

Transformación eficiente de *Solanum tuberosum* cv. Spunta mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando higromicina como agente selectivo

DÉCIMA ONETO, C.^{1,2}; CORONEL, J.¹; STORANI, L.^{1,3}; GONZÁLEZ, M.N.^{1,3}; FEINGOLD, S.¹; MASSA, G. A.^{1,2,3}

RESUMEN

La transformación genética de plantas es una herramienta biotecnológica de alto impacto en el mejoramiento vegetal que brinda la posibilidad de obtener nuevos cultivos que se adapten a las demandas de producción y de consumo. Actualmente la estrategia de transformación más utilizada en papa se basa en la incorporación de genes completos vía *Agrobacterium tumefaciens*. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar el primer protocolo de transformación para *Solanum tuberosum* cv. Spunta mediado por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el antibiótico higromicina como agente de selección. Para ello se transformaron explantes de papa cv. Spunta utilizando *A. tumefaciens* con un vector binario que contenía el gen hpt que confiere resistencia al antibiótico higromicina. Se realizaron determinaciones moleculares y fenotípicas para validar tanto la eficiencia del protocolo de transformación como la acción del antibiótico higromicina como agente de selección. Se obtuvieron 62 ápices regenerados de los explantes inoculados con *A. tumefaciens* (62% de regeneración) de las cuales 30 plantas fueron positivas para el gen hpt. Considerando como eficiencia de transformación el número de plantas transgénicas/el número de explantes inoculados, obtuvimos un 30% de eficiencia. El presente trabajo permitió desarrollar un protocolo sencillo y eficiente de transformación genética de papa cv. Spunta mediante *A. tumefaciens* utilizando higromicina como agente selectivo.

Palabras claves: papa, transformación vegetal, selección, mejoramiento genético.

ABSTRACT

Plant genetic transformation is a biotechnological tool with a high impact on plant breeding since it offers the possibility of introducing new traits in crops to fulfill the demands of production and consumption. The most widely used transformation strategy in potato is based on integration of genes via A. tumefaciens. The objective of the present work was to develop a transformation protocol for Solanum tuberosum cv. Spunta mediated by A. tumefaciens using hygromycin as a selective agent. For this, explants of potato cv. Spunta were transformed using A. tumefaciens with a binary vector containing the hygromycin conferring resistance transgene (hpt) under the control of NOS promoter. Molecular and phenotypic determinations were performed to validate both the efficiency of the transformation protocol and the performance of hygromycin as a selection agent. Sixty-two regenerated shoots were obtained from explants inoculated with A. tumefaciens (62% regeneration) of which 30 plants were positive for the hpt gene. Thirty percent transformation efficiency -calculated as the

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Balcarce, Laboratorio de Agrobiotecnología, Balcarce CC 276 (7620), Balcarce, Argentina.

²Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias, Balcarce, Argentina.

³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. Correo electrónico: massa.gabriela@inta.gov.ar

Recibido 10 de octubre de 2017 // Aceptado 25 de abril de 2020 // Publicado online 23 de septiembre de 2020

number of transgenic plants / the number of explants inoculated- was obtained using this protocol. The present work developed presents a simple and efficient protocol for genetic transformation of potato cv. Spunta by *A. tumefaciens* using hygromycin as a selective agent.

Keywords: potato, vegetal transformation, selection, genetic breeding.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) es el tercer cultivo alimenticio más importante del mundo, con un total de 22 millones de hectáreas y una producción aproximada de 458 millones de toneladas. En Argentina, durante la campaña 2015/2016 se reportó una producción de 2.430.000 t (FAOSTAT, 2018). El cultivar Spunta es el más utilizado en Argentina debido a que posee un alto rendimiento, se adapta a regiones con doble cosecha y posee muy buena capacidad de conservación (Huarte y Capezio, 2013).

Uno de los objetivos de los programas de mejoramiento es el aumento de la producción con el fin de cumplir con la demanda del sector. La transformación genética de plantas, entendida como la introducción controlada de ácidos nucleicos en un genoma receptor, es una herramienta biotecnológica de alto impacto que brinda la posibilidad de obtener con mayor rapidez cultivos mejorados a partir de la introducción de una característica deseada, por ejemplo: aumento en la producción, calidad nutricional y tolerancia a estreses tanto bióticos como abióticos (Waterer *et al.*, 2010; Imbo *et al.*, 2016). Los métodos de transformación más utilizados actualmente se basan en la obtención de células transgénicas mediante *Agrobacterium tumefaciens* o biobalística, y posterior regeneración de plantas completas y fértiles a partir de cultivo y selección *in vitro*. Durante el proceso de transformación son pocas las células blancas que sobreviven e incorporan establemente el ADN foráneo (Birch, 1997). Es esencial, por lo tanto, detectar las células transformadas dentro del gran número de las no transformadas y establecer condiciones adecuadas de cultivos de tejidos, de transferencia de genes y de selección que permitan desarrollar plantas enteras a partir de esta estrategia. Para ello se utilizan genes “marcadores” que permiten crecer a los explantes transformados en medios selectivos, lo que permite diferenciarlos de los no transformados.

En la actualidad, se encuentran reportados múltiples protocolos de transformación de papa vía *A. tumefaciens* utilizando diversos explantes, en distintos cultivares y con diferentes agentes de selección (Millam, 2007; Halterman *et al.*, 2016; Craze *et al.*, 2018; Bruce y Rupp, 2019; Bakhsh *et al.*, 2020). La relevancia de este tema se debe principalmente a que la papa cultivada, *Solanum tuberosum* Grupo Tuberosum L. ($2n = 4x = 48$), es un cultivo tetraploide heterocigoto que se propaga clonalmente y debido a la fal-

ta de reproducción sexual y su segregación concomitante de alelos, la ingeniería genética es una forma eficiente de introducir rasgos de mejoramiento de cultivos de manera más rápida que el mejoramiento convencional (Nadakuoti *et al.*, 2019).

Cabe destacar que a la fecha no se encuentra publicado un protocolo de transformación de papa para el cultivar Spunta.

A su vez, en diversos trabajos se indica que la transformación genética vegetal mediada por *A. tumefaciens* es dependiente del genotipo (Heeres *et al.*, 2002; Cingel *et al.*, 2010; Barpete *et al.*, 2015; Chakraborty *et al.*, 2020) por lo que resulta de interés desarrollar un protocolo de transformación genética para cultivares comerciales de papa, como Spunta, lo que permitirá en un futuro ser aplicado en planes de mejoramiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

Ápices de *S. tuberosum* cv. Spunta se cultivaron *in vitro* en medio de cultivo Murashige Skoog (MS; medio basal Murashige Skoog 1X suplementado con vitaminas (Phyto-technology Laboratories, Cat. N.º M519); 20 g.L⁻¹ sacarosa (Biopack, Cat. N.º 9789.08); 8 g.L⁻¹ de agar (Phyto-technology Laboratories, Cat. N.º A296) durante 3 a 4 semanas en tubos de ensayos para la determinación de la curva de sensibilidad y en cajas magenta de plástico para los ensayos de transformación (Phyto-technology Laboratories, Cat. N.º C2100). El medio MS se ajustó a pH 5,8 con 0,1 N KOH o HCl antes de esterilizar en autoclave (121 °C, 20 min). Para los experimentos de transformación se colocaron cinco ápices por recipiente de cultivo, en un gabinete de flujo laminar, y se cultivaron en cuarto de cultivo con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) (80/90 µE/m²/s luz blanca fría) a 21 °C, hasta el momento de realizar la transformación vegetal.

2. Protocolo de selección: curva de sensibilidad al agente selectivo

Se evaluaron los efectos de distintas concentraciones del agente selectivo higromicina en plántulas de papa cv. Spunta sin transformar (WT) durante 30 días de cultivo *in*

vitro en medio BM. Para realizar la curva de sensibilidad se utilizaron 5 concentraciones diferentes de higromicina (2 mg.L⁻¹, 4 mg.L⁻¹, 6 mg.L⁻¹, 8 mg.L⁻¹ o 10 mg.L⁻¹). Como control se utilizó medio BM sin higromicina. Para cada curva se analizaron 10 plántulas durante cuatro semanas. En este periodo se realizaron registros tres veces por semana de los parámetros: altura de las plántulas, presencia de raíz, número y coloración de hojas.

3. Vector de expresión vegetal

Para la transformación genética se usó el vector binario pHPT, (13277 pb). Este plásmido contiene el gen hpt que codifica para la enzima higromicin-fosfotransferasa, la cual otorga resistencia al antibiótico higromicina bajo control transcripcional del promotor NOS (del inglés: nopaline synthase; An *et al.*, 1990) y el terminador NOS entre los bordes del ADN-T. El vector pHPT se introdujo en la cepa EHA105 de *A. tumefaciens* por electroporación. Las células transformadas se seleccionaron para resistencia en medio Luria Bertani (LB) suplementado con 25 mg.L⁻¹ de rifampicina y 50 mg.L⁻¹ de kanamicina.

3.1 Preparación del inóculo de *Agrobacterium tumefaciens* para transformación

Se realizó un cultivo inicial de 5 ml de medio LB, suplementado con 25 mg.L⁻¹ de rifampicina y 50 mg.L⁻¹ de kanamicina, partiendo de un cultivo en placa fresca. El cultivo se incubó durante 16 h a 28 °C en un agitador a 200 rpm. Luego de la incubación de 16 h se transfirieron los 5 ml de cultivo a un erlenmeyer de 250 ml que contenía 50 ml de medio LB suplementado con 25 mg.L⁻¹ de rifampicina y 50 mg.L⁻¹ de kanamicina. El cultivo se incubó durante 16 h a 28 °C en un agitador a 200 rpm. En el momento de la transformación se midió la densidad óptica (DO) a 600 nm.

4. Protocolo de transformación

Se utilizaron como explantes hojas de plántulas de 3 o 4 semanas cultivadas *in vitro*. Las hojas fueron cortadas eliminando el peciolo. Se colocaron 20 explantes por caja de Petri (OneLab Ø90mm) y 20 ml de medio de infección líquido compuesto por sacarosa 20 g.L⁻¹ (Biopack, Cat. N.º 9789.08) y 4,3 g.L⁻¹ sales con vitaminas Murashige y Skoog (PhytoTechnology Laboratories, Cat. N.º M519). A cada placa se le adicionó la cantidad necesaria de inóculo de *A. tumefaciens* para lograr una DO final de 0,2/0,3.

Inmediatamente, las placas se incubaron a 21 °C, en oscuridad con una agitación a 50 rpm durante 45 minutos. Luego, los explantes se secaron en papel estéril y se subcultivaron en medio de cocultivo durante 48 h a 21 °C con un fotoperiodo 16/8 (luz/oscuridad; 20 µE/m²/s). El medio de cocultivo está compuesto por medio MS suplementado con 0,2 mg.L⁻¹ de ácido naftalén acético (ANA; Sigma, Cat. N.º NN0640), 0,02 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃; Sigma, Cat. N.º x), 2,5 mg.L⁻¹ de zeatin ribósido (ZR; PhytoTechno-

logy Laboratories, Cat. N.º Z899) y 8 g.L⁻¹ de agar (Phyto-technology Laboratories, Cat. N.º A296).

Luego del periodo de cocultivo, se subcultivaron un total de 10 explantes por placa en medio inductor de callo (CIM) durante 12 días a 21 °C con fotoperiodo 16/8 (luz/oscuridad; 80-110 µE/m²/s). El medio CIM está compuesto por medio MS suplementado con 0,2 mg.L⁻¹ de ANA, 0,02 mg.L⁻¹ de GA₃, 2,5 mg.L⁻¹ de ZR, 2,5 mg.L⁻¹ de cefotaxime (Phyto-technology Laboratories, Cat. N.º A296), 100 mg.L⁻¹ de ampicilina (Sigma, Cat. N.º 7177-48-2) y 8 g.L⁻¹ de agar.

Posteriormente, los explantes se subcultivaron cada 15 días en medio inductor de ápices (SIM) a 21 °C con fotoperiodo 16/8 (luz/oscuridad; 80-110 µE/m²/s). El medio SIM está compuesto por medio MS suplementado con 0,2 mg.L⁻¹ de ANA, 0,2 mg.L⁻¹ de GA₃, 2,5 mg.L⁻¹ de ZR, 400 mg.L⁻¹ de cefotaxima, 100 mg.L⁻¹ de ampicilina, 8 mg.L⁻¹ de higromicina y 8 g.L⁻¹ de agar.

A medida que se formaron los ápices (5-10 mm de tamaño), se cortaron cuidadosamente de los callos y se pasaron a tubos que contenían medio MS y se mantuvieron a 21 °C bajo fotoperiodo 16/8 (luz/oscuridad; 80-110 µE/m²/s).

Se continuó transfiriendo los explantes a intervalos de 15 días a medio SIM. La disección de los nuevos ápices se realizó de manera de asegurar que los nuevos brotes provinieran de callos independientes.

5. Detección del gen hpt mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La extracción de ADN de las plántulas provenientes del ensayo de transformación se realizó según lo descrito por Haymes y colaboradores (1996). Se determinó la concentración de ADN por absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro digital (SmartSpectTM3000 BIORAD, EE. UU.). Se determinó la calidad del ADN mediante la relación A260/A280 y por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed (Genbiotech, Argentina).

El ADN extraído de las muestras se utilizó como molde para amplificar el gen hpt mediante PCR. Para tal fin se utilizaron los iniciadores Hig Fw e Hig Rv (5'gaagatgtggc-gacctcgtga 3' y 5'aagtgcagcagctctccga 3', respectivamente). Como control negativo se utilizó ADN de plantas de papa cv. Spunta WT y como control positivo se utilizó ADN plasmídico del vector pHPT. Las condiciones de amplificación fueron: 94 °C durante 3 min, 35 ciclos: 94 °C por 30 seg, 52 °C por 15 seg, 72 °C por 1 min y por último, 1 ciclo a 72 °C durante 5 min. Los productos obtenidos fueron confirmados por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con GelRed (Genbiotech, Argentina) en presencia de marcadores de peso molecular (Axygen, EE. UU.) y revelados con luz ultravioleta.

6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos fenotípicos de la curva de sensibilidad se realizó un ANOVA de medidas

repetidas, con un análisis posterior de Bonferoni utilizando el programa GraphPad Prism 4.0 (versión 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California EUA, www.graphpad.com).

Para el análisis estadístico de los datos de las plantas transgénicas se realizó una prueba de Wilcoxon (Mann-Whitney U) utilizando el programa estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2012).

RESULTADOS

1. Curva de sensibilidad al agente selectivo en plantas de papa cv. Spunta

Se evaluaron diferentes concentraciones de higromicina para determinar la sensibilidad de plántulas de papa no transformadas al agente selectivo. Se evaluó el efecto del tratamiento para cada uno de los días de toma de muestra. Durante los primeros 3 días del tratamiento todas las plantas sometidas a las distintas dosis de higromicina mostraron una coloración similar al control (figura 1). En el caso de la dosis de 2 mg.L⁻¹ las plantas presentaron coloración similar a las plantas control durante todo el experimento. En la dosis de 4 mg.L⁻¹ se encontraron diferencias significativas con respecto al control a partir del día 9. En el resto de las dosis la diferencia se evidenció a partir del día 7. La dosis de 10 mg.L⁻¹ al final del experimento fue la única concentración de agente selectivo que mostró diferencias significativas con respecto a todas las dosis a partir del día 7. El análisis estadístico indicó diferencias significativas en la interacción dosis de agente selectivo y tiempo (p<0,0001).

Respecto a otros de los parámetros evaluados las plántulas que crecieron bajo concentraciones de higromicina 2, 4 y 6 mg.L⁻¹ formaron raíces. Dichos tratamientos no presentaron diferencias significativas con respecto al control a lo largo de todo el periodo que duró el experimento (figura 2). Las plántulas que crecieron en medio suplementado con 8 mg.L⁻¹ de higromicina presentaron raíces, pero su aparición se produjo en forma posterior al control. Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas (p<0,0001). A partir del día 9 las plántulas que crecieron en medio con higromicina 8 mg.L⁻¹ presentaron raíces igual que el control, pero cabe destacar que el crecimiento de estas fue más lento (datos no publicados). Las plántulas que crecieron en medio con higromicina 10 mg.L⁻¹ se diferenciaron marcadamente del control a partir del día 7, esta diferencia fue significativa (p<0,0001) y se mantuvo hasta el final del tratamiento.

Para el parámetro número de hojas se evaluó el efecto de las diferentes concentraciones de agente selectivo para cada uno de los días de toma de muestra. Las plántulas que crecieron en medio con higromicina 2 mg.L⁻¹ no presentaron diferencias significativas con el control a lo largo del tratamiento (figura 3). Las plántulas que crecieron en medio con higromicina 4 mg.L⁻¹ se diferenciaron del control a partir del día 11, estas diferencias fueron estadísticamente significativas y se mantuvieron hasta el final del tratamiento. Las plántulas en medio con higromicina 6, 8 y 10 mg.L⁻¹ se diferenciaron del control a partir del día 7. Cabe destacar que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con higromicina 6, 8 y 10 mg.L⁻¹ ya que en

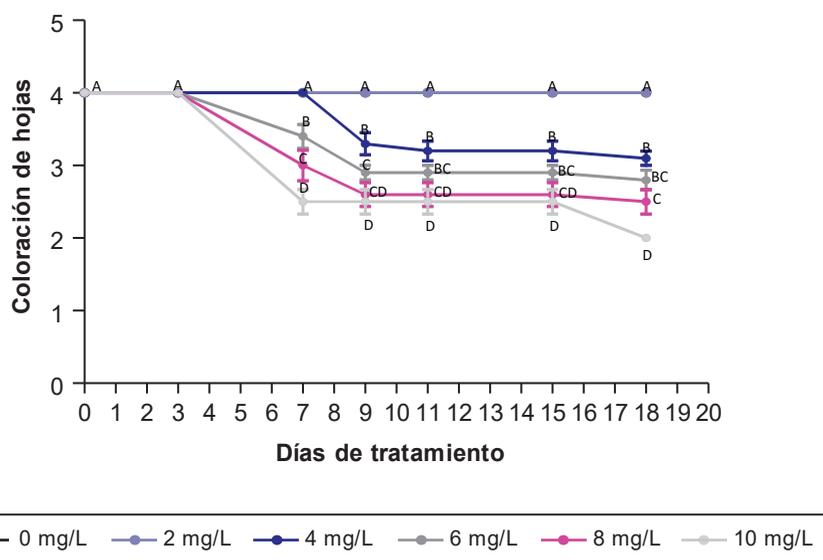


Figura 1. Evolución de la coloración en hojas de papa sometidas a diferentes concentraciones de higromicina. Los datos son promedio ± error estándar de 10 plantas. Para la clasificación de color se utilizó el siguiente criterio: Verde oscuro (4), Verde Claro (3), Verde Amarillo (2) y Amarillo (1). Comparación de las diferentes concentraciones de higromicina dentro de cada uno de los tiempos evaluados. Letras diferentes indican diferencias significativas p<0,05.

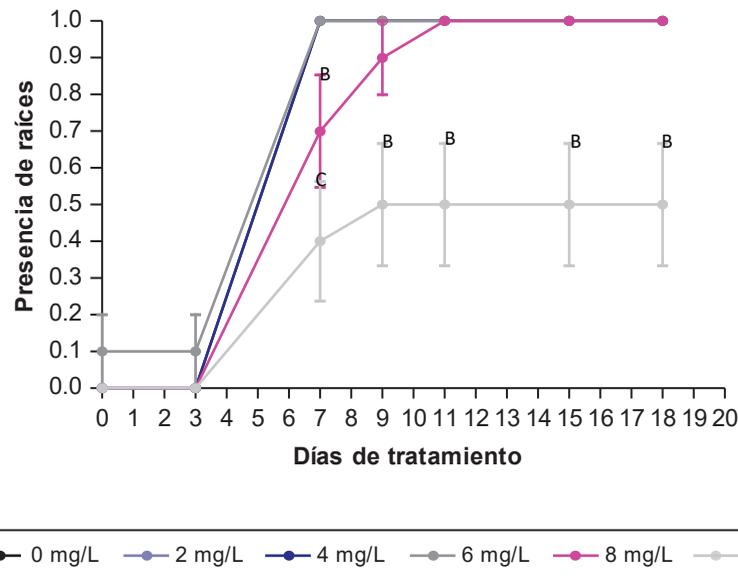


Figura 2. Evolución de la formación de raíz en plántulas de papa sometidas a diferentes concentraciones de higromicina. Los datos son promedio \pm error estándar de 10 plantas. 1 indica presencia de raíces, 0 indica ausencia de raíces. Comparación de las diferentes concentraciones de higromicina dentro de cada uno de los tiempos evaluados. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

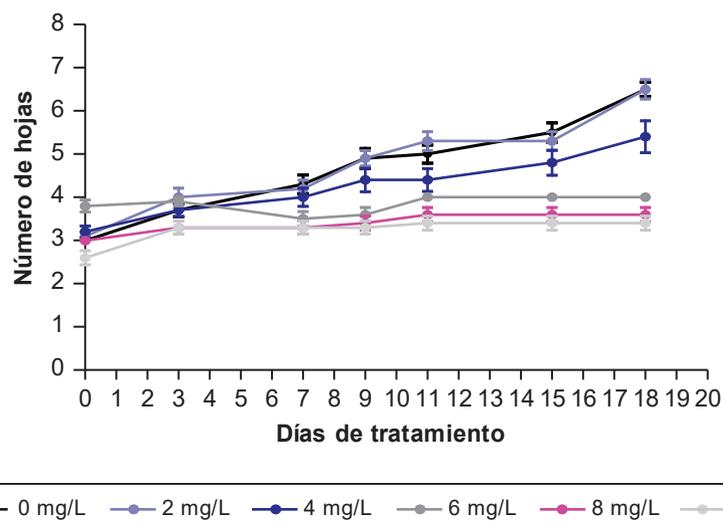


Figura 3. Evolución del número de hojas en plántulas de papa sometidas a diferentes concentraciones de higromicina. Los datos son promedio \pm error estándar de 10 plantas. Comparación de las diferentes concentraciones de higromicina dentro de cada uno de los tiempos evaluados. Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0,05$.

ninguno de los tres tratamientos se observó la aparición de hojas nuevas.

Para el parámetro altura de las plantas se evaluó el efecto de las diferentes concentraciones de agente selectivo para cada uno de los días de toma de muestra. Desde el comienzo del experimento se encontraron que las

plántulas presentaban distintas alturas, lo que se observa en las diferencias encontradas entre los tratamientos en el día 0 (figura 4). Es por esta razón que se optó por evaluar el parámetro crecimiento (diferencia entre altura final e inicial) en los distintos tratamientos con higromicina (figura 4, tabla 1). El aumento de la concentración de higromicina afectó en

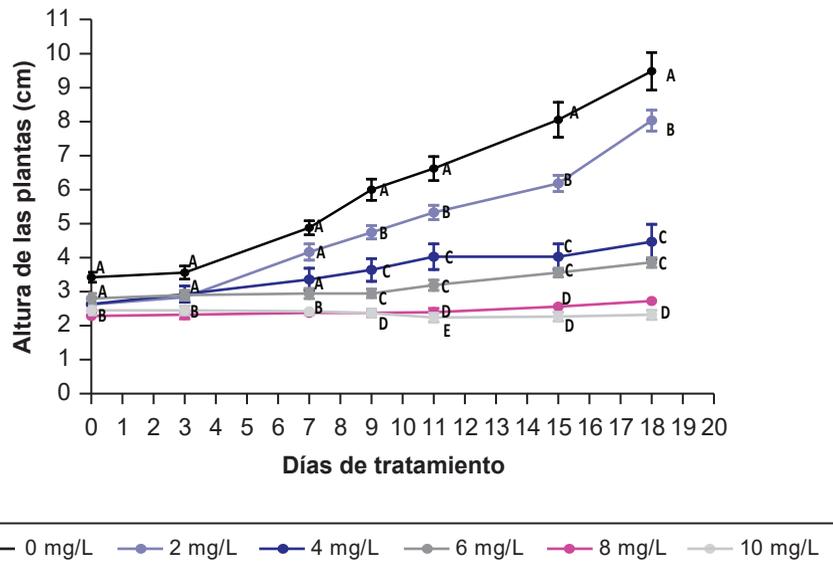


Figura 4. Evolución de la altura en plántulas de papa sometidas a diferentes concentraciones de higromicina. Los datos son promedio \pm error estándar de 10 plantas. Comparación de las diferentes concentraciones de higromicina dentro de cada uno de los tiempos evaluados. Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0,05$.

Concentración higromicina	0 mg.L ⁻¹	2 mg.L ⁻¹	4 mg.L ⁻¹	6 mg.L ⁻¹	8 mg.L ⁻¹	10 mg.L ⁻¹
Crecimiento (cm)	6,06 \pm 0,35 ^A	5,4 \pm 0,23 ^B	1,83 \pm 0,35 ^C	1,06 \pm 0,14 ^C	0,44 \pm 0,10 ^D	-0,13 \pm 0,12 ^D

Tabla 1. Análisis estadístico de los datos de crecimiento (diferencia entre altura final e inicial). Comparación de las diferentes concentraciones de higromicina. Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0,05$.

forma negativa el crecimiento de las plántulas (figura 4). Se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de las plantas creciendo bajo 2, 4, 6, 8 y 10 mg.L⁻¹ de higromicina.

2. Obtención de plantas transgénicas de papa cv. Spunta

Se inocularon un total de 100 explantes con un cultivo de *A. tumefaciens* con OD₆₀₀ 0,27 final por placa. Se obtuvieron 62 ápices putativamente transgénicos provenientes de los 100 explantes inoculados (eficiencia de regeneración del 62%). En el medio selectivo SIM suplementado con 8 mg.L⁻¹ higromicina (según lo obtenido del análisis de la curva de sensibilidad a higromicina) se obtuvieron un total de 276 callos de los cuales solo 56 desarrollaron ápices (eficiencia de inducción de ápices del 20,28%).

Adicionalmente, se utilizaron 30 explantes sin inocular con el fin de utilizarlos como controles de regeneración, de los cuales se obtuvieron 24 ápices (eficiencia de regeneración del 80%). En el medio selectivo SIM sin higromicina se obtuvo un total de 32 callos de los cuales solo 9 desarrollaron ápices (eficiencia de inducción de ápices del 28,12%).

La formación de callos se observó en los bordes cortados de los explantes luego de 12-15 días de cultivo en medio CIM, se formaron aproximadamente 3 callos por explante. Los callos fueron compactos, granulados y verdes (figura 5a). Los explantes produjeron más callos durante los siguientes subcultivos hasta lograr el total (276) entre las 8-9 semanas posinoculación. No se observaron diferencias morfológicas entre los callos provenientes de explantes inoculados y los provenientes del control sin antibiótico.

La formación de ápices se visualizó entre las semanas 10-11 posinoculación (figura 5b). Estos se desarrollaron en la superficie de los callos y no se observaron diferencias morfológicas entre los ápices provenientes de explantes inoculados y los provenientes del control (figura 5c). Todos los ápices fueron disectados de los callos al alcanzar una altura aproximada de 1-2 cm y se colocaron en forma individual en tubos con medio MS (figura 5d). Los callos produjeron ápices durante los siguientes subcultivos hasta lograr el total (62 inoculados y 24 control) entre las 17-18 semanas posinoculación, luego de este tiempo no se observó formación de ápices nuevos por lo cual se finalizaron los subcultivos de los callos en medio SIM.

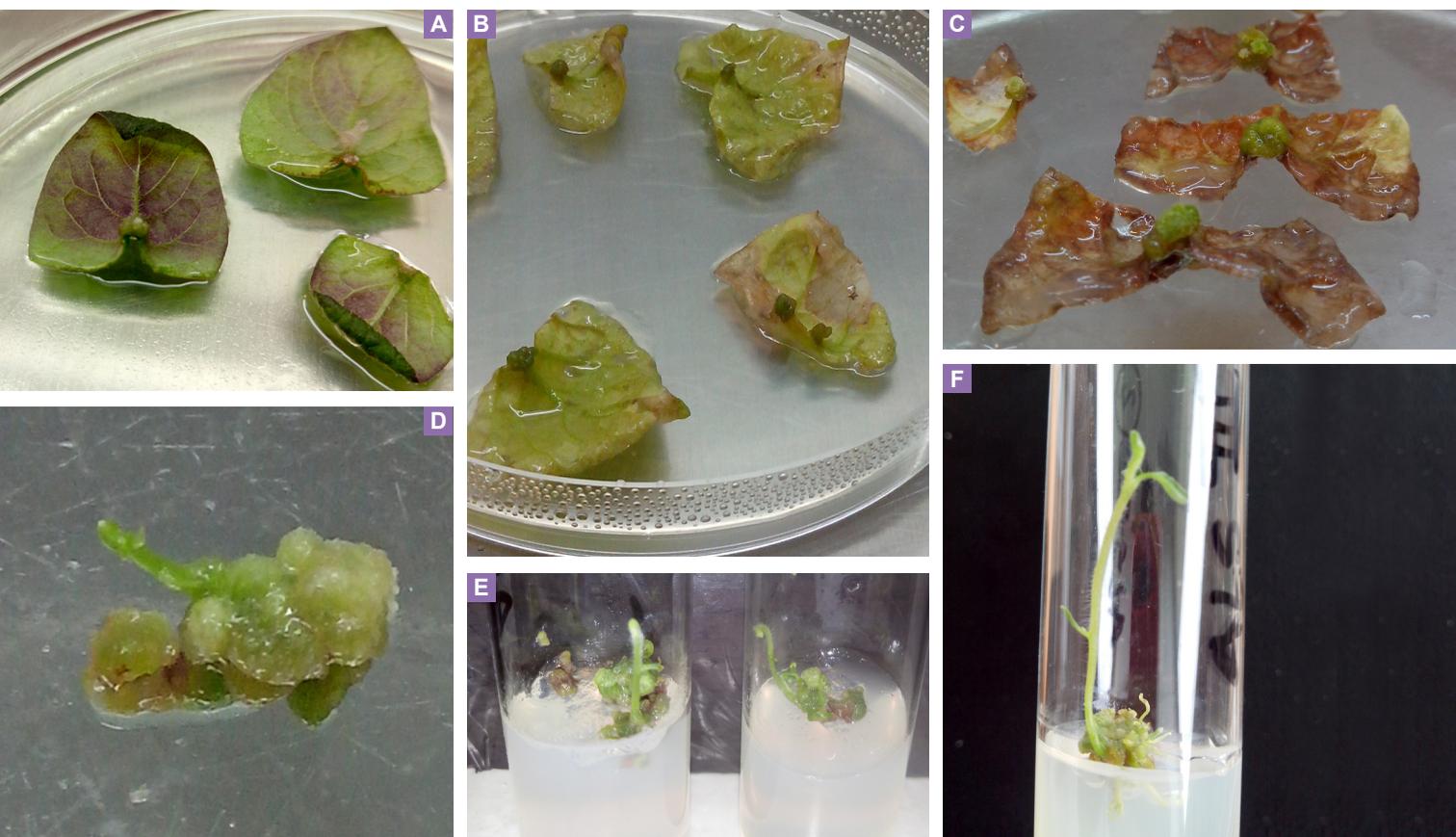


Figura 5. Transformación genética de papa cv. Spunta mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. A, B y C: callos obtenidos en medio de cultivo CIM con selección; D: ápices provenientes de explantes inoculados en medio SIM; E y F: ápices provenientes de explantes inoculados en medio BM (en tubo de ensayo), G: plántulas provenientes de explantes inoculados, cortados del callo en medio BM.

2.1 Evaluación de plantas transgénicas cultivadas en medio selectivo

A fin de corroborar los resultados de la curva de sensibilidad, se seleccionó la concentración de 8 mg.L^{-1} de higromicina para evaluar su eficacia como agente de selección de las plantas transgénicas del cv. Spunta. Se seleccionó la concentración de 8 mg.L^{-1} de higromicina debido a que fue la menor concentración en la que se observaron diferencias significativas en todos los parámetros estudiados comparando con los controles.

Se tomaron los 62 ápices de papa cv. Spunta provenientes de los ensayos de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, se subcultivaron en tubos que contenían medio MS suplementado con 8 mg.L^{-1} de higromicina y fueron evaluados fenotípicamente y molecularmente a fin de confirmar la presencia del transgen hpt.

2.2 Evaluación molecular

Luego de tres semanas se procedió a la extracción de ADN genómico de las 62 plántulas subcultivadas en medio MS. El ADN extraído fue de buena calidad ya que se observó una banda íntegra de alto peso molecular y la relación de A_{260}/A_{280} se encontró en el rango de 1,6 a 2,3. Se

procedió a realizar una PCR a fin de poder determinar la presencia del gen hpt. De 62 plantas analizadas, 30 resultaron positivas para la presencia del gen hpt (hpt+, 648 pb) y se clasificaron como plantas transgénicas. Las 32 plantas restantes no presentaron el gen hpt por lo que clasificaron como plantas no transformadas y fueron consideradas escapes. Estos resultados indican que la eficiencia de transformación obtenida fue del 30%, calculada como número de plantas transgénicas obtenidas/número de explantes inoculados.

2.3 Evaluación fenotípica de las plantas hpt+ y plantas no transformadas

Se separaron las plantas en dos grupos, aquellas que fueron positivas para hpt (hpt+) y las negativas para hpt (hpt-) (escapes), se colocaron en tubos que contenían BM suplementado con 8 mg.L^{-1} de higromicina y se evaluaron los parámetros medidos anteriormente durante la curva de sensibilidad. En plantas hpt+ se observó aparición de hojas nuevas, efecto no observado en plantas hpt- ($p=0,0001$; $1,25 \pm 0,14$ y 0 ± 0 ca). La coloración de todas las plantas hpt+ fue de verde intenso, mientras que en plantas hpt- varió desde amarillo a verde amarillento ($p < 0,0001$; 4 ± 0 ca).

y $1,38 \pm 0,16$ ca). En el caso del crecimiento se observó que fue mayor en plantas hpt+, mientras que en plantas hpt- el crecimiento fue casi nulo ($p=0,0002$; $3,34 \pm 0,28$ cm; $0,09 \pm 0,05$ cm ca). Por último se evaluó la presencia de raíces. Si bien no todas las plantas desarrollaron raíces, la aparición de estas fue mayor en plantas hpt+ que en plantas hpt- ($p=0,0201$; $0,67 \pm 0,15$ y $0,13 \pm 0,11$ ca).

DISCUSIÓN

El desarrollo de un protocolo de regeneración confiable es un paso crucial para la transformación genética en papa (Ahmed *et al.*, 2018) debido a que el genotipo es un factor importante que afecta tanto la eficiencia de regeneración como la eficiencia de transformación genética (Borna *et al.*, 2010; Ahloowalia *et al.*, 1982; Romano *et al.*, 2003). La selección de explantes sanos de la planta wild type de papa es crítica para generar una alta frecuencia de callos, brotes y regeneración de raíces (Khatun *et al.*, 2012).

En el presente trabajo se ajustó por primera vez un protocolo reproducible de transformación genética de papa cv. Spunta mediante la utilización de *Agrobacterium tumefaciens* utilizando como agente selectivo el antibiótico higromicina. Mediante la utilización de este protocolo se logró una eficiencia de transformación del 30%. En diversos trabajos se reportan eficiencias de transformación superiores, en un rango entre el 60% y el 90% (Beaujean *et al.*, 1998; Douches *et al.*, 1998; Khatun *et al.*, 2012; Borna *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2018; Bakhsh *et al.*, 2020) para cultivares como Désirée, Lemhi Russet, Kaptah Vandel, Cardinal, Heera, Diamant, Granola, Lady Olympia, Agria e Innovator. En ninguno de estos trabajos está incluido el cv. Spunta, por lo que no es posible lograr una adecuada comparación entre las eficiencias de transformación reportadas en los trabajos mencionados y el nuestro.

La menor eficiencia de transformación obtenida en nuestro ensayo puede ser explicada por factores como el genotipo, el agente de selección, la construcción utilizada para la transformación o la cepa de *Agrobacterium* utilizada (Roman *et al.*, 2015). Por un lado, se obtuvo un 50% de ápices regenerantes en medio SIM que resultaron escapes (hpt-). Este hecho también fue reportado en la transformación del cv. Desiree (Roman *et al.*, 2015). El alto número de escapes se puede deber a la gran capacidad de regeneración *in vitro* que caracteriza a ciertos cultivares de papa (Cañedo y Cisneros, 2004), permitiendo la proliferación y desarrollo de ciertos regenerantes no transformados en presencia del agente selector. Como resultado se obtiene una planta con resistencia o tolerancia natural (López y Chaparro, 2007). También es posible que varios de estos regenerantes no estuvieran en contacto permanente en el medio que contiene el agente selector permitiendo su desarrollo (Monserrat *et al.*, 2001). Esto puede deberse a la forma globular que presentan los callos donde no todo el callo se encuentra en contacto con el medio que contiene el agente selectivo. Es por esta razón que los ápices obtenidos en medio SIM se deben cultivar en forma individual en tubos que contengan medio BM suplementado con $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de higromicina, para asegurar el contacto del

ápice con el agente de selección y de esta forma reducir el número de plantas en los análisis moleculares.

Por otro lado, el antibiótico higromicina se utilizó por primera vez como agente selectivo en la transformación genética de *Nicotiana tabacum* por el grupo de Van den Elzen (1985) y en 1989 fue utilizado por primera vez en papa (*Solanum tuberosum* x *S. phureja* y *Solanum tuberosum* x *S. chacoense*) por Masson (1989). Posteriormente, fue utilizado en numerosos trabajos como agente selectivo en la transformación de diversos cultivares de papa y batata (Surov *et al.*, 1998; Okada *et al.*, 2001; Cavatorta *et al.*, 2011; Orbegozo *et al.*, 2016), no describiéndose su acción en el cv. Spunta. A través de los ensayos de sensibilidad al antibiótico higromicina se determinó que la dosis letal para los explantes no transformados fue de $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de higromicina. De acuerdo con los resultados obtenidos y luego de comparar las diferentes curvas de sensibilidad al antibiótico, se pudo concluir que el aumento de la concentración del agente selectivo en el medio de cultivo provocó una disminución en el crecimiento, decoloración del tejido, disminución del número de hojas y perjudicó la formación de raíces. Las plantas que presentaron mejores parámetros morfofisiológicos en medio selectivo portaban el gen hpt. El método de selección propuesto para el cv. Spunta ($8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de higromicina) presentó un porcentaje de identificación del 48,38% entre las plantas transgénicas de las plántulas no transformadas.

En relación con el uso de higromicina durante el proceso de obtención de transformantes se concluye que la eficiencia fue baja (48,38%) en el presente trabajo; esto se determinó al comparar los resultados obtenidos con ensayos reportados previamente donde se describe el uso del mismo antibiótico, pero en diferentes variedades (M'Hamdi *et al.*, 2003; Kashani *et al.*, 2012). Estas diferencias pueden deberse a múltiples factores asociados a las condiciones de transformación o al tipo de explante usado (Lagunes, 2009). No obstante la principal causa puede deberse a que los ensayos de regeneración y transformación son genotipo dependiente del tipo de cultivo que se use en los experimentos para realizar (Orbegozo *et al.*, 2013). En futuros trabajos de transformación del cv. Spunta utilizando como agente de selección higromicina, se deberá ajustar este parámetro y utilizar concentraciones más altas.

Este protocolo es una primera aproximación a la transformación genética (de un cultivar de papa de amplio interés económico y agronómico en Argentina como lo es el cultivar Spunta) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando como agente de selección el antibiótico higromicina.

CONCLUSIONES

Se logró la obtención de plantas transgénicas de papa cv. Spunta resistentes al antibiótico higromicina. Se logró establecer un protocolo de transformación reproducible que puede ser aplicado, como primer acercamiento, en otros cultivares de interés económico y agronómico en Argentina, sobre los cuales no existen reportes de protocolos de transformación. Para cada caso se deberá estudiar la respuesta de cada cultivar al método desarrollado para Spunta.

Finalmente, luego de realizar la curva de dosis respuesta con el agente de selección higromicina en plántulas de papa cv. Spunta se concluyó que las variables analizadas fueron adecuadas para determinar la sensibilidad al antibiótico y que la concentración de 8 mg L⁻¹ de higromicina, si bien permitió diferenciar plantas de papa cv. Spunta transgénicas de las plantas WT, no fue del todo suficiente y es necesario aumentar la dosis de este en los medios de cultivo. Las variables evaluadas “aparición de hojas nuevas”, “emergencia de raíces” y “crecimiento absoluto” son las más adecuadas para tener en cuenta al momento de seleccionar plantas transgénicas que utilicen el antibiótico higromicina como agente de selección.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Silvina Divito y a Cristina Cinalli por su asistencia técnica. Este trabajo fue financiado por el proyecto INTA PNBIO1131024 “Desarrollo de sistemas alternativos de generación y utilización de variabilidad genética y su aplicación al mejoramiento de los cultivos” y por el proyecto joven PICT 2011-0411 “Mutagénesis dirigida en papa mediante la tecnología de nucleasas *zinc-finger*”. MNG posee una beca doctoral de CONICET y LS una beca posdoctoral de CONICET.

BIBLIOGRAFÍA

- AHLOOWALIA, B.S. 1982. Plant regeneration from callus culture in potato. *Euphytica*, 31, 755-759.
- AHMED, H.A.; BARPETE, S.; AKDOGAN, G.; AYDIN, G.; SANKAT, C.; OZCAN, S. 2018. Efficient regeneration and mediated genetic transformation of potato (L.). *Feb-fresenius environmental bulletin*, 3020.
- AN, G.; COSTA, M.; HA, S. 1990. Nopaline Synthase Promoter 1s Wound Inducible and Auxin Inducible. *American Society of Plant Physiologists. The plant cell vol. 2*, 225-233.
- BAKHS, A. 2020. Development of efficient, reproducible and stable Agrobacterium-mediated genetic transformation of five potato cultivars. *Food Technology and Biotechnology*, 58(1), 57-63.
- BARPETE, S.; OGUZ, M.C.; ÖZCAN, S.F.; ANAYOL, E.; AHMED, H.A. 2015. Effect of temperature on germination, seed vigor index and seedling growth of five Turkish cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. *Fresen. Environ. Bull.* 24, 2561-2566.
- BETTANY, A.; DALTON, S.; TIMMS, E.; DHANOA, M.; MORRIS, P. 2002. Effect of selectable gene to reporter gene ratio on the frequency of co-transformation and co-expression of uidA and hpt transgenes in protoplast-derived plants of tall fescue. *Plant cell, tissue and organ culture*, 68(2), 177-186.
- BEAUJEAN, A.; SANGWAN, R.S.; LECARDONNEL, A.; SANGWAN-NORREEL, B.S. 1998. Agrobacterium-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. *Journal of experimental Botany*, 49(326), 1589-1595.
- BIRCH, R. 1997. PLANT TRANSFORMATION: Problems and Strategies for Practical. Application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:297-326.
- BIRCHLER, J. 2011. Plant Chromosome Engineering: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, vol. 701, DOI 10.1007/978-1-61737-957-4_1.
- BORNA, R.S.; HOQUE, M.I.; SARKER, R.H. 2010. Agrobacterium mediated genetic transformation for local cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.) using marker genes. *Plant Tiss Cult. Biotechno.* 20, 145-155.
- BRUCE, M.A.; SHOUP RUPP, J.L. 2019. Agrobacterium-Mediated Transformation of *Solanum tuberosum* L., Potato. En: KUMAR, S.; BARONE, P.; SMITH, M. (eds.). *Transgenic Plants. Methods in Molecular Biology*, vol 1864. Humana Press, New York, Nueva York.
- CAÑEDO, V.; CISNEROS, F. 2004. Clones de papa transformadas con la toxina de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) contra la polilla de la papa, *Phthorimea operculella* (Zeller). I. Transformación de clones de papa y verificación de la presencia del gen cry1A (b). *Revista Peruana de Entomología* 44:89-93.
- CAVATORTA, J.; PEREZ, K.; GRAY, S.; VAN ECK, J.; YEAM, I.; JAHN, M. 2011. Engineering virus resistance using a modified potato gene. *Plant biotechnology journal*, 9(9), 1014-1021.
- CHAKRABORTY, N.; CHAKRABORTY, P.; Sen, M.; BANDOPADHYAY, R. 2020. Choice of explant for plant genetic transformation. *Biolistic DNA Delivery in Plants*. Humana, Nueva York. 107-123 pp.
- CINGEL, A.; VINTERHALTER, B.; VINTERHALTER, D.; DRAGOSAVAC, D.A.; SMIGOCKI, A.; NINKOVI, S. 2010. Agrobacterium-mediated transformation of two Serbian potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. cv. Draga_evka and cv. Jelica). *Afr. J. Biotechno.* 9, 4644-4650.
- CRAZE, M.; BATES, R.; BOWDEN, S.; WALLINGTON, E.J. 2018. Highly Efficient Agrobacterium Mediated Transformation of Potato (*Solanum tuberosum*) and Production of Transgenic Microtubers. *Current protocols in plant biology*, 3(1), 33-41.
- DI RIENZO, J.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.; GONZÁLEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C. 2012. Programa Estadístico InfoStat. version 2012, para Windows, Grupo InfoStat. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- DOUCHES, D.S.; WESTEDT, A.L.; ZARKA, K.; SCHROETER, B.; GRAFIUS, E.J. 1998. Breeding, Cultivars, Rootstocks, & Germplasm Resources-Potato Transformation to Combine Natural and Engineered Resistance for Controlling Tuber Moth. *Hortscience*, 33(6), 1053-1056.
- FAO. Estadísticas. (Disponible: <http://www.fao.org/statistics/es/verificado:05deseptiembrede2017>).
- HALTERMAN, D.; GUENTHNER, J.; COLLINGE, S.; BUTLER, N.; DOUCHES, D. 2016. Biotech potatoes in the 21st century: 20 years since the first biotech potato. *American journal of potato research*, 93(1), 1-20.
- HAYMES, K. 1996. Mini-prep method suitable for plant breeding programs. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14: 280-284.
- HEERES, P.; SCHIPPERS, R.M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.G.F. 2002. Transformation of a large number of potato varieties: genotypedependent variation in efficiency and somaclonal variability. *Euphytica*. 124, 13-22.
- HUARTE, M.; CAPEZIO, S. 2013. Cultivo de papa. (Disponible: http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_huarte_capezio_papa2013.pdf verificado: agosto de 2017).
- IMBO, M.C.; BUDAMBULA, N.; MWEU, C.M.; MULI, J.K.; ANAMI, S.E. 2016. Genetic transformation of sweet potato for improved tolerance to stress: a review. *Advances in Life Science and Technology Vol. 49*
- KASHANI, K.; JAVARAN, M.J.; MOHEBODINI, M.; MOIENI, A.; SHEIKI, M.; ABAD, D. 2012. Regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of three potato cultivars (*Solanum tuberosum* cv. Désirée Agría and Marfona) by human proinsulin gene. *AJCS* 6(7):1212-1220.

- KHATUN, A.; HASAN, M.M.; BACHCHU, M.A.A.; MONIRUZ-ZAMAN, M.; NASIRUDDIN, K.M. 2012. Agrobacterium-mediated genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) var Cardinal and Heera. *The Agricult. Scientific J. Krishi Found.* 10, 81-86.
- LAGUNES, F.E. 2009. Transformación genética de ajo (*Allium sativum* L.) mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Transformación genética de ajo (*Allium sativum* L.) mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis, Magister en Recursos Genéticos y Productividad, mención en Ciencias. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 95 p.
- LÓPEZ, A.; CHAPARRO, A. 2007. A system for transformation potato plants (*Solanum tuberosum* sp. andigena var. Pastusa suprema) mediated through *Agrobacterium tumefaciens*. *Agronomía Colombiana* 25(1):16-25.
- MASSON, J.; LANCELIN, D.; BELLINI, C.; LECERF, M.; GUERCHÉ, P.; PELLETIER, G. 1989. Selection of somatic hybrids between diploid clones of potato (*Solanum tuberosum* L.) transformed by direct gene transfer. *Theoretical and applied genetics*, 78(2), 153-159.
- M'HAMDI, M.; ROUVIERE, C.; ROJAS-BELTRAN, J.; DU JARDIN, P. 2003. 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.* 7 (3-4):183-188.
- MILLAM, S. 2007. Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Agrobacterium* Protocols Volume 2, 25-35.
- MONSERRAT, E.; MARFA, V.; MELÉ, E.; MESSENGUER, J. 2001. Study of different antibiotic combinations for use in the elimination of *Agrobacterium* with kanamycin selection in cRNAation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 65: 211-220. DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1010630726444>.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-497.
- NADAKUDUTI, S.S.; STARKER, C.G.; VOYTAS, D.F.; BUELL, C.R.; DOUCHES, D.S. 2019. Genome editing in potato with CRISPR/Cas9. In *Plant Genome Editing with CRISPR Systems*. Humana Press, Nueva York. 183-201 pp.
- OKADA, Y.; SAITO, A.; NISHIGUCHI, M.; KIMURA, T.; MORI, M.; HANADA, K.; MURATA, T. 2001. Virus resistance in transgenic sweetpotato [*Ipomoea batatas* L.(Lam)] expressing the coat protein gene of sweet potato feathery mottle virus. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(5), 743-751.
- ORBEGOZO, J.; ROMAN, M.; RIVERA, C. TOVAR, J.C., PÉREZ, W.; GAMBOA, S.; GHISLAIN, M. 2013. Agrotransformación y evaluación de la resistencia a *Phytophthora infestans* en *Solanum tuberosum* L. variedad Désirée. *Revista peruana de biología*, 20(3), 205-210.
- ORBEGOZO, J.; ROMAN, M.; RIVERA, C.; GAMBOA, S.; TOVAR, J.; FORBES, G.; GHISLAIN, M. 2016. Rpi-blb2 gene from *Solanum bulbocastanum* confers extreme resistance to late blight disease in potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 125(2), 269-281.
- PANDEY, S.; MISHRA, A.; PATEL, M.K.; JHA, B. 2013. An efficient method for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and plant regeneration in cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Applied biochemistry and biotechnology*, 171(1), 1-9.
- PLACKETT, A.; HUANG, L.; SANDERS, H.; LANGDALE, J. 2014. High-efficiency stable transformation of the model fern species *Ceratopteris richardii* via microparticle bombardment. *Plant physiology*, 165(1), 3-14.
- ROMÁN, M.L.; RIVERA, C.; ORBEGOZO, J.; SERNA, F.; GAMBOA, S.; PEREZ, W., GHISLAN, M. 2015. Resistencia a *Phytophthora infestans* linaje clonal EC-1 en *Solanum tuberosum* mediante la introducción del gen RB. *Revista peruana de biología*, 22(1), 63-70.
- ROMANO, A.; RAEMAKERS, K.; BERNARDI, J.; VISSER, R.; MOOIBROEK, H. 2003. Transgene organisation in potato after particle bombardment-mediated (co-) transformation using plasmids and gene cassettes. *Transgen. Res.* 12, 461-473.
- SUROV, T.; AVIV, D.; ALY, R.; JOEL, D.M., GOLDMAN-GUEZ, T.; GRESSEL, J. 1998. Generation of transgenic asulam-resistant potatoes to facilitate eradication of parasitic broomrapes (*Orobancha* spp.), with the sul gene as the selectable marker. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(1), 132-137.
- VAN DEN ELZEN, P.; TOWNSEND, J.; LEE, K.; BEDBROOK, J. 1985. A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Molecular Biology*, 5(5), 299-302.
- WATERER, D.; BENNING, N.T.; WU, G.; LUO, X.; LIU, X.; GUSTA, M.; GUSTA, L.V. 2010. Evaluation of abiotic stress tolerance of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* cv. Desiree). *Molecular breeding*, 25(3), 527-540.
- WENDT, T.; HOLM, P.; STARKER, C.; CHRISTIAN, M.; VOYTAS, D.; BRINCH-PEDERSEN, H.; HOLME, I. 2013. TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant molecular biology*, 83(3), 279-285.