

Clones de papa transformados con la toxina de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) contra la polilla de la papa, *Phthorimaea operculella* (Zeller). I. Transformación de clones de papa y verificación de la presencia del gen cryIA(b)

Delicia Verónica Cañedo ¹

Fausto Cisneros ²

RESUMEN

CAÑEDO DV, CISNEROS F. 2004. Clones de papa transformados con la toxina de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) contra la polilla de la papa, *Phthorimaea operculella* (Zeller). I. Transformación de clones de papa y verificación de la presencia del gen cryIA(b). *Rev. per. Ent.* 44.- La transformación de clones diploides de papa se realizó usando el sistema de transferencia de genes por *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando el gen cryIA(b) producido por *Bacillus thuringiensis* (Bt), con dos construcciones de *Agrobacterium*: 3290 y 3370 (con uno y dos promotores, respectivamente), dando como resultado ocho líneas de KW PTM29, 71 de MI 4910 y 77 del cv. Desirée. La presencia del gen fue verificada mediante pruebas bioquímicas de Southern blot, determinándose que hubo 1-4 eventos independientes de inserción del gen por cada genoma haploide (1-4 copias).

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, clones de papa, *Phthorimaea operculella*, polilla de la papa

SUMMARY

CAÑEDO DV, CISNEROS F. 2004. Potato clones transformed with *Bacillus thuringiensis* (Berliner) toxin against the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller). I. Transformation of potato clones and verification of the presence of the gene cryIA(b). *Rev. per. Ent.* 44 - Diploid clones of potato were subjected to *Agrobacterium*-mediated transformation using the gene cryIA(b) produced by *Bacillus thuringiensis* (Bt). Two *Agrobacterium* constructions were used: 3290 and 3370 (with one and two promoters, respectively), giving eight lines of KW PTM29, 71 of MI 4910, and 77 of cv. Desirée. Presence of the Bt gene was determined by Southern blot biochemical analysis. The number of Bt genes ranged from one to four copies per haploid genome.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Phthorimaea operculella*, potato clones, potato tuber moth.

Introducción

La polilla de la papa, *Phthorimaea operculella* (Zeller), es una de las principales plagas de la papa a nivel mundial por los daños que causa en campo y almacén, pudiendo arrasar con el 100 % de la producción si no se ejerce ninguna medida de control. El uso de la biotecnología por medio de la ingeniería genética introduce genes exóticos que confieren una característica deseada, en este caso, resistencia a la polilla. Debido a que para obtener actividad insecticida se requiere de la expresión de una sola proteína de d-endotoxina, los genes de la toxina de *Bacillus thuringiensis* (Bt) se convirtieron en los candidatos ideales para transformar plantas. El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante ha permitido manipular el

ADN de la bacteria, codificar la producción del cristal proteico de Bt, y transferirlo a otros organismos, especialmente a plantas, dando lugar a las plantas transgénicas productoras de la toxina para el control de insectos. La polilla de la papa es susceptible a las toxinas Cry del Bt (EBORA *et al.* 1994, JANSSENS *et al.*, 1995, CAÑEDO *et al.* 1999). Los objetivos de la presente investigación fueron 1) transformar clones diploides de papa con el gen Bt cryIA(b); y 2) verificar la presencia del gen mediante pruebas bioquímicas.

Material y métodos

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. Su desarrollo comprendió la transformación de los clones de papa con el gen Bt cryIA(b) y la verificación de la presencia del gen Bt en los clones de papa mediante pruebas bioquímicas de Southern blot.

Escuela de Postgrado, Universidad Nacional Agraria La Molina, Apartado 456, Lima-100, Perú.
Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú.

TABLA 1.- Denominación, caracterización, procedencia y especies parentales involucradas de los clones diploides de papa seleccionados para su transformación transgénica.

| Clon | Código CJP | Procedencia | Especies involucradas | Características |
|------------|--------------------|-------------------------------|---|---|
| MI 4910 | CIP 590004.10 | (M14.47xBW.11) | <i>Solanum andigena</i> , <i>S. phureja</i> , <i>S. stenotomum</i> , <i>S. sparsipilum</i> | MR* a <i>Pseudomonas solanacearum</i> |
| KWPTM-24 | CIP 590011.24 | ([2 x TS-2]5 X PTM 1.33)24 | <i>S. andigena</i> , <i>S. chacoense</i> , <i>S. phureja</i> , <i>S. sparsipilum</i> , <i>S. tuberosum</i> | MR* a <i>Phthorimaen operculella</i> |
| KWPTM29 | 590011.29 | ([2 x TS-2]5 X PTM 1.33)29 | <i>S. andigena</i> , <i>S. chacoense</i> , <i>S. phureja</i> , <i>S. sparsipilum</i> , <i>S. tuberosum</i> | Resistente a <i>Ph. operculella</i> |
| PI123050.2 | CIP 760147.7 | Silvestre | <i>S. sparsipilum</i> | Resistente a <i>Ph. operculella</i> , <i>Ps. solanacearum</i> , <i>Globodera pallida</i> , <i>Grostochiensis</i> , <i>Meloidogyne incognita</i> . |
| 2x(V-2)7 | CIP 590001.7 | (V-2 x IVP 35) | <i>S. tuberosum</i> , <i>S. andigena</i> | Inmune PVY |
| 2x(V-3)6 | CIP 590002.6 | (V-3 x IVP 35) | <i>S. tuberosum</i> , <i>S. stoloniferum</i> | Inmune PVX |
| Desirée | Variedad comercial | Holandesa | <i>S. tuberosum</i> | Susceptible a <i>Ph. operculella</i> |

MR* = Moderadamente resistente.

Material

1. Seis clones diploides de papa provenientes del CIP: MI4910, KWPTM 24, KWPTM 29, PI123050.2, 2x(V₂), 2x(V₃), seleccionados por su resistencia a la polilla de la papa y a los virus PVX y PVY y la variedad Desirée de origen holandés y susceptible a la polilla de la papa (Tabla 1).

2. El gen truncado cry1A(b) de *Bacillus thuringiensis* subsp *berliner* 1715 (HOFTE *et al.* 1986) obtenido del Instituto Plant Genetic System (PGS), de Gent, Bélgica, que en ensayos de toxicidad ha demostrado ser altamente activo contra la polilla de la papa (JANSENS *et al.* 1995).

Métodos

Transformación de clones: La planta de papa responde a muchas técnicas de cultivo de tejidos, pero la habilidad de regeneración depende mucho de la variedad. Las formulaciones de los medios de cultivo (comercialmente disponibles) mayormente utilizadas están basadas en MURASHIGE & SKCOG (1962). Los requerimientos nutricionales de los medios de cultivo están en función de la ploidia de las variedades de papa (KARP *et al.* 1987). Por ello fue necesario identificar los medios de regeneración adecuados y las concentraciones de antibióticos que cada clon puede tolerar a fin que se pueda realizar la transformación.

Medios de regeneración: Se realizó esta prueba para determinar el medio de cultivo en el cual los clones de papa se regeneraron en menor tiempo y con mejores características. Se utilizó

tres medios de regeneración: PGS (modificado de DE BLOCK 1988), CD3Z (modificado de HOEKEMA *et al.* 1989) y el método de CARDI *et al.* (1993). Veinticinco explantes (fragmentos) de hojas se colocaron sobre los medios de regeneración, a razón de cinco por placa, cambiándolos a medio fresco semanalmente. La evaluación se realizó después de 15 d de iniciado el ensayo, registrando el número de explantes con callos, el número de callos, y el número de hojas con brotes para obtener el porcentaje de regeneración.

Concentraciones de antibióticos: En el proceso de transformación se utilizaron los antibióticos cefotaxima y kanamicina, el primero con la finalidad de eliminar todo exceso de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y el segundo como marcador del gen cry1A(b). Esta prueba tuvo la finalidad de determinar las concentraciones de antibióticos a las cuales los clones en estudio se regeneran sin dificultad. Las concentraciones utilizadas fueron 25, 50, 75 y 100 mg/l para la cefotaxima, y 12,5, 25, 37,5 y 50 mg/l para la kanamicina. Se utilizó 10 explantes de follaje por cada tratamiento, distribuidos en dos placas.

Co-cultivo: Se utilizó dos construcciones de *A. tumefaciens* para la transformación de las plantas, la 3290 (con un solo promotor pTFD16) y la 3370 (con doble promotor pTRAVI), conteniendo el gen truncado cry1A(b). Se sembró dos colonias de *A. tumefaciens* en 5 ml de medio minimal glucosa, dejándose durante toda la noche a 28 °C. Se cortó los explantes de hoja o entrenudo de papa y se colocaron 20 explantes por placa petri descartable, conteniendo 10 ml del medio 302 (MS + 2 % de sucrosa) a una concentración del *Agrobacterium* de 5 x 10⁷ cél/ml, mante-

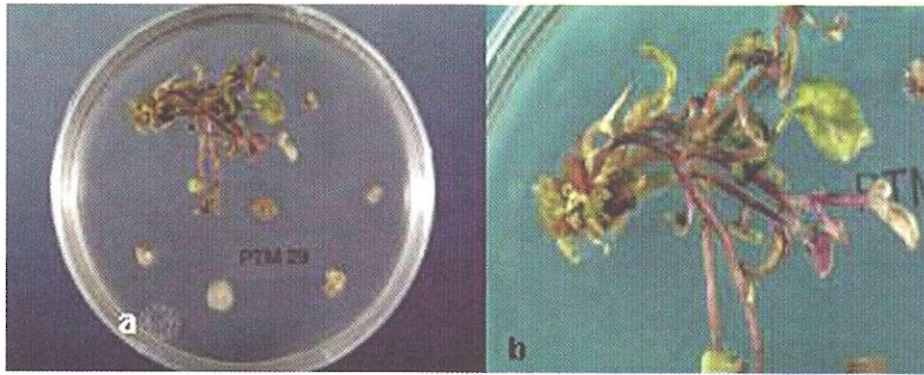


FIGURA 1.- Regeneración de brotes del clon de papa KW PTM 29 en medio conteniendo kanamicina; b) un brote magnificado.

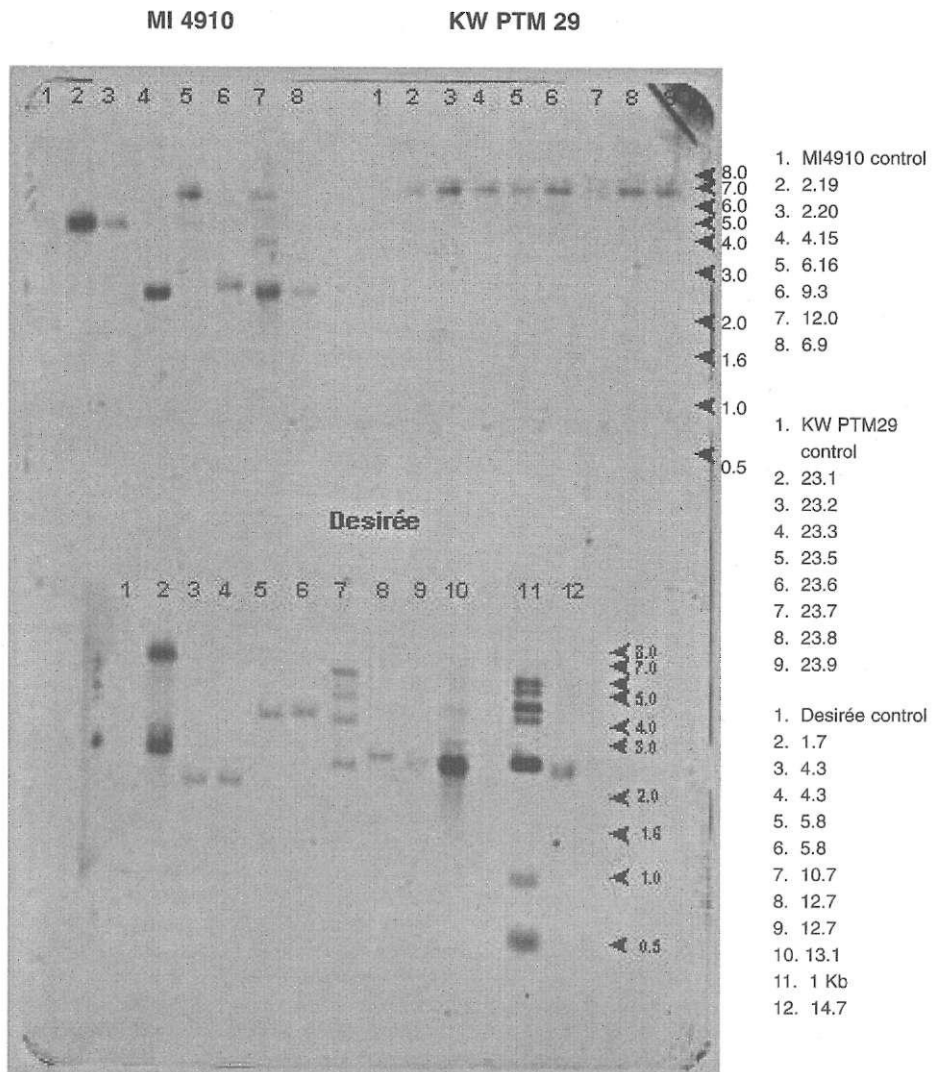


FIGURA 2.- Autodiagrama del genoma de líneas transgénicas de MI 4910, KW PTM 29 y Desirée por medio de Southern blot que contiene el gen Bt.

niéndose a 23 °C durante 48 h y oscuridad total. Este trabajo se llevó a cabo en 1994 y 1995.

Regeneración: Semanalmente los explantes fueron cambiados a medio fresco durante nueve semanas, hasta obtener brotes (regeneración). A cada planta proveniente de un brote se le llama "línea", que puede ser transgénica o no. Para determinarlo se tuvo que realizar la prueba de kanamicina, con una concentración mucho mayor del antibiótico (200 mg/1) para seleccionar aquellas líneas que contenían el gen de resistencia a la kanamicina.

Prueba de kanamicina: La prueba se realizó para seleccionar aquellas líneas que eran resistentes a la kanamicina (gen *kan*), lo que significa que tienen presente el gen de Bt y por lo tanto son transgénicas. Se utilizó los medios de cultivos seleccionados para cada clon y se les adicionó 200 mg/1 de kanamicina. Se utilizó 20 hojas por cada línea y se colocaron cinco por placa, más una hoja como testigo, proveniente del mismo clon sin transformar. Se realizó cuatro repeticiones por línea. La evaluación se efectuó después de 15 d de instalado el ensayo y se registró la regeneración y la mortalidad de hojas.

Verificación de la presencia del gen Bt: Análisis de Southern blot: Esta prueba se realizó con la finalidad de determinar el número de copias o inserciones del gen de Bt por genoma haploide de cada línea. Para el análisis de Southern blot es necesario extraer el ADN genómico de papa. Esto se hizo mediante el método de DELLAPORTA *et al.* (1983). Luego que el ADN fue aislado del follaje de las líneas transgénicas, así como sus testigos, fue digerido con las enzimas de restricción apropiadas y fraccionado por electroforesis en un gel de agarosa al 0,9 %, transferido a una membrana de nylon e hibridado usando una sonda Bt marcada con P³². Para la determinación del número de copias del Bt, 10 µl de ADN de las líneas transgénicas de los clones MI 4910 (7), KW PTM 29 (8) y Desirée (7) fueron digeridos con HindIII, que corta los extremos de la región Bt. El análisis de Southern blot fue realizado mediante la técnica de Southern (SAMBROOK *et al.* 1989).

Resultados y discusión

Medios de regeneración: El que mostró mejores resultados fue el propuesto por CARDI *et al.* (1993), seguido por CD3Z. Los seleccionados tuvieron entre 20 y 100 % de regeneración. Los clones KWPTM 24 y (V²)⁷ no regeneraron en ninguno de los medios evaluados. Los medios seleccionados fueron CARDI *et al.* (1993) para PI 1230540.2, (V²)⁷, y Desirée, CD3Z para MI4910; y KWPTM29.

Concentración de antibióticos: Solo un clon diploide (MI4910) y el cv. Desirée regeneraron a di-

ferentes concentraciones de antibióticos, incluyendo las más altas (100 mg/1 de cefotaxima y 50 mg mg/1 de kanamicina). Los clones PI 1230540.2 y KW PTM 29 mostraron regeneración solo con los niveles más bajos de los antibióticos, 25 y 12,5 mg/1 de cefotaxima y kanamicina, respectivamente, lo que significa que esa concentración es la máxima a la cual estos clones sin transformar, se pueden desarrollar. Los clones (V²)⁷, (V³)⁸, y KW PTM24 fueron susceptibles a todas las concentraciones de ambos antibióticos.

Transformación (co-cultivo): El clon KW PTM 29 (en el medio CD3Z) tuvo un 4 % de regeneración (con explante de hojas), utilizando la bacteria 3290. Los resultados mostraron regeneración de los clones MI 4910 y Desirée en el medio CD3Z, y en ambos casos el mayor porcentaje de regeneración se obtuvo con la bacteria 3370. El clon PI 123050.2 logró regenerar en el medio de CARDI *et al.* (1993) de igual manera que el cv. Desirée. Se pudo observar que con este tipo de explante cinco de los siete clones regeneraron en los dos medios conteniendo kanamicina. Tanto el clon PI 123050.2 como el MI 4910 obtuvieron mayores porcentajes con la bacteria 3370, mientras los clones KW PTM 29, (V²)⁷ y el cv. Desirée lo hicieron con la bacteria 3290. El explante de entrenudo fue fácilmente regenerado.

Prueba de kanamicina: Se obtuvo seis líneas del clon PI 123050.2, ninguna de las cuales mostró resistencia a la kanamicina, ya que no hubo regeneración en el medio con el antibiótico, por lo tanto no hubo transformación. Con el clon MI 4910 se obtuvo 254 líneas de las cuales 71 fueron transgénicas (kanamicina positiva) con explantes de entrenudos. Se comprobó que este clon es capaz de ser transformado por medio de entrenudos. El clon KW PTM 29 tuvo ocho líneas que fueron transgénicas (fig. 1). Del clon (V²)⁷ se obtuvo 13 líneas, ninguna de las cuales resultaron ser transgénicas. Con la variedad Desirée se obtuvo 242 líneas, de las cuales 77 fueron transgénicas. La habilidad de las plantas de regenerar y ser transformadas es una característica varietal. De los clones en estudio se ha podido determinar el tipo de explante capaz de ser regenerado y transformado. Es así que el mejor explante para el clon KW PTM 29 fue la hoja, para MI 4910 el entrenudo, y para el cv. Desirée, aunque regeneran con ambos explantes, el que mejor se comportó fue la hoja. Con esta prueba se determinó la resistencia a la kanamicina, que se encuentra asociado al gen de Bt (Tabla 2).

Verificación de la presencia del gen Bt: Análisis de Southern blot: Los resultados de las pruebas de Southern blot (fig. 2) se manifestaron por la presencia de bandas, cada una de las cuales indica un evento independiente de inserción del gen por cada genoma haploide. Con relación al clon MI 4910, las líneas 4, 15, 6, 16, 9, 3 y 6, 9 presentan una sola copia del gen, a diferencia de

TABLA 2.- Líneas transgénicas que resultaron positivas en la prueba de kanamicina.

| clon | serie | N° de líneas | bacteria | explante |
|----------|-------|--------------|----------|-----------|
| MI 4910 | 6 | 17 | 3290 | entrenado |
| | 8 | 54 | 3370 | entrenado |
| KW PTM29 | 23 | 8 | 3290 | hoja |
| Desirée | 19 | 1 | 3370 | hoja |
| | 21 | 9 | 3290 | hoja |
| | 23 | 67 | 3370 | hoja |

12,0 que presenta tres eventos de transformación (3 bandas = 3 copias del gen). En el caso del clon KW PTM 29, se observó que todas las líneas presentan el mismo patrón de banda, lo que significaría que todas provienen de una misma célula regenerante, por consiguiente constituyen una misma línea. En cuanto a Desirée, las líneas 4,3, 5,8, 12,7 y 14,7 presentan un solo evento de transformación. Las líneas 1,7, 10,7 y 13,1 presentan dos, cuatro y tres eventos de transformación (expresado en diferentes bandas). Todas estas líneas, con excepción de la 13,1, mostraron una mortalidad del 100 %, tanto en pruebas de follaje como en tubérculos. La línea 13,1, a pesar de presentar tres copias o inserciones del gen, en la prueba de tubérculos sólo obtuvo un 33 % de mortalidad. Con estos resultados y los del clon MI 4910, podemos aseverar que solo se necesita una copia del gen para que pueda ser expresado, produciendo altos niveles de toxina y ocasionando alta mortalidad larval. La cantidad de toxina producida no depende del número de copias, sino de la habilidad de la línea para producir toxinas en cantidad suficiente para matar el 100 % de larvas.

Conclusiones

El medio de regeneración que dio mejores resultados fue el de CARDI *et al.* (1993). De los clones diploides evaluados (KW PTM24, KW PTM29, MI 4910, PI 123050.2, (V₃), y (V₃)₂), el MI 4910 fue el que mejor desarrolló en los medios de regeneración. El cv Desirée presentó buenos niveles de regeneración en los tres medios. La construcción de *Agrobacterium tumefaciens* 3370 (doble promotor pTRAVI) dio mejores resultados en las tres transformaciones. La construcción de la bacteria 3390 solo logró transformar al clon KW PTM29. Los clones KW PTM29 y MI 4910 fueron los diploides, de los que se obtuvo líneas transgénicas, siendo el segundo el que mostró mayor habilidad de regeneración luego de la transformación. Mediante la prueba de Southern blot se pudo concluir que las ocho líneas transgénicas del clon KW PTM29 corresponden al mismo evento de transforma-

ción, lo que significa que todas se han originado de un mismo brote. En las líneas transgénicas del clon MI 4910 existen 1-3 eventos de transformación, y en el cv. Desirée 1-4.

Agradecimientos.- Al Dr. Ali Golmirzaie por propiciar esta investigación, al Dr. Aziz Lagnaoui por su apoyo en la culminación de la redacción final. A Jorge Benavides, Rosalva Villagaray y Juan Núñez por su ayuda en la realización del trabajo.

Literatura

Cañedo V, Benavides J, Golmirzaie A, Cisneros F, Ghislain M, Lagnaoui A. 1999. Assessing Bt-transformed potatoes for potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller), management, pp. 161-170. In: Impact on a changing world. Program Report 1997-98. Lima, International Potato Center.

Cardi T, Iannamico V, D'Ambrosio F, Fùippone E, Lurquin PF. 1993. In vitro regeneration and cytological characterization of shoots from leaf explants of three accessions of *Solanum commersonii*. Plant Cell Tissue Organ Culture 34:107-114.

De Block M. 1988. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Theor. appl. Genet. 76: 767-774.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. 1983. A plant DNA miniprep. Plant molec. Biol. Rep. 1: 19-21.

Ebora RV, Ebora MM, Sticklen MB. 1994. Transgenic potato expressing the *Bacillus thuringiensis* cryIA(c) gene effects on the survival and food consumption of *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Noctuidae). J. econ. Entom. 87(4):1122-1127.

Hoekema A, Huisman A, Molendijk MJ, Elzen PJM, Van den Cornelissen BJC. 1989. The genetic engineering of two commercial potato virus X. Bio-Technology 7(3):273-278.

Hofte H, De Greve H, Seurinck J, Jansen S, Mahillon J, Ampe C, Vanderkerchov J, Vanderbruggen H, Van Montagu M, Zabeau M, Vaeck M. 1986. Structural and functional analysis of a cloned delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner 1715. Eur. J. Biochem. 161: 273-280.

Jansens S, Cornelissen M, De Clerco R, Reynaerts A, Peferoen M. 1995. *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) resistance in potato by expression of the *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) insecticidal crystal protein. J. econ. Entom. 88(5): 1469-1476.

Karp A, Jones MG, Ooms G, Bright S. 1987. Potato protoplasts and tissue culture in crop improvement. Biotechn. gen. Engin. Rev. 5.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. plant. 15: 473-497.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniars T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Ed. 2.