

Líneas colombianas de papa genéticamente modificadas resistentes a *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) bajo campo confinado

Colombian genetically modified potato lines resistant to *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) under a confined field

DIEGO VILLANUEVA^{1,2}, JAVIER TORRES¹, HUGO RIVERA³, VÍCTOR NÚÑEZ³,
RAFAEL ARANGO^{1,4} y FERNANDO ÁNGEL^{1,5}

Resumen: *Tecia solanivora* es una de las plagas más perjudiciales en el cultivo de la papa en Centro y Suramérica. En este trabajo ocho líneas de papa genéticamente modificadas (GM) con el gen *cry1Ac* derivado de *Bacillus thuringiensis* (líneas de papa Bt) fueron caracterizadas a nivel molecular, inmunológico y biológico bajo condiciones confinadas de bioseguridad en condiciones de laboratorio, invernadero y campo experimental e igualmente se realizaron pruebas preliminares de equivalencia sustancial. Tanto el gen como la proteína Cry1Ac fueron detectados y cuantificados en hojas y tubérculos. Las líneas de papa Bt DC 40.5, DC 40.7A, DC 40.7B, PP 28, PP 28.1 y PP 40.A, fueron resistentes al ser expuestas al ataque de *Tecia solanivora*. Los resultados obtenidos, indican que dos líneas de papa GM son promisorias para continuar con pruebas de evaluación y selección para una posible comercialización futura.

Palabras clave: Polilla guatemalteca. *cry1Ac*. Plantas transgénicas. *Solanum tuberosum*.

Abstract: *Tecia solanivora* is one of the most damaging pest of potato crops in Central and South America. Eight genetically modified (GM) potato lines with *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene (Bt potato lines) were characterized at molecular, immunological and biological level under biosafety confined, greenhouse and experimental field conditions. Additionally, preliminary assays regarding substantial equivalence were determined. Cry1Ac protein and gene were detected and quantified on leaf and tubers. DC 40.5, DC 40.7A, DC 40.7B, PP 28, PP 28.1 and PP 40.A, Bt potato lines were resistant to *Tecia solanivora* when they were exposed. Results obtained indicated that two GM potato lines are promising for further assessments and selection tests as well as future possible commercialization.

Key words: Guatemalan moth. *cry1Ac*. Transgenic plants. *Solanum tuberosum*.

Introducción

Tecia solanivora (Povolny, 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae) es un insecto plaga de hábito monófago que ataca tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en campo y almacenamiento, ocasionando pérdidas que oscilan entre el 50 y el 100% de la producción del cultivo (MacLeod 2005). Esta especie se reportó por primera vez en Guatemala y fue accidentalmente introducida a Costa Rica, Venezuela, Colombia, Ecuador y finalmente a las Islas Canarias. Debido a su capacidad invasiva y al daño que ocasiona en el cultivo de papa, *T. solanivora* se considera como la plaga entomológica más dañina que afecta este cultivo en Centro y Sur América (Puillandre *et al.* 2008; Torres-Leguizamon *et al.* 2009).

El principal método de control de esta plaga se realiza mediante insecticidas químicos con un promedio de 12 a 15 aplicaciones por período de cultivo (MacLeod 2005). Esta práctica además de incrementar el costo de producción del mismo, genera resistencia en las poblaciones de la plaga, produce problemas en la salud humana y ocasiona un impacto negativo sobre el ambiente (Konstantinou *et al.* 2006; Dominguez *et al.* 2009). Teniendo en cuenta que las larvas

de *T. solanivora* son las que se alimentan, y lo hacen exclusivamente de los tubérculos de la papa (Sandoval y Vilatuña 1998), cualquier estrategia que implique aplicaciones externas estará limitada para acceder al contacto con la plaga, lo que implica la búsqueda de nuevas alternativas de control más eficientes.

El desarrollo de plantas genéticamente modificadas que expresan proteínas insecticidas derivadas de *Bacillus thuringiensis* se considera una alternativa eficiente para controlar este tipo de plagas (Schnepf *et al.* 1998; Sansinenea *et al.* 2000; Villanueva *et al.* 2009). Esta tecnología ya ha sido previamente usada en otros cultivos a nivel mundial desde 1996 (James 2012). Diferentes grupos de investigación han escogido a la papa (*Solanum tuberosum*) como cultivo objeto de investigaciones en ingeniería genética con el fin de introducirle características adicionales. Se ha generado variedades de papa transformadas genéticamente resistentes al virus del enrollamiento de la hoja (Kawchuk *et al.* 1991) al virus X (Jongedijk *et al.* 1992; Truve *et al.* 1993) y Y de la papa (Farinelli *et al.* 1994; Yan-ru *et al.* 1996). También existen trabajos en variedades como Désirée que confiere resistencia a nematodo *Globodera pallida* (Urwin *et al.* 2001) y contra

¹ Unidad de Biotecnología Vegetal CIB-UNALMED, Corporación para Investigaciones Biológicas, Cra 72A No 78B-141. Medellín, Colombia. M. Sc. Biotecnología. ² Actual filiación: Biología, Universidad EAFIT, Carrera 49 No. 7 Sur - 50, Medellín, Colombia. dvillanu@eafit.edu.co. Autor para correspondencia. ³ Corpoica, C.I. Tibaitatá, Km 14 Vía Mosquera, Cundinamarca, Colombia. H. Rivera: Ingeniero Agrónomo. V. Núñez: Magister en Fitomejoramiento y Genética de Plantas. ⁴ Ph. D. en Biología Molecular de Plantas. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Autopista norte Cra 64 Cll 65, Medellín, Antioquia. Colombia. ⁵ Ph. D. Biología Molecular. Actual filiación: Corporación BIOTEC, sede CIAT. Vía Cali - Palmira, Km 17. Colombia.

lepidópteros como *Phthorimaea operculella* usando genes *cryIAc* (Davidson *et al.* 2002; Davidson *et al.* 2006). Recientemente se ha obtenido una papa conocida con el nombre de Amflora, la cual posee un almidón con alto contenido de amilopectina, ideal para uso industrial (BASF 2011). Todas estas investigaciones han incluido pruebas de campo bajo condiciones de bioseguridad con el fin de evaluar los productos generados en el laboratorio.

Investigaciones del grupo de Biotecnología Vegetal CIB-UNALMED de la Corporación para Investigaciones Biológicas desarrollaron líneas de variedades comerciales de *S. tuberosum* subsp. *andigena* transformadas con el gen *cryIAc* de *B. thuringiensis*, para el control de *T. solanivora*, con resultados promisorios a nivel de laboratorio (Valderrama *et al.* 2007). En el presente estudio se reporta la caracterización molecular, inmunológica, biológica y pruebas preliminares de equivalencia sustancial (comparación de la composición química y propiedades organolépticas de la contraparte convencional no GM con las GM) de las líneas de papa GM que presentaron la mejor respuesta de resistencia al insecto en condiciones de laboratorio. El estudio se realizó bajo condiciones confinadas de invernadero de bioseguridad y campo. Hasta donde se conoce, es la primera vez que en Colombia se realiza este tipo de estudios con papa GM a nivel de invernadero de bioseguridad y campo confinado. Se identificaron dos líneas de papa GM promisorias por su alto nivel de resistencia frente de la plaga, para continuar con los procesos de evaluación hacia su posible comercialización.

Materiales y métodos

Material vegetal. Líneas de papa desarrolladas por el grupo de Biotecnología Vegetal CIB-UNALMED de la Corporación para Investigaciones Biológicas, DC 40.5, DC 40.7A, DC 40.7B, DC 40.72 derivadas de la variedad Diacol Capiro *S. tuberosum* subsp. *andigena* y las líneas PP 28, PP 28.1, PP 40.A, PP 40.3 derivadas de la variedad Parda Pastusa *S. tuberosum* subsp. *andigena*, transformadas con el gen *cryIAc* de *B. thuringiensis*, fueron seleccionadas para este estudio por presentar la mejor respuesta biológica frente al ataque de larvas de *T. solanivora* a nivel de laboratorio (Valderrama *et al.* 2007). Estas líneas de papa GM fueron desarrolladas antes de 2006 y fueron mantenidas *in vitro*, de donde fueron obtenidas para los ensayos realizados en este estudio entre 2007 y 2011.

Individuos de *Tecia solanivora*. Larvas, pupas, adultos y huevos de *Tecia solanivora* fueron obtenidos de una colonia establecida a partir de tubérculos infestados en almacenamiento en el municipio de Soráca (Boyacá, Colombia) y mantenida en el laboratorio de Entomología de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) Centro de Investigación Tibaitatá usando la metodología establecida por Londoño y Montoya (1994).

Evaluación molecular del material vegetal. A partir de tejido foliar *in vitro* de las plantas genéticamente modificadas de papa, se extrajo ADN genómico siguiendo el método reportado por Doyle y Doyle (1990). Para la identificación del gen *cryIAc* en las plantas transformadas, se realizaron reacciones de PCR empleando los primers CRYC1 (5'-ATCTTACCTCAGCGTGCTT-3') y CRYC2 (5'-GGCACATTGTTGTTCTGTGG-3'), que amplifican una región del gen *cryIAc* correspondiente a un fragmento de 766 pb (Valderrama *et al.*

2007). Se utilizó una muestra de 200 ng de ADN genómico, mezclado con una solución que contenía cada cebador a una concentración 0.4 μ M, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 unidades de Taq polimerasa (Fermentas, California U.S.A), 1X de solución tampón de PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3) y 1.5 mM de MgCl₂. Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador iCycler (Bio-Rad, CA, EEUU), mediante las siguientes condiciones: un paso inicial de 94 °C por 3 min; 25 ciclos de amplificación de 1 min de denaturación a 94 °C, 1 min de alineamiento a 52 °C y 1 min de extensión a 72 °C; seguido de un ciclo extra de extensión de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (1 μ g/ml) usando solución tampón 0.5X Tris-borato EDTA y visualizados en un UV transiluminador (Fotodyne Inc., Harband, WI, EEUU). Para determinar el número de copias del gen *cryIAc* integrado en las plantas genéticamente modificadas, se realizó un análisis de PCR en Tiempo Real en un LightCycler® 2.0 Real-Time PCR System (Roche Applied Science, Germany) y analizados en un LightCycler Software 4.0 (Roche, Maine, Germany). En un volumen final de 20 μ l se adicionaron 4 μ l de LC FastStar DNA Master Plus SYBR Green (Roche, Maine, Germany), 0.4 μ M de cada cebador CryIACReal Time (sentido 5'-CGCCGCTCCACAACAACGTA-3' y antisentido 5'-TCCTTGCCCTGGGTGGCACAT-3') que amplifican una región de 211 pb del gen *cryIAc*, y 50 ng de ADN del material vegetal. El programa de amplificación incluyó un paso inicial de 95 °C por 10 min; 40 ciclos de cuantificación de 10 s a 95 °C, 10 s a 58 °C y 10 s a 72 °C. Finalmente, el programa incluyó una curva con un incremento de temperatura de 45 °C a 95 °C en 0.1 °C. Para la cuantificación se usó el método comparativo C_T (2^{- Δ ACT}) (Livak y Schmittgen 2001; Beltrán *et al.* 2009). Las curvas fueron generadas usando el gen referencia endógeno de una sola copia *Nitrato reductasa* (Harris *et al.* 2000) amplificado con los cebadores NitRed (sentido 5' TGAATGTGTGCAAGCCTCACAAG 3' y antisentido 5' ATGTCCATGGACTATGATCCAAG 3') que amplifican una región de 230 pb del gen, y diluciones seriadas en 10X con cantidades finales de 500, 50, 5 y 0,5 ng de ADN genómico de las plantas genéticamente modificadas de papa, cada uno con tres réplicas más un control negativo (sin ADN). Como muestra calibrador se tomó la línea DC 40.5, la cual se conoce que posee una sola copia del transgen *cryIAc* (Valderrama *et al.* 2007).

Evaluación inmunológica del material vegetal. A partir de hojas y tubérculos de las plantas de papa GM establecidas *in vitro*, a nivel de invernadero de bioseguridad y en parcelas experimentales en campo confinado se detectó y cuantificó la proteína CryIAC, mediante una "Double Antibody Sandwich-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (DAS-ELISA) usando un Bt-CryIAb/IAC kit (Agdia, Inc., Mishawaka, Indiana, EEUU). Cada uno de los ensayos se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante a partir de 100 mg de tejido. La densidad óptica a 450 nm de la placa fue medida en un lector de ELISA (Bio-Rad, Hércules, CA, EEUU). La cantidad de la proteína CryIAC expresada en las plantas de papa fue cuantificada usando una curva estándar con 0,7, 1,4, 2,1, 2,8 y 3,5 ng/ μ l de proteína CryIAC suministrada como control positivo en el kit comercial.

Establecimiento de material vegetal a nivel de invernadero de bioseguridad. El establecimiento de las plantas de

papa bajo condiciones de invernadero, se hizo siguiendo las condiciones publicadas por Torres *et al.* (2012). De esta forma, plantas *in vitro* de cinco semanas y con una altura de 8 cm de cada línea de papa GM y sus respectivos controles no modificados fueron lavadas con agua para retirar los residuos del medio de cultivo y sembradas en invernadero de bioseguridad, usando un sustrato inerte constituido de escoria de carbón y cascarilla de arroz quemada en proporción 15/10, respectivamente, a una distancia entre plantas de 15 cm. Las plantas fueron cubiertas con vasos plásticos transparentes y regadas con agua dos veces diarias durante 15 días para formar una cámara húmeda y posteriormente fertilizadas con una solución constituida por elementos mayores (nitrato de potasio 52 g, nitrato de amonio 15.6 g, superfosfato triple 20.8 g) y elementos menores (sulfato de magnesio 6,864 g, sulfato de potasio 3,74 g, sulfato de hierro 0,537 g, sulfato de manganeso 0,624 g, ácido bórico 0,03744 g, sulfato de zinc 0,215 g, sulfato de cobre 0,0173 g, y molibdato de amonio 0,0173 g). Después de tres aporques y cinco meses de crecimiento de las plantas, se cosecharon los tubérculos para ser repartidos en tres grupos: el primer grupo fue destinado a evaluaciones en bioensayos; el segundo grupo para ser almacenados bajo condiciones de bodega durante seis meses y posteriormente evaluados en bioensayos; y el tercer grupo para entrar en el proceso de maduración y posterior siembra en condiciones de campo experimental.

Evaluación biológica del material vegetal establecido a nivel de invernadero de bioseguridad. El primer y segundo grupo de tubérculos cosechados en invernadero de bioseguridad fueron evaluados en el laboratorio de Entomología de Corpoica C.I. Tibaitatá (20 ± 2 °C; HR $70 \pm 2\%$) y en el laboratorio de Biotecnología Vegetal CIB-UNALMED, a una temperatura de 22 ± 2 °C y HR de $75 \pm 2\%$. Los bioensayos se realizaron en experimentos de no elección, donde la larva es obligada a comer el alimento suministrado o morir por inanición. Cada experimento se realizó con un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones por cada tratamiento. Cada unidad experimental estuvo compuesta por un vaso de poliestireno recubierto en su interior con papel craft, con el propósito de eliminar la estática de larvas de *T. solanivora* hacia el poliestireno. En el fondo del vaso fue puesto un aro de tubo polivinilcloruro (pvc) que sirvió de soporte a los tubérculos evaluados. En cada unidad experimental, se colocaron sobre el tubérculo 10 larvas de primer instar de *T. solanivora*. La unidad experimental fue sellada con la tapa del vaso de poliestireno que en el centro tenía un orificio cubierto con poliéster para permitir la aireación dentro del vaso. A los 35 días del montaje del experimento se evaluó el número de individuos desarrollados (larvas, pupas y adultos), incidencia del daño (número de tubérculos afectados) y severidad del daño, medida dividiendo los tubérculos afectados en cuatro porciones (cada una equivalente al 25%) y dependiendo del número de porciones afectadas se asignó un porcentaje de daño de 0, 25, 50, 75 ó 100%. De igual forma, se estableció un nivel de resistencia teniendo en cuenta el número de evaluaciones realizadas con cada tratamiento y la respuesta obtenida para cada una. Los datos fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple de Tukey mediante el paquete estadístico SAS® versión 9.1.3.

Establecimiento de material vegetal a nivel de campo experimental. Las líneas de papa genéticamente modificadas que presentaron las mejores características después de las evaluaciones moleculares, inmunológicas y biológicas, fueron seleccionadas para ser evaluadas en campo confinado, en un lote de 1600 m² ubicado en el campo experimental de Corpoica C.I. sede La Selva, en Rionegro Antioquia, a 2120 msnm ($6^{\circ}07'44,50''N$ $72^{\circ}24'50,70''O$), precipitación promedio anual entre 1.800 y 2.500 mm y una temperatura media de 17 °C. Fue escogido por no contar en su momento con cultivos de papa comercial a menos de 10 km a la redonda. El lote fue adecuado mediante el establecimiento de una barrera física (malla aérea anti-aves y lona verde como protección lateral) y una barrera biológica viva (plantas de maíz *Zea mays*, entre 2 y 3 m de alto). Se planteó un experimento de libre elección bajo un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones por tratamiento. Cada repetición estaba compuesta de cuatro surcos de 10 m de largo, con una densidad de siembra de 30 cm entre plantas y 1 m entre surcos para un total de 33 plantas de papa por surco y 132 plantas por repetición. La distancia de siembra entre tratamientos y bloques fue de 2 m. La distribución de las parcelas se realizó por sorteo en el momento de la siembra. El material vegetal fue cosechado a los 120 días después de la siembra.

Evaluación biológica del material vegetal establecido a nivel de campo experimental. Las plantas GM de papa establecidas en campo confinado, después de 56 días de sembrado el material y con una frecuencia semanal hasta alcanzar los 120 días de cultivo, fueron expuestas a liberaciones de la plaga con una densidad de tres parejas/m² de adultos de *T. solanivora*. La resistencia o susceptibilidad de los tubérculos cosechados ante el ataque de la plaga fue medida teniendo en cuenta los individuos desarrollados, la incidencia de la plaga y la severidad del daño detallado anteriormente.

Estudios preliminares de equivalencia sustancial. Los tubérculos obtenidos de las plantas GM fueron evaluados con su contra parte convencional (no GM), para determinar si existen posibles diferencias en cuanto a la composición química y propiedades organolépticas. De manera adicional, las propiedades mencionadas fueron evaluadas bajo presión de infección de un fitopatógeno, tratando de evidenciar la alteración de los componentes del tubérculo ante un evento de estrés. Tubérculos de cada tratamiento fueron rebanados, depositados en cajas de vidrio y divididos en dos grupos: infectadas y no infectadas. Las muestras infectadas se llevaron a luz ultravioleta por 10 minutos para estimular la respuesta de defensa y posteriormente incubadas a 26 °C durante dos días. Pasado este tiempo se infectaron con *Fusarium oxysporum* y se incubaron por tres días a 25 °C. Se liofilizó y el producto se lavó con porciones de metanol. La solución de metanol se sometió a evaporación asistida por vacío, obteniéndose el extracto crudo, que fue equilibrado a 2.000 ppm. De cada producto, 20 µl fueron fraccionados usando cromatografía líquida de alta eficiencia en modo preparativo (HPLC-P), empleando una fase estacionaria C18 empacada en una columna de 150 x 2 mm y una fase móvil con un gradiente de metanol desde 20 a 100% hasta los 10 minutos y finalmente, 100% metanol hasta los 15 minutos. Se usó detección UV mediante un detector DAD (Diode Array Detector) a longitudes de onda de 210, 230, 254 y 280 nm. Adicional a la evaluación

cromatográfica, después de la evaluación molecular, inmunológica y biológica en los distintos estados, las dos líneas GM seleccionadas como las más promisorias fueron evaluadas bromatológicamente tomando 100 g de tubérculos cosechados determinando la humedad y materia volátil, sólidos totales, proteína, grasa total, cenizas, carbohidratos totales y calorías. Las técnicas empleadas fueron: secado con estufa, cálculos por diferencia, Kjeldahl, hidrólisis ácida, calcinación, determinación indirecta factor Atwater (Bernal 1994).

Resultados

Evaluación molecular. De las 10 líneas de papa evaluadas, en las ocho GM se amplificó un fragmento de 766 pb, resultado que confirmó la presencia del gen *cry1Ac* en el genoma de las plantas. El control de plantas no transformadas no mostró amplificación de este fragmento. De las cuatro líneas GM de la variedad Parda Pastusa, en tres (PP28; PP 28.1 y PP 40.3) se calculó que poseen una sola copia del gen *cry1Ac* en su genoma, mientras que en la línea PP 40.A de esta misma variedad no se pudo distinguir si tenía 1 o 2 copias del transgen. De las cuatro líneas GM de la variedad Diacol Capiro, dos líneas (DC 40.7A y DC 40.7B) presentan entre 1 y 2 copias del transgen, la línea DC 40.72 presentó dos copias y la DC 40.5, presentó una sola copia (Tabla 1).

Evaluación inmunológica. En las plantas *in vitro* de cada línea GM de papa evaluada, se detectó la proteína Cry1Ac en niveles entre el 2 y el 5% en relación con el total de proteína presente en el tejido, en este caso hojas (Tabla 2). En contraste, las líneas no GM, no mostraron presencia de la proteína Cry1Ac. Las líneas DC 40.7a con un 4,87% y la línea PP 28 con un 5,03% fueron las líneas con la mayor expresión de proteína Cry1Ac. En las hojas de plantas establecidas en invernadero, se detectó la proteína Cry1Ac en niveles entre el 27 y 31%. sin diferencias significativas entre las líneas GM de la variedad Diacol Capiro. En la variedad Parda Pastusa, la línea GM que expresó la mayor cantidad de proteína Cry1Ac fue PP 40.A (31,51%) y la línea con menor porcentaje fue PP 28.1 con un 26,15%. Siete de las ocho líneas GM de las dos variedades fueron positivas para la presencia de la proteína Cry1Ac en los tubérculos cosechados en invernadero. Se encontró que la línea PP 40.3 expresó la proteína en hojas y no en tubérculos en las plantas a nivel de invernadero y campo, aún cuando se evidenció la presencia del transgen en ambos tejidos, mediante PCR. Las líneas con mayor cantidad de proteína Cry1Ac en tubérculos fueron DC 40.5 con 36,83% y la PP 28 con 30,02%. La línea DC 40.7B presentó niveles inferiores al 1% de proteína Cry1Ac en los tubérculos. De otro lado, tubérculos cosechados en invernadero y almacenados durante seis meses bajo condiciones de bodega (simulando

Tabla 1. Número estimado de copias del gen *cry1Ac* en las líneas de papa GM de las variedades Diacol Capiro (DC) y Parda Pastusa (PP), calculado por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ mediante PCR en tiempo real. C_T (n=3), C_T (+/-SD).

Línea	Gen	CT	Gen	CT	Número de copias
DC	<i>cry1Ac</i>		Nitred	26,84 +/-0,095	
DC 40.7A	<i>cry1Ac</i>	23,13+/-0,09	Nitred	26,84 +/-0,095	1 - 2
DC 40.7B	<i>cry1Ac</i>	23,18+/-0,05	Nitred	26,84 +/-0,095	1 - 2
DC 40.5	<i>cry1Ac</i>	23,46+/-0,02	Nitred	26,84 +/-0,095	1
DC 40.72	<i>cry1Ac</i>	22,66+/-0,06	Nitred	26,84 +/-0,095	2
PP	<i>cry1Ac</i>		Nitred	26,66 +/-0,08	
PP 28	<i>cry1Ac</i>	24,98+/-0,06	Nitred	26,66 +/-0,08	1
PP 28.1	<i>cry1Ac</i>	23,45+/-0,01	Nitred	26,66 +/-0,08	1
PP 40.A	<i>cry1Ac</i>	23,23+/-0,02	Nitred	26,66 +/-0,08	1 - 2
PP 40.3	<i>cry1Ac</i>	24,6+/-0,03	Nitred	26,66 +/-0,08	1

Tabla 2. Resumen de los datos obtenidos en diferentes evaluaciones realizadas a las líneas de papa GM y líneas de papa control, bajo condiciones de laboratorio (*in vitro*), invernadero, bodega y campo.

Línea	PCR 706 bp	Real Time PCR # Copias <i>cry1Ac</i>	Porcentaje proteína Cry1Ac (SD)				Tubérculos
			<i>in vitro</i> hojas	Invernadero hojas	Bodega tubérculos	Campo tubérculos	
DC	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
DC 40.5	(+)	1	2,72(+/-0,3)c	27,54(+/-0,2)a	36,83(+/-0,1)a	11,59 (+/-0,03)a	0,7(+/-0,13)a
DC 40.7A	(+)	1 a 2	4,87(+/-0,1)a	26,58(+/-0,1)a	1,552(+/-0,8)b	4,85(+/-0,06)b	
DC 40.7B	(+)	1 a 2	3,97(+/-0,12)b	26,36(+/-0,7)a	0,9(+/-0,1) b	4,52(+/-0,09)b	
DC 40.72	(+)	2	3,27(+/-0,13)ab	26,31(+/-0,09)a	26,13(+/-0,6)a	4,80(+/-0,05)b	0,3(+/-0,09)b
PP	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
PP 28	(+)	1	5,03(+/-0,08)a	31,27(+/-0,1)ab	30,02(+/-0,09)a	5,00(+/-0,03)b	0,6(+/-0,05)ab
PP 28.1	(+)	1	2,5(+/-0,1)b	26,15(+/-0,8)a	27,67(+/-0,05)b	5,65(+/-0,04)b	
PP 40.A	(+)	1 a 2	4,62(+/-0,13)a	31,51(+/-0,9)ab	28,48(+/-0,8)a	8,65(+/-0,13)a	0,7(+/-0,17)b
PP 40.3	(+)	1	2,12(+/-0,6)b	28,89(+/-0,3)ab	(-)	(-)	

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba significativa de Tukey ($P < 0,0001$).

el proceso de maduración que se realiza comercialmente en Colombia), dieron positivas para la proteína Cry1Ac con porcentajes entre el 4,5 y 11,6% en las líneas GM. Las líneas no GM y PP 40.3, siguieron siendo negativas a la detección de proteínas Cry1Ac. En los tubérculos cosechados en campo confinado, se detectó la proteína Cry1Ac en niveles muy bajos, con valores inferiores al 1% del total de proteína en el tejido de las líneas GM evaluadas (Tabla 2).

Establecimiento de las papas GM en invernadero de bioseguridad y campo experimental. De acuerdo con los resultados obtenidos en las evaluaciones moleculares, inmunológicas y biológicas, a nivel de laboratorio e invernadero de bioseguridad (Tablas 2 y 3), de las 8 líneas de papa GM, DC 40.5, DC 40.72, correspondientes a la variedad Diacol Capiro y a las líneas PP 40.A y PP 28, correspondientes a la variedad Parda Pastusa, fueron seleccionadas como promisorias para continuar siendo evaluadas en campo a nivel experimental, con sus respectivos controles no modificados genéticamente.

Al comparar la forma de los tubérculos de las líneas de papa GM y control no transformado cosechados en campo experimental, no se presentaron diferencias en la forma y las características de la piel y pulpa de los tubérculos. Los tubérculos fueron redondos en ambas variedades. La textura de la piel en todas las líneas fue lisa. Solamente se presentaron diferencias entre variedades en el color de la piel debido a que en la variedad Diacol Capiro se observó un color marrón claro y para la variedad Parda Pastusa el color predominó fue el marrón intenso con algunas manchas moradas. De igual forma, el color de la pulpa que predominó para todas las líneas de la variedad Diacol Capiro fue amarillo claro y para la variedad Parda Pastusa fue amarillo intermedio.

Evaluación biológica. Al exponer las líneas GM y las no GM a la presión de la plaga, el análisis estadístico mostró que hay diferencias altamente significativas entre los tratamientos ($P < 0.0001$). La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos de la prueba de comparación múltiple de Tukey ($\alpha = 0,05$), en los diferentes estados de la evaluación. Con los tubérculos recién cosechados de invernadero de bioseguridad se encontró que las líneas DC 40.5, DC 40.7A, DC 40.7B, DC40.72, PP 28, PP 28.1 y PP 40.A, son altamente resistentes al ataque de

la plaga en condiciones de altos niveles de infestación y que las líneas DC control, PP control y PP40.3 son altamente susceptibles al desarrollo biológico de la plaga. Los resultados obtenidos en los bioensayos con tubérculos almacenados por seis meses en condiciones de bodega, indicaron la presencia de diferencias altamente significativas entre tratamientos ($P < 0,0001$) y una clasificación de medias proveniente de la prueba de comparación múltiple de Tukey ($\alpha = 0,05$) (Tabla 3). Las líneas control DC, PP y la línea PP 40.3 presentaron individuos desarrollados de la plaga y la mayor incidencia y severidad con respecto a los demás tratamientos. En general se evidencia que todas las líneas de papa GM (excepto la PP40.3) son resistentes al desarrollo biológico de la plaga, debido a que no permitieron el desarrollo de ésta en condiciones de bodega. Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos en experimentos con tubérculos recién cosechados de invernadero.

La incidencia de la plaga en los tubérculos de las líneas de papa GM y control no modificadas cosechados en campo experimental (Fig. 1), fue en promedio no superior al 1,5%. Mientras que el promedio de tubérculos cosechados en los



Figura 1. Líneas de papa GM y control, con 120 días de cultivo bajo condiciones de campo experimental.

Tabla 3. Resumen de los bioensayos realizados con material vegetal obtenido de las líneas de papa GM y las líneas de papa control, bajo condiciones de cuarentena, casa de malla, bodega y campo.

Línea	Bioensayos								Resistencia	
	Incidencia				Severidad				Índice	Nivel
U. Cuarentena	Casa malla	Bodega	Campo	U. Cuarentena	Casa malla	Bodega	Campo			
DC	90a	32,03a	100a	0,89a	85 ^a	90,12a	100a	51,64a	1,57	AS
DC 40.5	0b	4,06b	10c	1,14a	0b	2,6b	2,5c	24,39b	4,78	R
DC 40.7A	10b	2,00b	60b		0b	35,4b	37,5cb		3,78	MR
DC 40.7B	10b	3,86b	55.5b		7,5b	6,60b	30,5cb		4	R
DC 40.72	20b	3,40b	70b	1,14a	12,5b	12,18b	50cb	54,06a	4	R
PP	80a	35,43a	100a	1,08a	80a	83,11a	90a	59,09a	1,28	AS
PP 28	0b	3,36b	0c	3,51b	0b	8,64b	0c	65,43a	4,78	R
PP 28.1	0b	0,96b	0c		0b	2,77b	0c		4,5	R
PP 40.A	0b	0,40b	30b	1,06a	0b	7,41b	16,5cb	36,50b	4,85	R
PP 40.3	100a	43,33a	90a		97,5a	87,22a	90a		1,35	AS

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba significativa de Tukey ($P < 0,0001$).

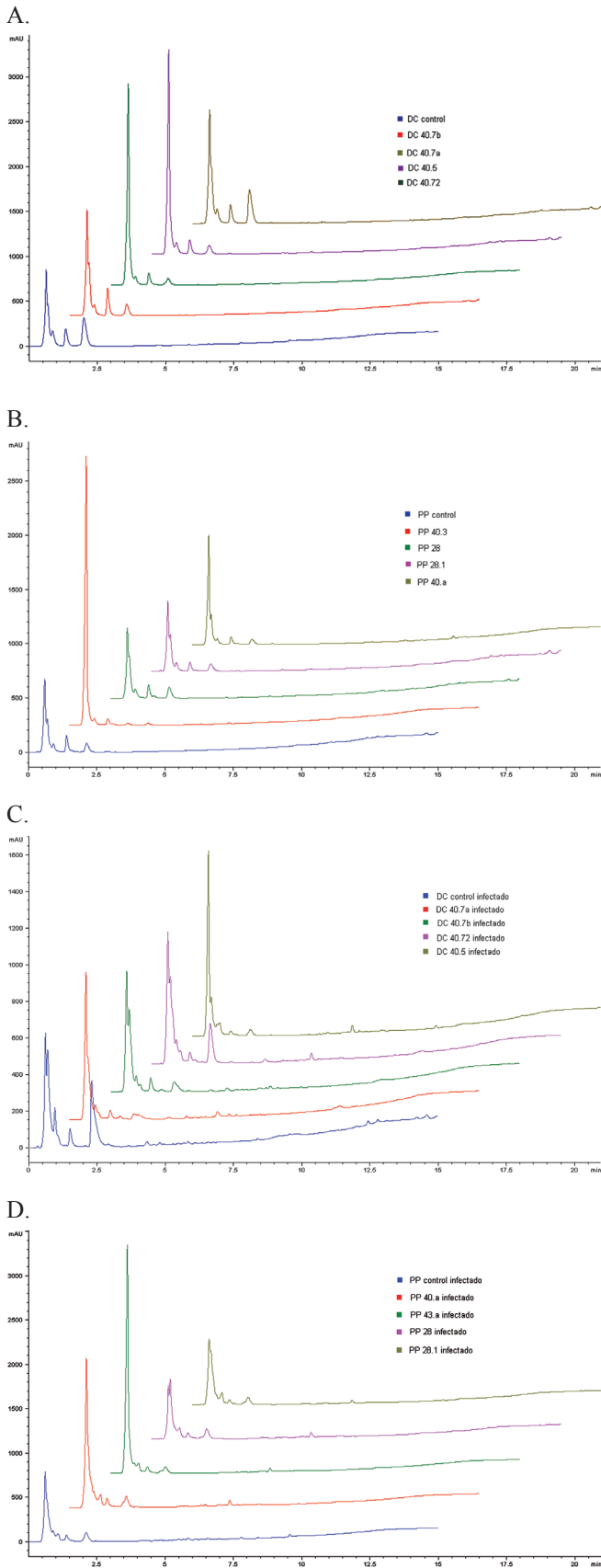


Figura 2. Cromatogramas superpuestos de los extractos obtenidos de las plantas GM y no GM de la variedad Diacol Capira **A.** Parda Pastusa **B.** DC infectados con *F. oxysporum* **C.** y PP infectados con *F. oxysporum* **D.** En todas las imágenes: eje “Y” intensidad de absorción (mAU), eje “X” tiempo de retención en minutos.

tratamientos evaluados estuvo por encima de 3000 (PP control estuvo cerca a 8000 tubérculos), la incidencia de daño más alta ocasionada por *T. solanivora* no superó los 200 tubérculos en ninguno de los tratamientos. Esta incidencia se observó de manera indiscriminada en las líneas control no modificadas genéticamente y las líneas de papa GM. Sin embargo, la severidad del daño indicó la presencia de diferencias altamente significativas entre tratamientos ($P < 0,0001$) y una clasificación de medias proveniente de la prueba de comparación múltiple de Tukey ($\alpha = 0,05$). Las líneas DC 40.5 y PP 40.A presentaron la menor severidad de daño con 24.39 y 36.5% respectivamente.

Evaluación de la equivalencia sustancial. Para el análisis de los resultados cromatográficos se eligió la longitud de onda 210 nm debido a que los componentes de la muestra absorbieron mejor el espectro U.V y los picos presentados fueron más homogéneos. Al superponer los cromatogramas para comparar los perfiles de los extractos infectados y los no infectados de las dos variedades de papa se observó alta similitud en el tiempo de retención y la absorbancia, mostrando picos análogos en las líneas GM de papa y su respectivo control no modificado, demostrando que no hay cambios significativos con y sin infección (respuesta inmune) (Fig. 2). Por otro lado, las líneas de papa PP40.A y DC40.5, encontradas como las más promisorias, fueron analizadas bromatológica-

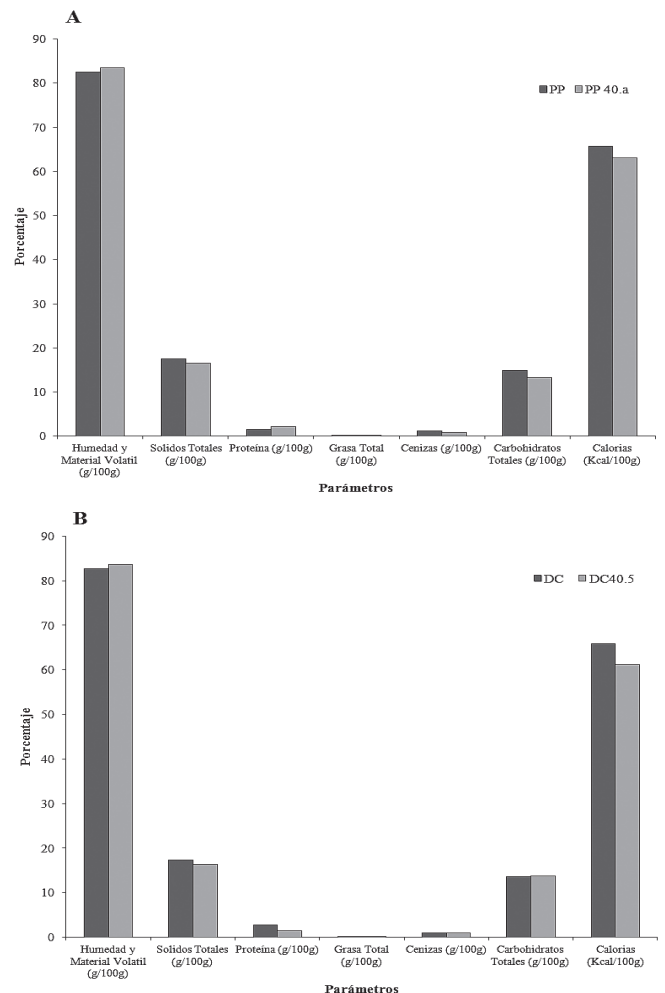


Figura 3. Análisis bromatológico **A)** de la línea PP40.A y su respectivo control no GM; **B)** de la línea DC40.5 y su respectivo control no GM.

mente. Las diferentes pruebas realizadas a los tubérculos GM demuestran que sus propiedades organolépticas son análogas a las del control en las dos variedades (Fig. 3).

Discusión

En este trabajo se evaluó molecular, inmunológica y biológicamente líneas de papa (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*) genéticamente modificadas con potencial de resistir al ataque de *Tecia solanivora* bajo condiciones confinadas (invernadero y campo), así como la equivalencia sustancial de las líneas más promisorias. Lo anterior con el objeto de incluir en el manejo integrado de plagas una estrategia de control eficiente para esta plaga, ya que se protegen los tejidos internos de la planta con acción específica para este insecto (Schnepf *et al.* 1998; Maagd *et al.* 1999; Sansinenea 2000), se conservan las propiedades organolépticas del tubérculo y de la planta en general. Adicionalmente la protección de la planta se presenta sin importar las condiciones climáticas y distribución ambiental, y durante todo la temporada de cultivo, haciendo que la población de insectos expuesta sea únicamente aquella que se alimenta de las plantas de papa.

De las 43 líneas de papa GM desarrolladas por Valderrama *et al.* (2007), se seleccionaron las ocho que presentaron la mejor respuesta biológica frente al ataque de larvas de *T. solanivora* a nivel de laboratorio. Sin embargo, después de conservarse y multiplicarse *in vitro* por varios años, fue importante determinar si éstas líneas aún contenían el gen de interés y más aún determinar el número de copias del transgen, ya que esto no fue realizado para las líneas seleccionadas en este estudio y es importante determinarlo. Múltiples integraciones pueden traer efectos que disminuyen o desestabilizan la expresión del gen foráneo, finalizando en el silenciamiento del gen (Flavell 1994; Vaucheret *et al.* 1998; Kondrák *et al.* 2006; Beltran *et al.* 2009). Esto significa que usualmente eventos de una sola copia o bajo número de copias son deseables.

La técnica PCR en tiempo real resultó ser una alternativa práctica y rápida para la cuantificación del número de copias del transgen en el genoma de las plantas de papa GM, una vez que se logró estandarizar las condiciones de la reacción. Contar con un gen calibrador adecuado, para éste caso el gen codificante de la enzima nitrato reductasa, de amplia distribución en plantas y que ha sido empleado para determinar el número de copias de transgenes en *S. tuberosum* (Harris *et al.* 2000), facilitó la práctica de la técnica, lo que permite en últimas estar en capacidad de ofrecer información de patrones de integración más complejos y más especificidad en los fragmentos, en comparación con el clásico Southern Blot. Los estudios que han comparado las técnicas de southern blot y PCR en tiempo real para determinar el número de copias de un transgen, han establecido diferencias entre una y otra técnica entre 14 y 100% de eficiencia y precisión, siendo más efectiva la PCR en tiempo real (Bubner y Baldwin 2004), debido a la subestimación del número de copias en el southern blot, relacionado con la inserción de más de una copia del T-ADN en el mismo lugar (en tándem), la pérdida de sitios de restricción y la generación de fragmentos de ADN de tamaño muy similar (Mason *et al.* 2001; Yang *et al.* 2005). Además la laboriosidad del método, necesidad de grandes cantidades de ADN, así como la dificultad de distinguir entre una verdadera copia de un transgen y un "background" de hibridación con el genoma de la planta (Mason *et al.* 2001).

El modelo usado en este estudio para determinar el número de copias del transgen en cada una de las líneas de papa, necesitó que las eficiencias de amplificación fueran tan similares como fuera posible para los genes evaluados. La eficiencia de las amplificaciones estuvieron muy cercanas a dos, un valor teórico que indica que el producto de PCR es duplicado en cada ciclo (Wilkening y Bader 2004). Para la variedad Diacol Capiro fue de 1,84, para la variedad Parda Pastusa fue de 1,911 y para el gen *nitrato reductasa* fue de 1,98, indicando esto condiciones óptimas de amplificación.

Las diferencias encontradas en la evaluación inmunológica de la proteína Cry1Ac de los tejidos en los diferentes estados de esta investigación (laboratorio, invernadero, bodega y campo), pueden deberse a que la expresión de la proteína es afectada por factores ambientales o genéticos. La construcción realizada por Valderrama *et al.* (2007) contenía los promotores constitutivos del virus del mosaico del coliflor 2X35S en las líneas genéticamente modificadas con código 40 y ubiquitina en las líneas con código 28, asociados a la región codificante del gen *cry1Ac*, por tanto se esperaba la expresión homogénea en todos los tejidos. Sin embargo, se encontró que la línea PP 40.3 expresó la proteína en hojas y no en tubérculos en las plantas a nivel de invernadero y campo, aún cuando se evidenció la presencia del transgen en ambos tejidos, mediante PCR. Es posible que se haya alterado la estabilidad del transgen en esta línea, debido a mutaciones, deleciones o rearrreglos en el ADN que alteran la estructura del transgen, por cambios epigenéticos que inhiben su transcripción o por procesos transcripcionales que afectan la estabilidad, procesamiento o transporte del ARN o de las proteínas codificadas por el transcrito, o posiblemente se pudo haber inhibido el promotor en los tubérculos debido a factores organoespecíficos (Meyer 1998; Hobbs *et al.* 1990, Maqbool *et al.* 1999; Gahakwa *et al.* 2000).

Por otra parte, encontrar que la concentración de la proteína Cry1Ac pasa en promedio de 5% en las plantas *in vitro* a 28% en las plantas establecidas a nivel de invernadero, da gran relevancia a los factores ambientales. Las condiciones ambientales de las plantas *in vitro* son completamente diferentes a las que se presentan bajo condiciones de invernadero y por lo tanto presentan como resultado respuestas bioquímicas y fisiológicas distintas. Las condiciones del sustrato, luz, nutrición, son completamente diferentes. El ambiente *in vitro*, con una alta humedad relativa, bajo o nulo intercambio gaseoso, escasez de CO₂ durante casi todo el período, producción de etileno y baja densidad del flujo de fotones fotosintéticos, induce perturbaciones en las plantas desarrolladas bajo esa condición. Después de transferir las plantas al ambiente *ex vitro*, las plantas tienen que corregir todas esas anomalías para aclimatizarse al nuevo ambiente, ya sea en invernadero o campo (Kadlecek *et al.* 2001). Al realizar un análisis comparativo de las concentraciones de proteína Cry1Ac, se puede presentar el trabajo realizado por Vanegas *et al.* (2010), quienes determinaron niveles de expresión de la proteína Cry1Ac de 45µg/g de tejido en plantas de papa *in vitro*, usando para ello una construcción genética similar. En esta investigación, las concentraciones aparentemente bajas *in vitro* (5% del nivel de proteína Cry1Ac) correspondían a 10µg/mg de tejido, lo cual claramente refleja una mayor nivel de expresión de la proteína Cry1Ac en las plantas de papa aquí utilizadas.

En condiciones normales, como preparación para ser sembradas en campo los tubérculos que se cosechan se dejan

en bodega para su maduración durante 120 días. En este estudio, los tubérculos cosechados en invernadero y almacenados en bodega para su maduración, fueron evaluados al día 180 (seis meses) para determinar la concentración de la proteína Cry1Ac, estableciendo si podría proteger por más tiempo al tubérculo cuando se enfrentara a un ataque de la plaga. Se encontró que la concentración de la proteína disminuyó en promedio de 28 a 10%, posiblemente por el deterioro que se presentó en los tubérculos. Sin embargo como se evidencia en las pruebas biológicas, esta concentración fue suficiente para que los tubérculos se protegieran frente al ataque de las larvas de *T. solanivora*.

Los diferentes bioensayos realizados en la unidad de cuarentena con los tubérculos recién cosechados de invernadero y aquellos almacenados en bodega durante seis meses, demostraron la acción directa de la expresión y acción de las proteínas Cry1Ac sobre el intestino de las larvas que consumieron algo de los tejidos evaluados procedentes de las plantas modificadas genéticamente. Larvas muertas con producto de la acción de una proteína Cry de Bt presentaron las características típicas de: “coloración del contenido del cuerpo marrón–negruzco según se va descomponiendo, cápsula del cuerpo un poco más alargada que el cuerpo (deformada) y parálisis” (Cañedo *et al.* 1998; Lagnaoui *et al.* 2000).

Desafortunadamente para realizar la evaluación en campo experimental, la obtención de la autorización por parte de la entidad reguladora para los organismos genéticamente modificados tomó un poco más de un año, lo que provocó que la semilla durara en proceso de maduración hasta tres veces más de lo normal (Capítulo III Decreto 4525 del 06 de diciembre de 2005 ICA; Capítulo II Resolución 946 del 17 de abril de 2006 ICA). No obstante, esta semilla fue usada en campo para las pruebas. La evaluación en campo con las líneas de papa GM coincidió con la ola invernal del primer semestre del 2011 en la totalidad de Colombia (Cepal 2012). Esto ocasionó que la plaga no afectara drásticamente el cultivo experimental, debido a que el ambiente ideal para que ocasione daños el de sequía (Notz 1995). A esto se sumó que el porcentaje de proteína Cry1Ac respecto al total de las proteínas de los tubérculos producidos por las plantas genéticamente modificadas fue muy bajo (menos del 1% con relación al total de las proteínas totales de los tubérculos). Esa concentración no fue suficiente para poder controlar el ataque de la poca plaga que afectó el cultivo. Se puede atribuir este hallazgo al ataque indiscriminado de larvas de *T. solanivora* en los controles no modificados genéticamente y las líneas de papa GM. Es importante resaltar, que aun cuando se presentaron las condiciones mencionadas, las líneas DC40.5 y PP 40.A fueron las que presentaron la menor severidad de daño con 24.39 y 36.5%, respecto a 51.64 y 59.09% en las líneas DC y PP control, respectivamente. lo que indicó que seguían siendo las mejores candidatas a continuar siendo evaluadas. Por esta razón fueron base de las evaluaciones de la equivalencia sustancial.

Los estudios analíticos de la composición de nuevos alimentos como los productos biotecnológicos producidos por ingeniería genética, no solo son importantes para establecer la equivalencia sustancial con su contraparte convencional. También son importantes porque son estudios prerrequisitos para la evaluación nutricional y toxicológica de las líneas consideradas promisorias (Schauzu 2000). La superposición de los cromatogramas de los extractos de las líneas de Diacol Capiro y Parda Pastusa infectadas con *F. oxysporum* o sin in-

fectar, demostraron un tiempo de retención y una absorbancia similar con picos análogos con los controles no modificados genéticamente. Esto sumado a los resultados encontrados en las pruebas bromatológicas, evidenciaron una alta similitud y por tanto ausencia de cambios significativos en las líneas GM, y en la respuesta inmune, lo que demuestra que las propiedades organolépticas de las plantas GM de papa son análogas a las del control en las dos variedades.

Conclusión

Dos líneas de papa genéticamente modificadas (DC40.5 y PP 40.A) fueron seleccionadas como promisorias resistentes a *Tecia solanivora*. Los resultados obtenidos en todas y cada una de las pruebas moleculares, inmunológicas, biológicas y de equivalencia sustancial, así como los tiempos y condiciones en las que fueron evaluadas (laboratorio, invernadero y campo), demostraron que éstas líneas se deben seguir estudiando bajo condiciones de campo, certificando su inocuidad alimentaria, así como su posible comercialización en el mediano plazo.

Agradecimientos

Queremos manifestar nuestro agradecimiento a los Drs. Marc Ghislain, Sandra Manrique y José Tovar del Centro Internacional de la Papa (CIP) por su asesoría, así como a los Drs. Nancy Barreto, José Luis Zapata y Aristóbulo López de Corpoica, por su colaboración y asesoría para la ejecución en los bioensayos. Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (código del proyecto 2007S7607-186) y la Secretaría de Agricultura de Antioquia. Fue apoyado por la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), CORPOICA C.I. La Selva y Tibaitatá, FEDEPAPA y la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y Bogotá.

Literatura citada

- BASF. 2011. A potato with special starch. Disponible en: <http://www.basf.com/group/corporate/en/> [Fecha revisión: 2 diciembre 2011].
- BELTRÁN, J.; JAIMES, H.; ECHEVERRY, M.; LADINO, Y.; LÓPEZ, D.; DUQUE, M.C.; CHAVARRIAGA, P.; TOHME, J. 2009. Quantitative analysis of transgenes in cassava plants using real-time PCR technology. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 45: 48-56.
- BERNAL, I. 1994. Análisis de alimentos. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Bogotá, p. 114.
- BUBNER, B.; BALDWIN, I. T. 2004. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Report* 23: 263-271.
- CAÑEDO, V.; BENAVIDES, J.; GOLMIRZAIE, A.; CISNEROS, F.; GHISLAIN, M.; LAGNAOUI, A. 1998. Assessing Bt-transformed potatoes for potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller), management, pp. 161-169. En: CIP Program Report 1997-1998. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú.
- CEPAL. 2012. Valoración de daños y pérdidas ola invernal Colombia 2010-2011. Comisión Económica para América Latina y el Caribe – Cepal/Banco Interamericano de Desarrollo – BID.
- DAVIDSON, M.; TAKLA, M.; READER, J.; BUTLER, R.; WRATTEN, S.; CONNER, A. 2002. Evaluation of field grown potato lines transgenic for *cry1Ac9* gene conferring resistance to potato tuber moth. *New Zealand Plant Protection-Series* 55: 405-410.

- DAVIDSON, M.; BUTLER, R.; WRATTEN, S.; CONNER, A. 2006. Field evaluation of potato plants transgenic for a *cry1Ac* gene conferring resistance to potato tuber moth, *Phthorimaea operculea* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Crop Protection* 25: 216-224.
- DOMINGUEZ, I.; CANERO, C.; RAMIREZ, W.; SEGOVIA, P.; PINO, H. 2009. Evaluación del efecto de insecticidas sobre larvas de *Tecia solanivora*. *Agricultura Andina* 17: 61-73.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- FARINELLI, M.; MOLLET, L.; REUST, W. 1994. Small-scale field tests with transgenic potato, cv. Bintje, to test resistance to primary and secondary infections with potato virus Y. *Plant Molecular Biology* 25: 963-975.
- FLAVELL, R. B. 1994. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 3490-3496.
- GAHAKWA, D.; MAQBOOL, S.; FU, X.; SUDHAKAR, D.; CHRISTOU, P.; KOHLI, A. 2000. Transgenic rice as a system to study the stability of transgene expression: multiple heterologous transgenes show similar behaviour in diverse genetic backgrounds. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 388-399.
- GHISLAIN, M.; ZHANG, D.; HERRERA, M. 1997. Protocolos de laboratorio de biología molecular: Tipificación genética. CIP. G4.G57 Manuales de Capacitación CIP. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú.
- HARRIS, N.; FOSTER, J.; KUMAR, A.; DAVIS, H.; GEBHART, C.; WRAY, J. 2000. Two cDNAs representing alleles of the nitrate reductase gene of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée): sequence analysis, genomic organization and expression. *Journal of Experimental Botany* 51 (347): 1017-1026.
- HOBBS, S.; KPODAR, P.; DELONG, C. 1990. The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Molecular Biology* 15: 851-864.
- JAMES, C. 2012. Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2012. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Application (ISAAA) Brief No 42. ISAAA: Ithaca, NY.
- JONGEDIJK, E.; DE SCHUTTER, A.; STOLTE, T.; VAN DEN ELZEN, P.; CORNELISSEN, B. 1992. Increased resistance to potato virus X and preservation of cultivar properties in transgenic potato under field conditions. *Nature Biotechnology* 10: 422-429.
- KADLECEK, P.; TICHA, I.; HASEL, D.; CAPKOVÁ, V.; SCHAFER, C. 2001. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science* 161: 695-701.
- KAWCHUK, L.; MARTIN, R.; MCPHERSON, J. 1991. Sense and antisense RNA-mediated resistance to potato leafroll virus in russet burbank potato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 247-253.
- KONDRÁK, M.; VAN DER MEER, I.; BÁNFALVI, Z. 2006. Generation of marker- and backbone-free transgenic potatoes by site-specific recombination and a bi-functional marker gene in a non-regular one-border *Agrobacterium* transformation vector. *Transgenic Research* 15: 729-737.
- KONSTANTINOOU, I.; HELA, D.; ALBANIS, T. 2006. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environmental Pollution* 141: 555-570.
- LAGNAOUI, A.; CAÑEDO, V.; DOUCHES, D. 2000. Evaluation of *Bt-cryIIa1* (*cryV*) transgenic potatoes on two species of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* and *Symmetrischema tangolias* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Peru. En: CIP Program Reports 1999-2000: 117-121. Centro Internacional de la Papa CIP, Lima, Perú.
- LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods* 25: 402-408.
- LONDOÑO, M.; MONTOYA, O. 1994. Cria de *Tecia solanivora* Povolni para ensayos biológicos. ICA-CORPOICA. Rionegro, Antioquia.
- MAAGD, R.; BOSCH, D.; STINIEKEMA, W. 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in Plant Science* 4: 9-13.
- MACLEOD, A. 2005. Data sheets on quarantine pests. *Tecia solanivora*. European and Mediterranean Plant Protection Bulletin 35: 399-401.
- MAQBOOL, S.; CHRISTOU, P. 1999. Multiple traits of agronomic importance in transgenic indica rice plants: analysis of transgene integration, expression levels and stability. *Molecular Breeding* 5: 471-480.
- MASON, G.; PROVERO, P.; VAIRA, A.; ACCOTTO, G. 2001. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative realtime PCR. *BMC Biotechnology* 2: 20.
- MEYER, P. 1998. Stabilities and instabilities in transgene expression. pp. 263-275. En: Lindsey, K. (Ed.). *Transgenic plant research*. Harwood Academic Publishers Zurich, Suiza.
- NOTZ, A. 1995. Influencia de la Temperatura sobre la Biología de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) Criadas en Tubérculos de papa *Solanum tuberosum* L. *Boletín de Entomología Venezolana* 11: 49-54.
- POVOLNY, D. 1973. *Scrobipalopsis solanivora* sp. n. A new pest of potato (*Solanum tuberosum*) from Central America. *Acta Agronómica* 21: 143-146.
- PULLANDRE, N.; DUPAS, S.; DANGLES, O.; ZEDDAM, J.; CAPDEVIELLE-DULAC, C.; BARVIN, K.; TORRES-LEGUIZAMON, M.; SILVAIN, J. 2008. Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. *Biological Invasions* 10: 319-333.
- SANDOVAL, D.; VILATUÑA, J. 1998. La polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny). Servicio de información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador (SICA).
- SANSINENA, E. 2000. *Bacillus thuringiensis*: Una alternativa biotecnológica a los insecticidas. Puebla, México. Tesis de Postgrado (M.Sc. Microbiología) Universidad Autónoma de Puebla, CU. Instituto de Ciencias. Postgrado en Microbiología.
- SCHAUZU, M. 2000. The concept of substantial equivalent in safety assessment of foods derived from genetically modified organisms. *AgBiotechNet*. Vol 2 April. ABN 044.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.; DEAN, D. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 775-806.
- TORRES, J.; VILLANUEVA, D.; CADAVID-RESTREPO, G.; ARANGO, R. 2012. Phenotypic evaluation of two transgenic potato varieties for control of *Tecia solanivora*. *Agronomía Colombiana* 30 (1): 7-14.
- TORRES-LEGUIZAMON, M.; SOLIGNAC, M.; VAUTRIN, D.; CAPDEVIELLE-DULAC, C.; DUPAS, S.; SILVAIN, J. 2009. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the potato tuber moth *Tecia solanivora* (Povolny, 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Molecular Ecology Resources* 9 (4): 167-1169.
- TRUVE, E.; AASPOLLU, A.; HONKANEN, J.; PUSKA, R.; MEHTO, M.; HASSI, A.; TEEN, T.; KELVE, M.; SEPPANEN, P.; SAARMA, M. 1993. Transgenic potato plants expressing mammalian 2'-5' oligoadenylate synthase are protected from potato virus X infection under field conditions. *Nature Biotechnology* 11: 1048-1052.
- URWIN, P.; TROTH, K.; ZUBIKO, E.; ATKINSON, H. 2001. Effective resistance to *Globodera pallida* in potato field trials. *Molecular Breeding* 8: 95-101.
- VALDERRAMA, A.; VELASQUEZ, N.; RODRIGUEZ, E.; ZAPATA, A.; ZAIDI, M.; ALTOSAAR, I.; ARANGO, R. 2007.

- Resistance to *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) in three transgenic Andean varieties of potato expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protein. *Journal of Economic Entomology* 100 (1): 172-179.
- VANEGAS, P. A.; BLANCO, J. T.; CHAPARRO, A. 2010. Expresión de la proteína Cry1Ac en tejidos de líneas transgénicas de papa (*Solanum tuberosum* spp. andigena) var. Diacol capiro. *Acta Biológica Colombiana* 15 (2): 101-114.
- VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; ELMAYAN, T.; FEUERBACH, F.; GODON, C.; MOREL, J.; MOURRAIN, P.; PALAUQUI, J.; VERNHETTES, S. 1998. Transgene induced gene silencing in plants. *Plant Journal* 16: 651-659.
- VILLANUEVA, D.; VELÁSQUEZ, N.; RODRÍGUEZ, E.; ORDUZ, S.; ARANGO, R. 2009. Molecular characterization of a Colombian *Bacillus thuringiensis* strain with activity against *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Entomología* 35 (2): 130-137.
- WILKENING, S.; BADER, A. 2004. Quantitative real-time polymerase chain reaction: methodical analysis and mathematical model. *Journal of Biomolecular Techniques* 15: 107-111.
- YANG, L.; DING, J.; ZHANG, C.; JIA, J.; WENG, H.; LIU, W.; ZHANG, D. 2005. Estimating the copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR. *Plant Cell Report* 23: 759-763.
- YAN-RU, S.; QING-HU, M.; LIN-LIN, H.; LI-ZHI, Z.; WEN-YU, Y.; XUE-XIAN, P.; HAI-YUN, W. 1996. Transgenic potato with PVY coat protein gene and its small-scale field test. *Acta Botanica Sinica* 38: 711-718.

Recibido: 27-feb-2014 • Aceptado: 3-nov-2014

Citación sugerida:

- VILLANUEVA, D.; TORRES, J.; RIVERA, H.; NÚÑEZ, V.; ARANGO, R.; ÁNGEL, F. 2014. Líneas colombianas de papa genéticamente modificadas resistentes a *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) bajo campo confinado. *Revista Colombiana de Entomología* 40 (2): 148-157. Julio-Diciembre 2014. ISSN 0120-0488.