

TRANSFORMACION GENETICA DE YUCA (*Manihot esculenta* Crantz) CON EL GEN *cry1Ab* PARA RESISTENCIA A INSECTOS.

Y.J. Ladino¹, L.I. Mancilla¹, D. López¹, M. Echeverry¹, P. Chavarriaga¹, J. Tohme¹ y W.M. Roca²



¹Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, A.A 6713, Cali Colombia
²Centro Internacional de la Papa, A.A 1558, Lima 12, Perú

INTRODUCCION

El rendimiento del cultivo de la yuca está afectado por plagas como el barrenador del tallo (*Chilomena Clarkei* Amsel, Lepidóptero) y el gusano cachón (*Erinnyis ello*, Lepidóptero) entre otras. El uso de variedades transgénicas resistentes a insectos, conjuntamente con el manejo integrado de plagas y la producción de semilla certificada, son herramientas que se están desarrollando en el CIAT para aumentar la productividad del cultivo. Actualmente se trabaja en transformación genética de yuca para introducir un gen de *Bacillus thuringiensis* (*cry1Ab*), mediante *Agrobacterium tumefaciens*. El trabajo que se describe a continuación resume los principales logros en la obtención de plantas transgénicas, de una variedad modelo, que servirá como referencia para obtener variedades transgénicas de interés comercial.

METODOLOGIA

Las plantas transgénicas fueron obtenidas a partir de callo embriogénico friable (CEF) de la variedad modelo TMS 60444 (Taylor et al, 1996). Para obtener este tejido se utilizaron los medios de inducción GD (Gresshoff y Doy, 1974) y SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) suplementados con Picloram y sacarosa. Para el proceso de transformación se utilizaron las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 y LBA4404. Se usó el plásmido pBIGCry con el gen *cry1Ab* y los genes marcadores *gus*-intrón y *nptII* (Figura 1). El CEF transgénico fue seleccionado con Paramomicina (Pm)25µM y Geneticina (Gna) 20 y 50mg/l. Los embriones transgénicos fueron convertidos a plantas de acuerdo al esquema presentado en la Tabla 1. Finalmente las plantas obtenidas fueron llevadas al invernadero de bioseguridad (Figura 2).

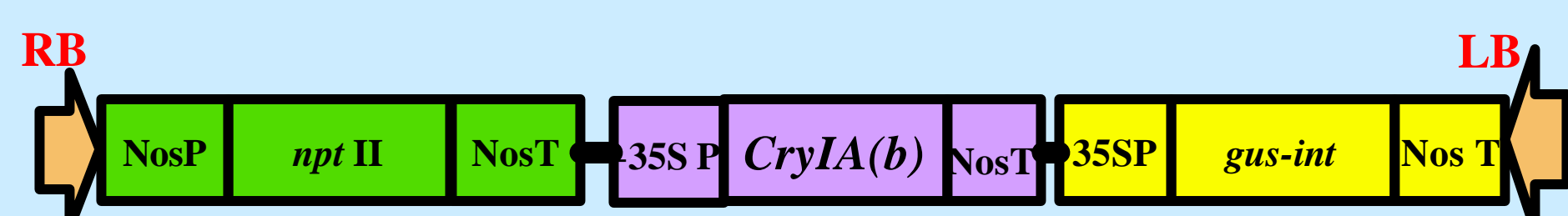


Figura 1. Plásmido pBIGCry con dos genes marcadores y el gen de interés *cry1Ab*.

RESULTADOS

Se establecieron cuatro líneas de plantas transgénicas (55, 80, 92 y 27).

De 158 grupos de CEF inoculados con *Agrobacterium* C58C1-pBigCry y LBA4404 - pBIGCry, 20 dieron prueba de gus positiva (expresión transitoria). Estos 20 grupos fueron seleccionados con Gna (20mg/l) de los cuales cinco pasaron a selección con Gna (50mg/l). Finalmente se obtuvieron las líneas 55 y 80 (Figura 2), las cuales provenían de la inoculación con la cepa C58C1.

Para la obtención de la línea 92, se inocularon 200 grupos con la cepa C58C1 - pBIGCry. La prueba de gus (expresión transitoria) fue positiva y pasaron a ser seleccionados en Gna (7mg/l) y posteriormente a Gna (20mg/l). Nuevamente la prueba de gus fue positiva para un sólo grupo del cual se obtuvo la línea 92 (Figura 2).

Al igual que la línea 92, para la obtención de la línea 27 se inocularon igual número de grupos de CEF con las cepas C58C1-pBigCry y LBA4404 -pBIGCry. La prueba de gus (expresión transitoria) fue positiva para los grupos inoculados con la primera más no con la segunda cepa. Sin embargo todos los grupos pasaron a selección con Par (25 µM) y Gna (20mg/l). La mayoría de los grupos no sobrevivieron a la selección, aunque un pequeño grupo, que había sido inoculado con la cepa LBA4404, pudo ser transferido al medio de maduración de donde se regeneró la línea 27.

Cabe anotar que tanto la línea 80 como la 27, no tuvieron expresión transitoria positiva, pero pasaron por todo el proceso de selección. En el cuadro anexo se puede observar en detalle la obtención de las cuatro líneas:

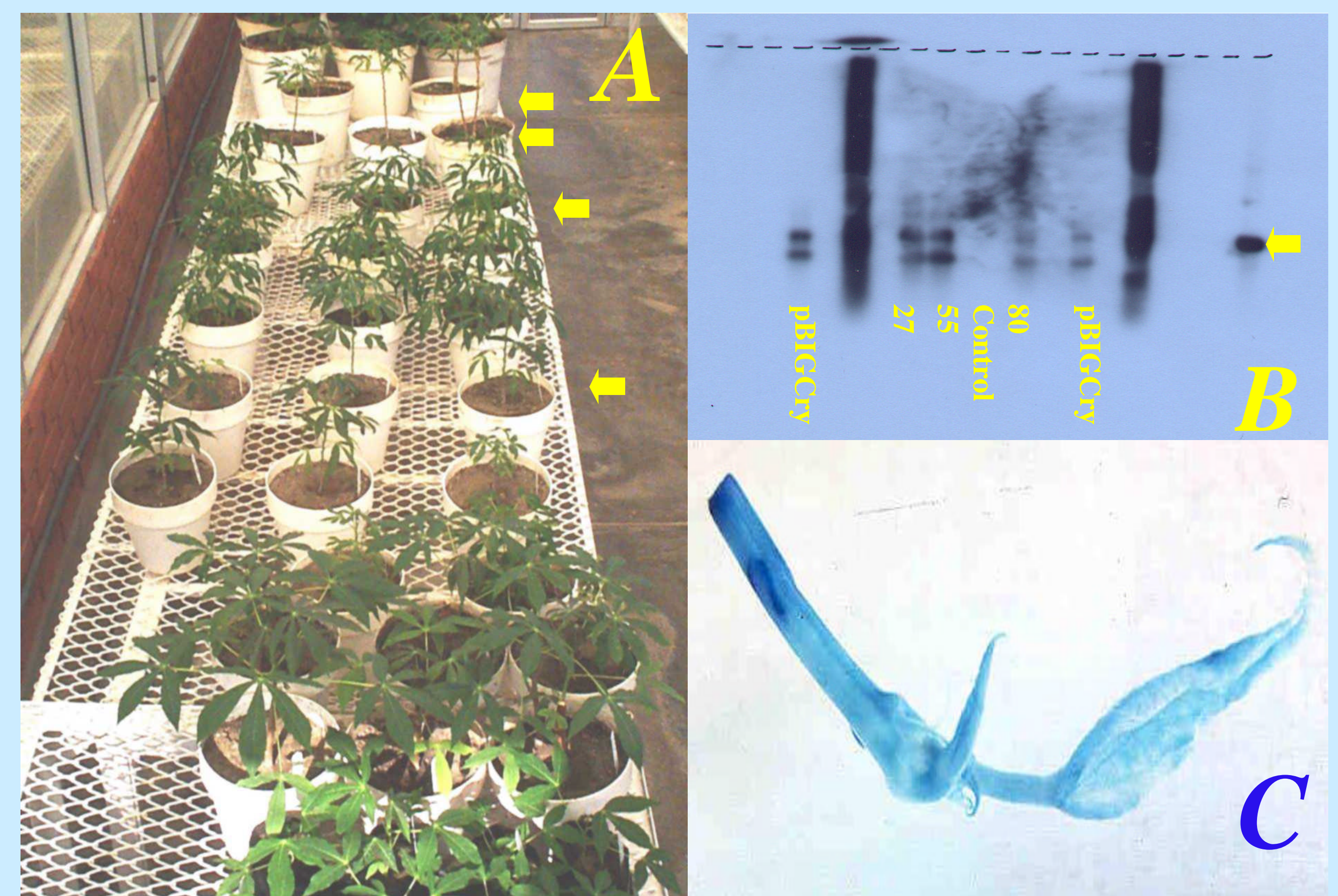


Figura 2. (A) Plantas transgénicas de las líneas 27, 80, 92 y 55 (flechas) en invernadero de bioseguridad (B) Southern de productos de PCR para el gen *cry1Ab* (flecha) (C) Línea 92 expresando el gen gus.

LÍNEAS TRANSGENICAS	FASE DE ELIMINACION	FASE DE SELECCION	FASE DE MADURACION	FASE DE REGENERACION
55-80	SH+Cf (500mg/l) 10 días.	GD2-50pi+Par 25µM 45 días. GD2-50pi+Gna 20mg/l 30 días. GD2-50pi+Gna 50mg/l 30 días.	MS2-1µm ANA 30 días. MS2-C.A (0.5%) 30 días.	RITAS MS2- ANA (0.01mg/l)-BAP (0.1mg/l)-GA ₃ (1mg/l) 28 días. MS2- GA ₃ (0.2mg/l) 61-84 días.
92	SH+Cf (500mg/l) 10 días.	GD2-50pi+Gna 7mg/l 15 días. GD2-50pi+Gna 20mg/l 60 días.	MS2-1µm ANA- 0.5mg/l BAP. 60 días. MS2-C.A (0.5%) 30 días.	MS -17N 45 días.
27	SH+Cf (500mg/l) 10 días.	GD2-50pi+Par 25µM 60 días. GD2-50pi+Gna 20mg/l 150 días.	MS2-C.A (0.5%) 150 días.	MS -17N 45 días.

Tabla 1. Historial de las líneas transgénicas (columna uno) de yuca, transformadas con el pBIGCry. Las columnas dos a cuatro indican los tiempos y medios usados en cada fase de la transformación y regeneración.

La prueba de Southern de productos de PCR del gen *cry* confirmó la presencia del gen en las líneas 55,80 y 27 (Figura 2). Aún hay que confirmar la línea 92, aunque también expresa el gen gus intensamente en hojas, tallos (Figura 2) y raíces.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- Plantas transgénicas de yuca, usando *Agrobacterium*, pueden ser producidas en aproximadamente 11 meses.
- Se están realizando bioensayos con el gusano cachón para determinar la efectividad de la protección a insectos.
- Actualmente se están transformando variedades como Ica Negrita (CM3306-4), SM1219-9 y Venezolana (MCol2215), materiales de importancia económica seleccionados por los agricultores de la costa norte de Colombia.
- Es importante mejorar la eficiencia de transformación que oscila entre 0,5 y 10% a nivel de CEF, pero puede ser el 100% a nivel de planta. Para esto se ha implementado el método de regeneración usando RITA® y se está trabajando con selección positiva (gen *pmi* para manosa).

REFERENCIAS

Gresshoff P, Doy C (1974) Z pflanzenphysiol 73:132–141
Schenk R, Hildebrandt A (1972) Can J Bot 50: 199-204
Taylor et al (1996) Nature Biotechnol 14: 726-730