 41.4 millones de hectáreas, le siguen en orden de importancia los cultivos de maíz, canola y algodón. Los países con mayor área en la siembra de cultivos transgénicos son Estados Unidos, Argentina, Canadá, Brasil, China y Sudáfrica (5). En Colombia se expandió el área de algodón transgénico a 5000 hectáreas (para el Valle, Huila y Tolima) y se está gestionando la aprobación para el cultivo de maíz transgénico con resistencia a insectos. Además, entre los cultivos transgénicos de importancia para la alimentación que se están probando en el campo en Colombia, están el arroz, la caña y la yuca. Los dos primeros con genes de resistencia a virus y el último, con un gen de resistencia a insectos (7, 3, 1).

Los programas de investigación nacional para el mejoramiento genético de plantas son prioritarios y sólo instancias nacionales pueden direccionar el desarrollo y uso de plantas MG. La Corporación para Investigaciones Biológicas –CIB– ha venido trabajando en este campo para el desarrollo de plantas GM de papa con posible resistencia a la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) y de plátano y banano con posible resistencia a la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*),

como una herramienta usada para el control de esta plaga y enfermedad.

Una de las principales plagas a nivel mundial, que afecta la papa en el campo y el almacenamiento es la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* (Povolny). Dentro de las alternativas de control se encuentra el uso de proteínas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) con actividad tóxica para insectos lepidópteros. Como base fundamental para el desarrollo de este proyecto la CIB había desarrollado para variedades de papa colombiana, mediante *Agrobacterium*, los sistemas de regeneración y de transformación genética. De igual forma mediante un acuerdo de transferencia de materiales con la Universidad de Ottawa se obtuvieron los genes *cry1Ab* y *cry1Ac* de *Bt*, modificados para la expresión en plantas. Todos estos elementos dieron base para el desarrollo de este proyecto que busca obtener líneas de papa colombiana transformadas con genes *Bt* para un posible control de la polilla guatemalteca *T. solanivora*.

Las construcciones que contenían los genes *cry* fueron recibidas en vectores que no son útiles para la transformación de plantas; por lo tanto, fue necesario desarrollar una primera etapa de construcción de vectores apropiados para la transformación de plantas mediante *Agrobacterium* como los vectores pCAMBIA. Usando técnicas básicas de biología molecular para la clonación de fragmentos en *Es-*

cherichia coli se desarrollaron seis construcciones que contenían los genes *cry1Ab* y *cry1Ac* en los vectores pCAMBIA 1302 y 1305.1, bajo la expresión de los promotores del gen de la ubiquitina y del virus del mosaico del coliflor (CaMV35S). Adicionalmente a las seis construcciones realizadas, se recibió el vector pRD400 el cual contenía el gen *cry1Ac* bajo la expresión del promotor doble CaMV35S y del activador traduccional AMV. Todas las construcciones tienen la secuencia terminadora de la nopalina sintasa. Después de la clonación de las construcciones en *E. coli*, éstas fueron transferidas a la cepa de *Agrobacterium* LBA 4404. Se escogieron las cepas de *Agrobacterium* 28 que contenía el vector pCAMBIA 1305.1 Ubi-*cry1Ac*-noster y la cepa *Agrobacterium* 40 con el vector pRD400 CaMV35S-2X-AMV-*cry1Ac*-noster para la transformación de hojas de papa.

Se transformaron hojas de papa *Solanum tuberosum* L. subs. *andigena* de las variedades Diacol Capiro, Parda Pastusa, ICA-puracé e ICA-Pandezúcar. Los porcentajes de regeneración fueron similares a los obtenidos por Trujillo y colaboradores (DC 28% y PP 34%) y adicionalmente se comprobó la capacidad de transformar las variedades de papa Puracé y Pandezúcar, usando la misma metodología. El número de explantes regenerados y el número de líneas estables en el medio de selección difieren considerablemente de acuerdo con el antibiótico de selección y la varie-

dad empleada. Se observó una reducción entre el 60 y el 80% de las líneas estables cuando se utilizó el antibiótico higromicina B como agente de selección. En contraste, cuando se utilizó kanamicina las líneas estables se redujeron entre 24 y 45%.

La integración del gen en el genoma de la planta se confirmó mediante la amplificación por PCR de un fragmento del gen *cry1Ac* usando ADN total como blanco. El 100% de las líneas mantenidas en el medio con higromicina B amplificaron el fragmento, mientras que sólo el 88.6% de las líneas mantenidas en el medio con kanamicina fueron positivas para el PCR. Usando como sonda el fragmento del gen *cry1Ac* se verificó mediante southern blot la especificidad de la banda amplificada por PCR. Las plantas no transformadas no amplificaron el fragmento de PCR, ni mostraron señal positiva en la hibridización.

La expresión de la proteína Cry1Ac se demostró usando las técnicas de RT-PCR y DAS-ELISA. Se evidenció la amplificación de un fragmento de 800 pares de bases por RT-PCR, correspondiente solamente a la presencia del transcrito del gen *cry* en dos de las líneas transforma-

das. Utilizando la prueba DAS-ELISA se logró comprobar la expresión del gen *cry1Ac* usando los promotores CamV35S-2X y ubiquitina en 44 de las líneas evaluadas. Se destaca la expresión del gen *cry1Ac* en papa usando el promotor de la ubiquitina del maíz, promotor usado principalmente para la transformación de especies monocotiledóneas. Se detectaron diferentes niveles de expresión de la proteína Cry1Ac y se tienen 10 líneas que expresan los mayores niveles (3 DC, 3 PP y 4 Paz).

Aunque se ha demostrado la expresión de la proteína Cry1Ac en las hojas de papa, las pruebas finales que determinarán el posible uso de plantas transgénicas de papa para el manejo integrado de las polillas de la papa, serán la evaluación de la expresión de la proteína en el tubérculo y los bioensayos con tubérculos transgénicos. Este estudio abre expectativas en la búsqueda de nuevas estrategias de control para la polilla de la papa con el uso de variedades resistentes mediante la transformación genética con genes *Bt*. Adicionalmente se consolida como uno de los trabajos pioneros en Colombia para el mejoramiento no convencional de especies agrícolas.

Referencias bibliográficas

1. Chavarriaga P. 2004. Conferencia: "Estudios de casos de plantas transgénicas". II Congreso Colombiano de Biotecnología y Primer Simposio Internacional de Bionegocios. Bogotá.
2. Council of Royal Society, 2002. Genetically modified plants for food use and human health-an update. The Royal Society. <http://www.royalsoc.ac.uk>
3. Gómez L., Rangel M.P., Victoria J., Angel F. 2004. Evaluación de la resistencia al virus de la hoja amarilla en plantas de caña de azúcar transformadas genéticamente. Memorias II Congreso Colombiano de Biotecnología y Primer Simposio Internacional de Bionegocios. Bogotá, p-97.
4. James, C. 2000. Preview: Global Status of Commercialized Transgenic Crops. ISAAA Briefs No. 21. ISAAA: Ithaca, NY.
5. James, C. 2003. Preview: Global Status of Commercialized Transgenic Crops:2003. ISAAA Briefs No. 30. ISAAA: Ithaca, NY.
6. National Academic of Sciences (NAS). 2000. Transgenic Plants and World Agriculture. National Academy Press. Washington, D.C. p-46.
7. Pineda R., Fory L., González E., Mina A., Flórez J., Arcia K., Agrono T., Ordóñez C., Duque M. y Lentini Z. 2004. Análisis de flujo de genes de arroz transgénico y no transgénico hacia el arroz maleza bajo condiciones de campo e invernadero. Memorias II Congreso Colombiano de Biotecnología y Primer Simposio Internacional de Bionegocios. Bogotá, p-102.
8. Trujillo C., Rodríguez-Arango, E. Jaramillo, S., Hoyos, R., Orduz S. and Arango R. 2001. One-step transformation of two andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.). Plant Cell Reports 20:637-641.