



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Estudio del efecto del genotipo vegetal, cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, y casete de expresión, en la expresión de la tolerancia a glifosato en variedades colombianas de soya**

**Adriana Carolina Rojas Arias**

Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá

Facultad de Ciencias

Instituto de Biotecnología

Bogotá, Colombia

2017



# **Estudio del efecto del genotipo vegetal, cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, y casete de expresión, en la expresión de la tolerancia a glifosato en variedades colombianas de soya**

**Adriana Carolina Rojas Arias**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctor en Biotecnología**

Director:

Ph.D. Alejandro Chaparro Giraldo

Grupo de investigación:

Ingeniería Genética de Plantas

Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá

Facultad de Ciencias

Instituto de Biotecnología

Bogotá, Colombia

2017



*A mi amado esposo Alejandro*



## Agradecimientos

A la Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas (FENALCE), quienes financiaron el proyecto dentro del cual se desarrolló esta tesis, y quienes actuaron no solamente como financiadores, sino como acompañantes permanentes, consejeros y soportes de todo el proceso que se siguió en este trabajo. Especial mención al Doctor Henry Vanegas y al Ingeniero Julio Duarte, quienes acompañaron más cercanamente esta tesis, amenizando todo con su carisma.

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS, por la beca doctoral que me otorgaron, que me permitió en gran medida realizar este proceso.

A las empresas Semillas Kamerún y Semillas Panorama quienes muy amablemente donaron las semillas de soya con las que se desarrolló esta tesis. Especial mención a la señora Bibiana Triana y al señor Hugo Ortiz quienes atendieron siempre mis solicitudes con mucha paciencia y me colaboraron con este material.

Al profesor Alejandro Chaparro, quien me recibió en su grupo en un momento muy difícil de mi doctorado, y me brindó todo su apoyo para que este finalmente saliera adelante.

A Sandra Leal, Jessica Palacio, Yadira Rodríguez, Daniel Araque y Julián Mora, quienes contribuyeron enormemente en todos los procesos de la tesis a nivel de laboratorio, incluyendo las transformaciones, mantenimiento de las plantas *in vitro*, endurecimiento en invernadero, pruebas fenotípicas y moleculares, crecimiento de la bacteria, entre otros. Mil y mil gracias. Yo sola no lo hubiera logrado.

A Jenny Jiménez quien contribuyó en la construcción del estudio de libertad de operación. Muchas gracias.

A los estudiantes de estadística Martín Andrés Macías, Diego Mauricio López, y Juan Camilo Mejía, quienes desarrollaron los análisis estadísticos contenidos en este trabajo, y

a la profesora Nelcy Rodríguez del Departamento de Estadística, quien los orientó. Gracias por las enseñanzas y el interesante y enriquecedor diálogo interdisciplinar.

A los profesores Xavier Marquínez y Fagua Álvarez, quienes muy amablemente me facilitaron un espacio en su laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, para desarrollar el procesamiento del material vegetal y para el crecimiento del mismo.

A la profesora Luz Marina Melgarejo, quien me permitió usar su lector de Elisa para desarrollar las lecturas de esta prueba.

Al profesor Humberto Zamora, del Departamento de Química, quien muy amablemente me facilitó un espacio en su invernadero para desarrollar las pruebas fenotípicas finales de la tesis.

A Elkin Ruiz, Yolanda Pardo y Oliva Díaz, quienes me prestaron elementos de laboratorio y equipos en los momentos en que no disponía de ellos. Me salvaron en muchas oportunidades.

A los Doctores Esperanza Torres, Juan Carlos Vaca y Ricardo Pertuzé, quienes actuaron como jurados de esta tesis, enriqueciéndola con sus acertados comentarios y sugerencias.

A las integrantes del grupo de Ingeniería Genética de Plantas, que siempre estuvieron prestas a colaborar ante cualquier situación y porque hacían agradables las largas jornadas de trabajo en el laboratorio. Un grupo de mujeres muy inteligentes, perfectamente funcional como grupo, y de las que me llevo los mejores recuerdos. Especialmente gracias a Daniela Portela, Yadira Rodríguez y Natalyth Erira por que sentí que su compañía trascendió el espacio académico hasta llegar a un nivel más personal.

A mi hermosa familia, quienes hicieron llevadero el proceso con su amor y apoyo incondicional. A mi esposo quien siempre conservó la esperanza de que esto era posible.



## Resumen

Este trabajo estudió el efecto de la interacción genotipo vegetal, genotipo bacteriano y casete de expresión, en la transformación genética de variedades colombianas de soya, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Se desarrolló un análisis de libertad de operación, encontrando que los elementos empleados, a la fecha no infringen derechos de terceros en el territorio nacional. Se emplearon tres variedades de soya adaptadas al territorio colombiano (SK7, P29 y Soyica P34), tres cepas bacterianas (AGL0, EHA105 y ATCC 53213) y tres casetes de expresión que conferían tolerancia a glifosato (E-IGP, E-2 y pMON546). Se encontró que la desinfección por gas cloro resultó ser la más adecuada para el material empleado. Respecto a la capacidad de regeneración, la variedad P29 tenía la mayor producción de explantes con brote, con un 96,2%, pero la variedad SK7 presentó una mayor cantidad de brotes por explante, con un promedio de 17,7 ( $\pm 7,73$ ) brotes. Se evaluaron algunas características moleculares y fenotípicas de las cepas bacterianas, y se diseñó un esquema de uso de antibióticos, que arrojó una combinación de cefotaxima + timentina, como la más adecuada. Se diseñó un esquema de selección con glifosato de largo plazo. Se obtuvieron plantas completas de las tres variedades con el casete E-IGP, y de la variedad SK7 con los tres casetes de expresión evaluados. Por pruebas moleculares y fenotípicas se determinó que la combinación que tuvo una mayor frecuencia de transformación fue la del casete E-IGP, con la variedad SK7, y la cepa bacteriana AGL0, con un 10,8% de eficiencia de transformación, y un 3,8% de transformantes que expresan el transgén. Se desarrollaron pruebas fenotípicas en invernadero, encontrando 6 líneas de la variedad SK7 y una de la variedad P29 que efectivamente toleraron la aplicación de glifosato comercial. Los resultados sugieren que hay diferencias en la capacidad de transformación vegetal de variedades de soya colombianas, asociadas a la combinación de genotipo vegetal, cepa bacteriana y casete de expresión, dejando abierta la posibilidad de desarrollo de agrobiogénicos en Colombia, en cultivos de importancia económica como la soya.

**Palabras clave:** *Glycine max*, N-(fosfometil) glicina, transgénicos, Agrobiogénicos, Biotecnología vegetal.

## Abstract

This work studied the effect of interaction between vegetal genotype, bacterial genotype and expression cassette, in generation of transgenic lines derived from Colombian soybean varieties mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. An analysis of freedom to operate was developed, finding that the elements used do not infringe the rights of third parties to date and in the country. Three soybean varieties adapted to the Colombian territory (SK7, P29 and Soyica P34), three strains of bacteria (AGL0, EHA105 and ATCC 53213) and three glyphosate-tolerant expression cassettes (E-IGP, E-2 and pMON546) were used. Chlorine gas disinfection was found to be the most suitable for the material used. As regards to regeneration capacity, P29 variety had the highest production of explants with shoots, with 96.2%, but the SK7 variety had a higher number of shoots per explant, with an average of 17.7 ( $\pm$  7.73) shoots. Some molecular and phenotypic characteristics of bacterial strains were evaluated, bacterial strains were characterized by molecular and phenotype traits, and a scheme of antibiotic use was designed, which showed a combination of cefotaxime plus timentin as the most adequate. A long-term glyphosate selection scheme was designed. It was obtained complete plants of the three varieties with E-IGP cassette, and of SK7 variety with the three expression cassettes evaluated. Molecular and phenotypic tests showed that the combination with the highest frequency of transformation was E-IGP cassette, with SK7 variety, with AGL0 bacterial strain, obtaining a 10.8% of transformation efficiency, and 3.8% of primary transformants expressing the transgene. Tests were carried out on a greenhouse, finding 6 lines of SK7 variety and one line of P29 variety that effectively tolerated commercial glyphosate application. These results suggest that there are differences in plant transformation capacity of Colombian soybean varieties, associated to the combination of plant genotype, bacterial strain and expression cassette used, leaving open the possibility of agrobiogenic soybean development in Colombia, in crops of economic importance as soybean.

**Keywords:** *Glycine max*, N-(fosfometil) glicina, transgenics, Agbiogenics, Plant biotechnology.

# Contenido

	Pág
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>X</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Lista de símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>XVII</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>5</b>
Objetivo general .....	5
Objetivos específicos .....	5
<b>1. Capítulo 1: Marco Teórico</b> .....	<b>7</b>
1.1. Desarrollo de líneas GM .....	7
1.2. Soya .....	9
1.2.1. Adaptación de la soya al cultivo regional .....	10
1.2.2. Mejoramiento genético en soya .....	11
1.2.3. Soya y malezas .....	14
1.3. Glifosato .....	16
1.4. Cultivos GM y tolerancia a herbicidas .....	19
1.5. Optimización de transgenes para mejores niveles de expresión en plantas transgénicas .....	21
1.6. Derechos de propiedad intelectual sobre desarrollos biotecnológicos .....	22
1.7. Antecedentes del grupo de investigación en la generación de eventos transgénicos tolerantes a herbicidas en soya .....	23
<b>2. Capítulo 2: Metodología</b> .....	<b>25</b>
2.1. Lugar de trabajo .....	26
2.2. Estudio de libertad de operación .....	26
2.3. Material vegetal .....	27
2.4. Adaptación de material de campo a un sistema de cultivo <i>in vitro</i> .....	28
2.5. Evaluación de la capacidad de regeneración de cada variedad vegetal .....	31
2.6. Sistema de cocultivo .....	33
2.6.1. Cepas bacterianas .....	33
2.6.2. Transformación de las bacterias con los casetes de tolerancia a herbicida .....	34

2.6.3. Proceso de cocultivo .....	38
2.7. Uso de antibióticos para eliminar la bacteria del sistema.....	39
2.8. Selección con herbicida.....	41
2.8.1. Selección de corto plazo .....	41
2.8.2. Selección a largo plazo .....	43
2.8.3. Individualización de posibles transformantes primarios, nomenclatura y propagación.....	49
2.9. Obtención de plantas con casetes contrastantes.....	49
2.10. Pruebas moleculares y fenotípicas .....	50
2.10.1. Determinación de presencia / ausencia del transgén .....	50
2.10.2. Expresión del transgén .....	52
2.10.3. Número de copias del transgén que se insertaron en el genoma de la planta.....	52
2.10.4. Endurecimiento y prueba de invernadero.....	53
2.11. Análisis estadístico .....	56
<b>3. Capítulo 3: Resultados .....</b>	<b>57</b>
3.1. Estudio de libertad de operación .....	57
3.2. Adaptación de material de campo a un sistema de cultivo <i>in vitro</i> .....	63
3.3. Evaluación de la capacidad de regeneración de cada variedad vegetal .....	65
3.4. Acercamiento a la caracterización molecular y fenotípica de las cepas bacterianas .....	68
3.5. Uso de antibióticos para eliminar la bacteria del sistema.....	69
3.6. Selección con herbicida.....	74
3.6.1. Selección de corto plazo .....	74
3.6.2. Selección a largo plazo .....	77
3.7. Pruebas moleculares y fenotípicas .....	83
3.7.1. Determinación de presencia / ausencia del transgén .....	83
3.7.2. Expresión del transgén .....	87
3.7.3. Número de copias del transgén que se insertaron en el genoma de la planta.....	89
3.7.4. Endurecimiento y prueba de invernadero.....	92
<b>4. Capítulo 4: Discusión .....</b>	<b>95</b>
4.1. Estudio de libertad de operación .....	95
4.2. Explantes, técnica de desinfección y regeneración .....	99
4.3. Selección <i>in vitro</i> con glifosato .....	101
4.4. Hallazgos asociados al genotipo vegetal.....	104
4.5. Hallazgos asociados a la cepa bacteriana.....	107
4.6. Hallazgos asociados al casete de expresión .....	109
4.7. Posibilidades de optimización del proceso .....	112

---

4.8. Aportes del trabajo al desarrollo tecnológico local .....	113
<b>5. Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>115</b>
5.1. Conclusiones.....	115
5.2. Recomendaciones y perspectivas .....	116
<b>A. Anexo: Publicación internacional .....</b>	<b>117</b>
<b>B. Anexo: Pruebas estadísticas suplementarias.....</b>	<b>123</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>125</b>

## Lista de figuras

	<b>Pág</b>
<b>Figura 1-1:</b> Formula química del herbicida glifosato.....	17
<b>Figura 1-2:</b> Ruta del shikimato para la producción de aminoácidos aromáticos..	18
<b>Figura 2-1:</b> Actividades asociadas al cumplimiento de los objetivos propuestos. ....	25
<b>Figura 2-2:</b> Prueba de germinación basal sin tratamiento desinfectante. ....	29
<b>Figura 2-3:</b> Organización de las semillas sobre medio de germinación.....	30
<b>Figura 2-4:</b> Preparación del explante de nudo cotiledonar. ....	31
<b>Figura 2-5:</b> Organización de explantes en medio de regeneración. ....	32
<b>Figura 2-6:</b> Vector de transformación pCAMBIA1301. ....	35
<b>Figura 2-7:</b> Vector de transformación pMON546.....	36
<b>Figura 2-8:</b> Verificación de la extracción de plásmidos por electroforesis .....	36
<b>Figura 2-9:</b> PCR de incorporación del plásmido en <i>A. tumefaciens</i> .....	37
<b>Figura 2-10:</b> Proceso de cocultivo e inicio de la regeneración. ....	39
<b>Figura 2-11:</b> Proceso de generación de eventos transgénicos.....	48
<b>Figura 2-12:</b> Germinadores donde se realizó endurecimiento de plantas.....	54
<b>Figura 2-13:</b> Final del endurecimiento.....	55
<b>Figura 3-1:</b> Germinación de semillas de soya desinfectadas con sustancias líquidas. ...	64
<b>Figura 3-2:</b> Germinación de semillas de soya desinfectadas con gas cloro. ....	65
<b>Figura 3-3:</b> Capacidad de regeneración de las variedades vegetales. ....	66
<b>Figura 3-4:</b> PCR múltiple para caracterización de cepas de <i>A. tumefaciens</i> . ....	68
<b>Figura 3-5:</b> Regeneración de explantes sometidos a tratamientos antibióticos. ....	70
<b>Figura 3-6:</b> Diferentes efectos observados ante combinaciones de antibióticos.....	70
<b>Figura 3-7:</b> Promedio combinado de regeneración según tratamiento antibiótico. ....	73
<b>Figura 3-8:</b> Coeficiente de variación de regeneración según tratamiento antibiótico. ....	73
<b>Figura 3-9:</b> Efectos de selección de corto plazo con glifosato <i>in vitro</i> .....	75
<b>Figura 3-10:</b> Selección de corto plazo sobre explantes transformados. ....	76
<b>Figura 3-11:</b> Explantes recuperados sometidos a la estrategia de selección 1. ....	78
<b>Figura 3-12:</b> Explantes recuperados sometidos a la estrategia de selección 2. ....	79
<b>Figura 3-13:</b> Afectación morfológica en estrategia de selección 2.....	80

---

<b>Figura 3-14:</b> Ajuste del modelo lineal generalizado para estrategias de largo plazo .....	81
<b>Figura 3-15:</b> Detección del casete E-IGP sobre posibles transformantes primarios .....	84
<b>Figura 3-16:</b> Detección del gen de actina en transformantes con el casete E-IGP .....	84
<b>Figura 3-17:</b> Detección del casete E-2 sobre posibles transformantes primarios .....	85
<b>Figura 3-18:</b> Detección del gen de actina en transformantes con el casete E-2 .....	85
<b>Figura 3-19:</b> Detección del casete pMON546 sobre posibles transformantes primarios..	86
<b>Figura 3-20:</b> Detección del gen de actina en transformantes con el casete pMON546 ...	86
<b>Figura 3-21:</b> Prueba de Elisa sobre posibles transformantes primarios.....	87
<b>Figura 3-22:</b> Verificación del marcado de sondas con DIG .....	89
<b>Figura 3-23:</b> Montaje general de ADN digerido para pruebas de Southern Blot.....	90
<b>Figura 3-24:</b> Southern blot para la detección de número de insertos del casete E-IGP...	91
<b>Figura 3-25:</b> Southern blot para la detección de número de insertos del casete E-2.....	91
<b>Figura 3-26:</b> Southern blot para la detección de número de insertos de pMON546 .....	92
<b>Figura 3-27:</b> Controles de prueba fenotípica en invernadero .....	93
<b>Figura 3-28:</b> Plantas transformadas con el vector E-IGP sometidas a prueba fenotípica de invernadero.....	94

## Lista de tablas

	<b>Pág</b>
<b>Tabla 1-1:</b> Tecnologías transgénicas en soya disponibles comercialmente. ....	12
<b>Tabla 1-2:</b> Malezas en los sistemas de rotación con soya en el Piedemonte Llanero. .	15
<b>Tabla 2-1:</b> Variedades de soya empleadas en el presente estudio .....	27
<b>Tabla 2-2:</b> Primers usados para caracterización molecular de cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	34
<b>Tabla 2-3:</b> Casetes de expresión utilizados en el presente trabajo .....	34
<b>Tabla 2-4:</b> Diseño del ensayo de antibióticos para retirar la bacteria del sistema .....	40
<b>Tabla 2-5:</b> Diseño experimental de selección a corto plazo con herbicida .....	42
<b>Tabla 2-6:</b> Estrategias de selección <i>in vitro</i> con glifosato reportadas en otros estudios y diseñadas en este trabajo. ....	44
<b>Tabla 2-7:</b> Modelo lineal generalizado combinando variables de estrategia de selección de largo plazo, variedad vegetal y cepa bacteriana. ....	45
<b>Tabla 2-8:</b> Primers usados en pruebas moleculares .....	51
<b>Tabla 3-1:</b> Patentes de soya tolerante a glifosato según reivindicaciones. ....	58
<b>Tabla 3-2:</b> Patentes de soya tolerante a glifosato según año de solicitud. ....	59
<b>Tabla 3-3:</b> Patentes de soya tolerante a glifosato según propietario. ....	60
<b>Tabla 3-4:</b> Patrón de resistencia a antibióticos de las cepas utilizadas .....	69
<b>Tabla 3-5:</b> Tabla de Análisis de Varianza para uso de antibióticos .....	71
<b>Tabla 3-6:</b> Resultados de prueba de contrastes sobre ensayo de uso de antibióticos .	72
<b>Tabla 3-7:</b> Lecturas de absorbancia para prueba de Elisa CP4 EPSPS sobre las líneas generadas.....	88
<b>Tabla 3-8:</b> Resultados de pruebas de presencia/ausencia de transgén y detección de la proteína CP4 EPSPS sobre las líneas generadas .....	88
<b>Tabla 4-1:</b> Máximas frecuencias de transformación logradas sobre variedades de soya con transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> sobre explantes de semilla madura ....	104
<b>Tabla 4-2:</b> Cepas de <i>A. tumefaciens</i> usadas en transformación genética de soya.....	107



# Lista de símbolos y abreviaturas

## Símbolos

Símbolo	Término
°C	Grados centígrados
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
cm	Centímetros
g	Gramos
µM	Gramos por litro
HCl	Ácido clorhídrico
kb	Kilo pares de bases
kg	Kilogramo
kg/ha/año	Kilogramos por hectárea por año
kV	Kilovoltios
M	Molar (concentración de un soluto en una solución)
µg	Microgramos
mg/L	Miligramos por litro
min	Minutos
mL	Mililitros
µL	Microlitros
mM	Milimolar
µM	Micromolar
mm Hg	Milímetros de mercurio
N	Normal (concentración de un soluto en una solución)
NaCl	Cloruro de sodio
NaClO	Hipoclorito de sodio
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros

No.	Número
pb	Pares de bases
pg/ $\mu$ L	Picogramos por microlitro
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
t/ha	Toneladas por hectárea
V	Voltios
wt%	Porcentaje por masa
X	Concentración de una solución final de trabajo respecto a la concentración reportada como de uso habitual en la misma solución

## Superíndices

Superíndice	Término
TM	Marca comercial
®	Marca registrada

## Abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	Banco de cepas <i>American Type Culture Collection</i>
BAP	Bencil amino purina
Carbe	Carbenicilina
Cefo	Cefotaxima
C.I	Centro de investigación
CTAB	Hexadecyltrimethylammonium bromide
DFL - DFG	Desinfección en fase líquida – Desinfección en fase gaseosa
DIG	Digoxigenina
Dir	Primer directo (sentido)
DPI	Derechos de propiedad intelectual
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
EE.UU	Estados Unidos de América

---

ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
Elo1 - Elo2 - Elo3	Fases de Elongación 1, Elongación 2 y Elongación 3
EPO	Oficina de patentes de la Unión Europea
EPSPS	Enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa
etc	Etcétera
GA	Ácido giberélico
GM	Genéticamente modificado
IAA	Ácido indol acético
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
MES	2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid
MS	Medio de cultivo Murashige Skoog
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Reg1 - Reg2	Fases de Regeneración 1 y Regeneración 2
Rev	Primer reverso (antisentido)
RR	Roundup Ready
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SIC	Superintendencia de Industria y Comercio de Colombia
SSC	Buffer salino - citrato de sodio
T-DNA	ADN de transferencia
TE	Buffer Tris - EDTA
Timen	Timentina
Tris-HCl	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol hydrochloride
USPTO	Oficina de patentes de Estados Unidos
Vanco	Vancomicina



# Introducción

La soya es un cultivo ampliamente difundido en el mundo, debido a sus múltiples usos en alimentación humana y animal, y en la extracción de compuestos de interés industrial. Se ve afectado por diversos factores que disminuyen su rendimiento y productividad, entre los que se encuentran las malezas. Las malezas constituyen una limitante en el cultivo de la soya debido a que compiten con el cultivo por recursos como espacio, agua, luz y nutrientes, e incluso pueden liberar sustancias inhibidoras del crecimiento del cultivo de interés, y además sirven como hospederos de insectos plaga y organismos patógenos. Cuando este factor no se controla adecuadamente, el rendimiento del cultivo de soya se puede reducir hasta en un 70% (Bernal, 2006; Qiu *et al.*, 2013).

Para mitigar este problema algunas compañías multinacionales, productoras de semillas e insumos agroquímicos, desarrollaron a mediados de los 90s del pasado siglo XX, plantas de soya tolerantes a glifosato, usando la tecnología del ADN recombinante para producir organismos transgénicos o genéticamente modificados (GM). La implementación de esta tecnología en países como Estados Unidos y Argentina ha generado un impacto positivo relacionado con el incremento en la productividad, la reducción en los costos de operación, la reducción del impacto toxicológico de herbicidas de alta toxicidad, y las mejoras en las calidades nutricionales, entre otros (Owen, 2010; Brookes y Barfoot, 2013).

El uso comercial de la ingeniería genética de plantas se ve limitado por una maraña de patentes que protegen cada elemento usado en el proceso, como secuencias de ADN (regiones codificantes, regiones regulatorias, etc.), vectores de transformación y vectores de clonación, cepas bacterianas, protocolos de transformación y de cultivo de tejidos, entre otros. Esta situación ha llevado a que la “North American Strawberry Growers Association” decidiera abortar el proceso de investigación para la producción de fresa transgénica resistente a una enfermedad fungosa, ante el número y la complejidad de las patentes involucradas en su desarrollo (Thomas, 2006). También la “University of Michigan” fue obligada por un juez a quemar líneas transgénicas de pasto de forraje, debido a la demanda entre dos empresas por las patentes del gen y la región promotora

usadas en esta innovación (Thomas, 2006). La liberación comercial del arroz dorado se dificultó por las 40 patentes implicadas en su desarrollo (Kowalski *et al.*, 2002). Trabajos realizados en Colombia encontraron 59 patentes involucradas en el desarrollo de una línea transgénica de arroz que exprese el gene *cry1Ac* (Diazgranados *et al.*, 2016). Por otro lado, cinco corporaciones multinacionales son dominantes en la propiedad intelectual aplicada en la ingeniería genética de cultivos, Monsanto, Dupont, Syngenta, Bayer y Dow (Wright y Pardey, 2006), que además establecen licencias cruzadas exclusivas entre sí, tipo de licenciamiento que detiene la investigación y hace más lento el avance de la biotecnología (Pisano, 2006). Este escenario se ha vuelto más complicado con la compra de Monsanto por parte de Bayer por \$66.000 millones de dólares en 2016, y la compra de Syngenta por parte de ChemChina por \$46.000 millones de dólares en 2017. Si un productor independiente de semillas desea generar y/o comercializar variedades GM, debe considerar los costos de licenciamiento de esta tecnología.

Sin embargo, la protección intelectual de los elementos utilizados en una innovación tecnológica no impide necesariamente su utilización comercial. Las patentes son limitadas a una jurisdicción nacional y a un tiempo determinado, pueden aceptar excepciones o cubrir objetos diferentes de acuerdo con la regulación local, o pueden no estar vigentes (BIOS, 2009). Las patentes tienen un tiempo limitado de vigencia de 20 años (USPTO, 2015; SIC, 2017). Al terminar este período, la patente pasa al dominio público, y puede usarse en desarrollos comerciales. No obstante, se debe ser muy cuidadoso en el análisis, debido a la existencia de patentes secundarias, o procesos legales que no hayan concluido, y que pueden mantener vigente la protección. En todo caso, empresas que tienen la capacidad operativa y administrativa para producir y comercializar el desarrollo tecnológico lo podrían hacer libremente, dependiendo del resultado del análisis. Este es un modelo ampliamente difundido y empleado por empresas farmacéuticas, que rastrean patentes de su área industrial y una vez que se vencen desarrollan sus propios productos “genéricos” con la misma base tecnológica (Grushkin, 2012). En el caso de la transgénesis para la producción de plantas tolerantes a herbicidas es probable que muchas de estas patentes se encuentren vencidas, o próximas a vencerse, e incluso que nunca se hayan radicado en Colombia, por lo cual no aplicarían para este territorio. Todo esto debe documentarse mediante un análisis de libertad de operación específico para la tecnología y el país, o países, en que se quiera aplicar (Hincapié y Chaparro-Giraldo, 2013; Lamprea y Salazar, 2013).

Las empresas que producen semillas GM se ubican en países del hemisferio norte, sus mayores clientes son países como Estados Unidos, Argentina, Brasil, Canadá y China, por lo cual desarrollan variedades con características particulares para las condiciones climáticas y geográficas de sus clientes mayoritarios, dejando a países como Colombia sin una oferta especializada para sus condiciones particulares (Chaparro-Giraldo y Ávila, 2013; Sinebo y Maredia, 2016).

El proceso de introducción de un transgén en una planta involucra diversos factores. La técnica más difundida para realizar este proceso consiste en la utilización de bacterias del género *Agrobacterium* como vectores del gen de interés. La bacteria es transformada con un vector plasmídico que incluye secuencias promotoras, codificantes, de direccionamiento y terminadoras, según los intereses del investigador. Una vez transformada, la bacteria utiliza su maquinaria metabólica para conducir el transgén hacia el genoma de la planta. En este proceso influyen elementos como la virulencia de la cepa de *Agrobacterium*, la predisposición del genotipo vegetal a ser infectada por la bacteria y el correcto diseño del casete de expresión, que le permita expresarse adecuadamente, entre otros (McCullen y Binns, 2006; Anami *et al.*, 2013).

El casete de expresión, en el caso de transformación genética para tolerancia al herbicida glifosato, incluye gen de interés, secuencia promotora, péptido de tránsito a cloroplasto y secuencia terminadora. En su diseño se deben tener en cuenta factores como el uso codónico de la especie vegetal, los promotores que se usarán (delimitando los estímulos bajo los cuales se expresará, o los tejidos en que lo hará), las secuencias de señalización de tráfico intracelular y la secuencia terminadora. Además, se debe considerar la maquinaria metabólica de la planta y su capacidad para reconocer el transgen y expresarlo, así como la metodología de transformación a emplear. Es en este sentido que finalmente se logra que el casete se integre exitosamente en el genoma de la planta, y así el gen se expresará, evidenciándose la característica deseada (McCullen y Binns, 2006; Anami *et al.*, 2013; Webster *et al.*, 2017).

La transformación eficaz se basa en la capacidad de regeneración del genotipo vegetal *in vitro* (que generalmente se relaciona a la fisiología de la planta y al explante), y el efecto de los agentes de selección. Genotipos con resistencia a patógenos como las bacterias,

resistirían el ataque de cepas de *Agrobacterium* lo que impediría la transformación. Por ello se sugiere en estos casos el uso de cepas hipervirulentas (Meurer *et al.*, 1998; Paz *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2013).

En este orden de ideas, este trabajo planteó la evaluación del proceso en la generación de líneas de soya tolerantes al herbicida glifosato, utilizando tres variedades adaptadas a las condiciones edafoclimáticas de Colombia. Estas tres variedades fueron evaluadas respecto a su comportamiento en sistemas de cultivo *in vitro*, susceptibilidad de transformación genética por dos cepas diferentes de *Agrobacterium tumefaciens*, y expresión del transgén contenido en dos diferentes casetes de expresión. Esto permitió evaluar diferencias en la eficiencia de transformación y comportamiento en fase de cultivo de tejidos, según el genotipo vegetal y diferentes cepas de *A. tumefaciens* de uso en transgénesis de soya.

Esta tesis propone una investigación que integra diferentes aspectos de un desarrollo biotecnológico de potencial impacto social como los cultivos GM. Sus resultados serán de utilidad en la implementación de tecnologías para incrementar el rendimiento y productividad del cultivo de soya en el país.



# Objetivos

## Objetivo general

Estudiar el efecto de la interacción genotipo vegetal, genotipo bacteriano y casete de expresión, en la generación de líneas transgénicas derivadas de variedades colombianas de soya mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

## Objetivos específicos

1. Implementar un sistema efectivo de transformación y regeneración de variedades de soya adaptadas al cultivo en ambientes colombianos, utilizando un casete de expresión diseñado específicamente para soya conteniendo un gen de tolerancia a glifosato, bajo consideraciones de derechos de propiedad intelectual.
2. Evaluar el efecto de la variedad vegetal, la cepa de *Agrobacterium* y el casete de expresión en el proceso de transformación de plantas de soya.
3. Obtener plantas transgénicas completas de la variedad que haya presentado el mejor desempeño *in vitro*, y evaluar los efectos de la transformación.



# 1. Capítulo 1: Marco Teórico

## 1.1. Desarrollo de líneas GM

El primer cultivo GM comercial se introdujo en 1994, y correspondió a una variedad de tomate con una vida útil más larga, cuya tecnología se denominó FlavrSavr, desarrollado por la compañía Calgene (Bruening y Lyons, 2000), y desde ese año el desarrollo y adopción de nuevas características de interés agrícola ha aumentado considerablemente. Según las cifras más recientes, en el año 2016 se cultivaron 185,1 millones de hectáreas de cultivos GM a nivel mundial, principalmente en Estados Unidos con 72,9 millones de hectáreas, seguido de Brasil y Argentina con 49,1 y 23,8 millones de hectáreas respectivamente (ISAAA, 2016). Colombia comenzó a cultivar plantas GM en el año 2002 con la siembra de clavel azul, y posteriormente introdujo cultivos GM de algodón (2003), maíz (2007) y rosas azules (2009). Si bien se aprobó la siembra de soya GM desde el año 2010, a la fecha no se conocen reportes de la implementación de cultivos. En el año 2016, en Colombia se cultivaron 100.000 ha de maíz GM, 9.800 ha de algodón GM y 12 ha de flores azules (ISAAA, 2016; Agrobio, 2017). En general, las características que se han introducido a los cultivos GM más ampliamente difundidas son tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos plaga, y resistencia a virus. Estas variedades vegetales mejoradas han reducido pérdidas y uso de agroquímicos e incrementado el rendimiento, lo que ha generado mayor rentabilidad para el productor (Chaparro-Giraldo y Ávila, 2013; Klümper y Qaim, 2014).

El proceso de desarrollo de una variedad GM incluye las siguientes etapas (Meurer *et al.*, 1998; Paz *et al.*, 2004; McCullen y Binns, 2006; Anami *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2013):

1. Selección del gen(es) de interés: Parte de estudios de ciencia básica en los cuales se encuentra que en diferentes especies (microbianas, vegetales, animales, etc.) puede existir una característica particular que resultaría ventajosa para una especie vegetal, como genes que confieran tolerancia a herbicidas, insectos plaga

- o infecciones microbianas, entre muchas otras. Se aísla el gen o genes asociados a la característica y se lo prepara para ser introducido en una planta.
2. Diseño del casete de expresión: El casete de expresión es una secuencia de ADN que incluye como mínimo, el gen de interés, la región promotora y la región terminadora. Se debe tener en cuenta el uso codónico de la planta objetivo, la técnica de transformación que se va a utilizar, la región promotora que define bajo qué estímulos se expresará o en qué tejidos, secuencias de señalización de tráfico intracelular en caso de necesitarlo, que se adicione una secuencia terminadora, y que la planta tenga la maquinaria necesaria para reconocer el gen y expresarlo, entre otras consideraciones que varían de acuerdo con el transgén que se desea insertar.
  3. Transferencia a células vegetales: Se selecciona una porción de tejido vegetal (explante) que tenga las características necesarias para ser transformado, entre ellas que permita ser regenerado exitosamente en condiciones *in vitro*, que tenga grupos celulares en una fase de multiplicación celular acelerada, que soporte el ataque por medio del cual se le introducirá ADN foráneo, que permita la inserción de este ADN en su genoma y que sea capaz de regenerar una planta completa en etapas subsecuentes del proceso, entre otras características. El casete de expresión es integrado en el ADN vegetal, bien sea utilizando un intermediario biológico (diferentes especies del género *Agrobacterium*), o por bombardeo con partículas metálicas, generalmente de oro (biobalística). Cuando se usa el sistema de *Agrobacterium* es necesario tener en cuenta que muchas variedades pueden presentar resistencia hacia patógenos, incluyendo esta bacteria, por lo cual se considera el uso de cepas hipervirulentas de *Agrobacterium* para transformación genética de ciertas especies vegetales.
  4. Regeneración y selección de plántulas: Los explantes transformados se seleccionan usando genes marcadores de selección (resistencia a antibióticos, tolerancia a herbicidas, o genes relacionados con procesos metabólicos). Se induce a los explantes a generar nuevos órganos (organogénesis) como callos, brotes o raíces; o a generar embriones somáticos. Esto se logra empleando técnicas de cultivo de tejidos y diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, generalmente de citoquininas y auxinas. El proceso se completa cuando se obtienen plantas completas sobre las cuales desarrollar las siguientes etapas.

5. Caracterización molecular y fenotípica: Utilizando herramientas de biología molecular sobre las plantas obtenidas se determina la inserción del transgén en el genoma, número de copias, niveles de expresión (o represión si es el caso) de la proteína(s) de interés. También se evalúa que la expresión de la proteína(s) codificada por el transgén no altere ningún aspecto de la fisiología de la planta con respecto a una planta sin transformar (equivalencia substancial).

## 1.2. Soya

La soya (*Glycine max*) es una planta leguminosa, perteneciente a la familia Fabaceae, cuyas semillas han sido ampliamente utilizadas en alimentación humana y animal (Cober *et al.*, 2009). A nivel mundial, este cultivo es el tercero en generación de ingresos por producción, después del arroz y el trigo (FAOSTAT, 2017). El cultivo de soya pudo haberse originado en China a partir de la planta silvestre *Glycine soja*, el ancestro más probable de la especie cultivada (Qiu y Chang, 2010). Desde 1700, la soya se difundió hacia India y Europa, llegando en 1765 al continente americano por Estados Unidos (Ridner *et al.*, 2006; Cober *et al.*, 2009). La producción mundial la encabeza Estados Unidos, que alcanzó una producción de 106.877.870 toneladas en el año 2014, seguido por Brasil y Argentina con producciones de 86.760.520 y 53.397.715 toneladas respectivamente para el mismo año (FAOSTAT, 2017).

Colombia ocupa la posición 37 a nivel mundial, sexto en Suramérica, con una producción que alcanzó las 90.126 toneladas en 2014, a pesar de que su rendimiento de 2,5 t/ha, es superior al de países con mayor producción de soya, como China (rendimiento de 1,79 t/ha) e India (rendimiento de 0,96 t/ha), quienes ocupan el cuarto y quinto puesto de producción a nivel mundial respectivamente (FAOSTAT, 2017). El cultivo de esta leguminosa se desarrolla en los departamentos de Vichada, Casanare, Valle del Cauca y Meta, ocupando este último el primer lugar, con 41,6% de la producción nacional. También se desarrolla este cultivo en departamentos como Caldas, Huila y Cauca en cantidades inferiores (AGRONET, 2017).

La composición del grano de soya es, en promedio, 36,5% de proteínas; 20% de lípidos; 30% de carbohidratos; 9% de fibra alimentaria; 8,5% de agua; y 5% de cenizas, características que hacen de esta semilla una materia prima con diversas potencialidades,

tanto a nivel industrial como en la alimentación humana y animal. Este es el cultivo vegetal con mayor contenido de proteína, el principal productor de aceite vegetal del mundo y el vegetal del cual el ser humano obtiene la mayor cantidad de productos derivados con múltiples aplicaciones en las diferentes actividades cotidianas (Ridner *et al.*, 2006; Cober *et al.*, 2009; Qiu y Chang, 2010). Su principal uso es como fuente de proteína en la alimentación de aves de corral, cerdos, reses y otros animales domésticos. Sus usos en alimentación humana incluyen el consumo de las semillas cocidas, como parte de salsas y sopas, como suplemento de la leche (leche de soya), como harina incluida en la preparación de tortas, galletas y otros horneados, como sustituyente de la carne en alimentos vegetarianos, como aceite vegetal extraído desde las semillas, entre otros. A nivel industrial se usa en la fabricación de elementos tan diversos como los jabones, velas, celuloide, aceites impermeables, combustibles, desinfectantes, entre otros. También se usan otras partes de la planta como forraje o abonos verdes (Ridner *et al.*, 2006; Sylvester, 2009).

La semilla de soya posee proteínas de alta calidad, en comparación con otros alimentos de origen vegetal. Contiene aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) en cantidad suficiente para satisfacer los requerimientos de un adulto promedio, por lo cual puede sustituir a la carne en una dieta vegetariana. El aceite de soya es rico en ácidos grasos poli-insaturados y se destaca por su alto contenido de ácido linoleico (51%) que no es producido por el cuerpo humano y es un nutriente esencial. Posee tocoferoles con acción antioxidante natural y función de vitamina E. Otras vitaminas que incluye la semilla son la tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), niacina, ácido pantoténico, biotina, ácido fólico,  $\beta$ -caroteno (provit-A), inositol, colina y ácido ascórbico (vit-C). Contiene isoflavonas que se han asociado con la reducción en patologías cardíacas, osteoporosis, e incluso algunos tipos de cáncer (Ridner *et al.*, 2006)

### **1.2.1. Adaptación de la soya al cultivo regional**

La planta de soya es altamente sensible al fotoperiodo. Éste determina el número de días desde la emergencia a la floración, y se relaciona con la adaptación a diferentes latitudes. En las regiones tropicales, el fotoperiodo es más corto que en las regiones templadas, y en relación con el cultivo de soya esto ocasiona floración precoz, con pobre desarrollo vegetativo y reproductivo. Usar variedades adaptadas al cultivo en países templados, o

con 15 grados de diferencia en latitud norte o sur, sobre terrenos de países tropicales, representa una limitante para el cultivo, ya que producen plantas precoces, de porte bajo y escaso rendimiento del grano (Villarreal *et al.*, 1996; Valencia *et al.*, 2008; Valencia y Ligarreto, 2010).

En Colombia, se inició el mejoramiento genético en soya desde 1960 en el Valle del Cauca, y posteriormente en 1984 en la Orinoquía. Una de las instituciones nacionales que hace investigación en mejoramiento genético de soya, es la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) en el Centro de Investigación La Libertad, ubicado en la ciudad de Villavicencio (Meta). Allí desarrollan investigación en fitomejoramiento convencional y desarrollo de inoculantes microbianos para el cultivo, además de transferencia tecnológica (Valencia *et al.*, 2008; Valencia y Ligarreto, 2010). Por otra parte, empresas privadas productoras de semillas, como Semillas Kamerún y Semillas Panorama, también han desarrollado sus propias variedades mediante fitomejoramiento convencional, adaptados al cultivo de la región particular en la que desarrollan sus actividades. No se había desarrollado investigación en ingeniería genética sobre este cultivo en Colombia, hasta el inicio de este trabajo.

### **1.2.2. Mejoramiento genético en soya**

La soya es una planta que se ha sometido a mejoramiento desde tiempos remotos, cuando las poblaciones humanas seleccionaron genotipos silvestres según su conveniencia, en un proceso de domesticación de la planta. Las primeras características que fueron seleccionadas comprendieron plantas con semillas más grandes, mayor área foliar, floración temprana, altura reducida y tallo grueso (Qiu y Chang, 2010).

Trabajos de mejoramiento genético en la especie se han reportado desde inicios del siglo XX. La estrategia usada en estos primeros ensayos fue recolectar variedades silvestres de soya, o con un grado intermedio de domesticación, y por medio de hibridación sexual con variedades de mayor domesticación producir segregantes con características superiores en producción o tolerancia a diferentes tipos de estrés, de amplio uso comercial (Qiu y Chang, 2010). El uso de variedades de soya mejoradas ha demostrado un incremento en el rendimiento del cultivo, y por ende un incremento en su rentabilidad (Ridner *et al.*, 2006).

Entre 1972 a 1997, en Estados Unidos y Canadá se desarrollaron programas de mejoramiento sobre características como resistencia al acame, fijación de nitrógeno y tolerancia a algunos tipos de estrés, lo que condujo a un incremento de 31,4 kg/ha/año en la producción de soya (Cober *et al.*, 2009). El mejoramiento genético ha jugado un papel dominante en la mejora del rendimiento del cultivo, junto a la adopción de prácticas de cultivo como el incremento de la densidad de plantación, lo que se logra al desarrollar variedades de menor índice de área foliar y mayor eficiencia fotosintética. Otra mejora genética orientada a la calidad de la semilla, comercialmente disponible, es una variedad con producción reducida de ácido linoleico (1%), desarrollada por la “Iowa State University” (Estados Unidos) (Cober *et al.*, 2009). En la Tabla 1-1 se resumen las principales características introducidas al cultivo de soya por ingeniería genética.

**Tabla 1-1:** Tecnologías transgénicas desarrolladas en soya disponibles comercialmente en la actualidad. Elaborado a partir de datos tomados de <http://cera-gmc.org/>.

Característica de interés	Especificación de la característica	Nombre de la tecnología	Compañía productora
Tolerancia a herbicidas	Tolerancia a glifosato	Roundup Ready	Monsanto, Pioneer-Dupont, Dow AgroSciences, Syngenta
		Genuity	Monsanto, Pioneer-Dupont, Syngenta
	Tolerancia a glufosinato de amonio	LibertyLink	Bayer, Pioneer-Dupont
	Tolerancia a sulfonilurea	STS	Pioneer-Dupont, Dow AgroSciences, Syngenta
	Tolerancia a imidazolinonas	Clearfield	Basf
	Tolerancia a glifosato + tolerancia a inhibidores de acetolactato sintasa (ALS)	Optimum GAT	Pioneer-Dupont
Calidad del aceite	Producción mayoritaria de ácido oleico	Plenish	Pioneer-Dupont
		Vistive Gold	Monsanto
	Producción de ácido omega-3	SDA Omega-3	Monsanto
Manejo de plagas	Protección contra insectos lepidópteros plaga y tolerancia a glifosato	INTACTA PRO RR2	Monsanto



La soya Roundup Ready® (RR) desarrollada por la compañía Monsanto es un desarrollo que implicó la transformación genética de la planta usando la tecnología del ADN recombinante, produciendo lo que se considera un organismo GM. La soya RR fue uno de los primeros cultivos GM que alcanzó el mercado, iniciando su comercialización en 1996 y alcanzando un 54% del total de hectáreas de soya sembradas en Estados Unidos para el año 2000. La soya RR es tolerante al herbicida glifosato, el ingrediente activo del herbicida comercial Roundup®, también producido por Monsanto. Su desarrollo y uso se asocian a un control de malezas más efectivo, con rendimientos iguales o superiores a los obtenidos con cultivares tradicionales (Cober *et al.*, 2009). Otro avance en transgénesis de soya ha sido la producción de plantas con alto contenido de ácido oleico mediante silenciamiento génico, logrado por la empresa DuPont.

Existen colecciones de germoplasma de soya en todo el mundo. China tiene la colección más grande, con 23.578 accesiones, seguido por Estados Unidos con cerca de 18.000 accesiones, y el Centro asiático de investigación y desarrollo vegetal (AVRDC por sus siglas en inglés) en Taiwán con 12.508 accesiones. Otros países con colecciones importantes de germoplasma de soya incluyen Japón, Rusia, Ucrania, India y Brasil (Cober *et al.*, 2009). En Colombia se conserva una colección de soya en CORPOICA en el banco de germoplasma del Centro de Investigación Tibaitatá, según el inventario del 2013, donde hay 1.237 accesiones sin duplicados, y el banco de germoplasma de trabajo en Centro de Investigación La Libertad con 26 accesiones (Samuel Caicedo Guerrero, comunicación personal).

La susceptibilidad a ser transformada vía *Agrobacterium* está determinada por el genotipo en el cultivo de soya, siendo la transformación menos eficiente comparado con otros cultivos, como tabaco, petunia o tomate (Meurer *et al.*, 1998). Una transformación eficiente puede depender de varios factores, tales como el potencial de regeneración de la variedad en cultivo *in vitro*, asociado al vigor general de la planta y del explante utilizado, y la respuesta a los agentes de selección. Variedades más resistentes a enfermedades microbianas pueden igualmente resistir la infección por *Agrobacterium* dificultando su transformación, ante lo cual se ha optado por usar cepas hipervirulentas que sobrepasen las barreras defensivas de la planta (Meurer *et al.*, 1998; Paz *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2013). Otro factor que afecta la transformación es el proceso utilizado en la desinfección de las semillas como material de partida, ya que en este proceso se emplean agentes

tóxicos como el hipoclorito de sodio y el gas cloro. El tiempo que se mantenga a las semillas bajo tratamiento define la aparición de contaminantes, en caso de ser muy bajo, o la disminución en la germinación y regeneración, en caso de ser muy alto (Paz *et al.*, 2004). Escanear genotipos de soya dentro de los recursos de germoplasma disponibles, con relación a su posibilidad de transformación genética mediada por *Agrobacterium*, es un requisito indispensable para adelantar programas de ingeniería genética, y optimizar los sistemas de transformación empleados (Song *et al.*, 2013).

### 1.2.3. Soya y malezas

Las malezas no constituyen una categoría separada de plantas en la naturaleza. El término fue propuesto para referirse a cualquier planta que interfiere con las actividades agrícolas que desarrolla el ser humano, y por tanto se constituye en un obstáculo para garantizarse una fuente continua de alimento. Estas plantas se caracterizan por ser bastante exitosas en la colonización de ambientes disturbados, como los que genera la actividad agrícola, lo que sugiere un avanzado nivel de coevolución con el ser humano (Bradley *et al.*, 2009; Kelton y Price, 2009; Zimdahl, 2013).

En general, las malezas comparten las características de germinación rápida y reproducción en un estadio temprano; maduración rápida o tiempo corto en estado vegetativo; modos de reproducción sexual y asexual; plasticidad ante condiciones ambientales; autocompatibilidad; las semillas son bastante resistentes y pueden permanecer en estado de dormancia ante condiciones adversas, además se producen en grandes cantidades y tienen mecanismos de dispersión de rango corto y largo; y tienen una gran habilidad competitiva por nutrientes, luz y agua, utilizando mecanismos como la formación de rosetas, enredaderas y alelopatía. También pueden ser portadores de microorganismos patógenos, insectos y nematodos plaga que pueden afectar el cultivo e incrementar los costos de producción. La calidad de la cosecha se ve igualmente afectada por la competencia que supone la presencia de malezas (Kelton y Price, 2009; Zimdahl, 2013).

La soya es una planta que puede competir eficientemente contra las malezas una vez el cultivo ha desarrollado su dosel, estrechando y posteriormente cerrando las calles del sembrado. Pero las especies vegetales invasoras que aparecen en las fases iniciales del

establecimiento del cultivo pueden afectar severamente su producción. Por ello, el manejo de malezas en este cultivo debe darse en las etapas tempranas del crecimiento del cultivo para darle a las plantas una ventaja competitiva, minimizando así posibles efectos nocivos de las malezas sobre la producción. El manejo integrado de malezas incluye medidas como la rotación de cultivos, prácticas culturales adecuadas, la utilización de maquinaria apropiada y un buen uso de los herbicidas (Sylvester, 2009).

Las especies vegetales que son invasoras en el cultivo de soya están relacionadas con la región geográfica donde se desarrolla el cultivo (especies nativas), y con las prácticas de rotación de cultivos, ya que un cultivo anterior puede favorecer una determinada especie invasora. Hay una gran cantidad de especies vegetales que pueden considerarse malezas en el cultivo de soya. En la Tabla 1-2 se observan algunas de ellas para la región del Piedemonte Llanero colombiano.

**Tabla 1-2:** Malezas comunes en los sistemas de rotación maíz-soya y arroz-soya en el Piedemonte Llanero colombiano. Tomado de Bernal, 2006.

<b>Nombre vulgar</b>	<b>Nombre científico</b>
Batatilla	<i>Ipomoea spp.</i>
Cadillo	<i>Cenchrus echinatus</i>
Caminadora	<i>Rottboelia cochinchinensis</i>
Coquito	<i>Cyperus sculentum</i>
Cortadera	<i>Cyperus ferax</i>
Cortadera	<i>Cyperus luzulae</i>
Chilinchil	<i>Cassia tora</i>
Chumbimbo	<i>Cardiospermum halicacabum</i>
Falsa caminadora	<i>Ischaemum rugosum</i>
Guarda rocío	<i>Digitaria sanguinalis</i>
Guarda rocío	<i>Digitaria horizontalis</i>
Liendre puerco	<i>Echinochloa colonum</i>
Papunga	<i>Bidens pilosa</i>
Pata gallina	<i>Eleusine indica</i>
Piñita	<i>Murdannia nudiflora</i>
Verdolaga	<i>Portulaca oleracea</i>
Yerba socialista	<i>Emilia sonchifolia</i>

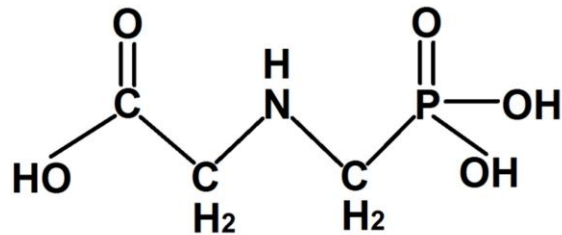
Para combatir la aparición de malezas se suelen llevar a cabo prácticas de diferente naturaleza. Entre ellas se encuentran evitar la dispersión de semillas invasoras desde un campo invadido a otro campo limpio a través del equipo agrícola, animales de pastoreo, corrientes de agua u otros vehículos; sembrado y fertilización adecuados, y establecimiento óptimo de densidades de siembra (espaciamiento corto), que conduzcan a una germinación, emergencia y cierre rápido de calles; rotación de cultivos; el uso de variedades vigorosas de soya; manejo mecánico y manejo químico de las malezas (Bernal, 2006).

El manejo químico se refiere al uso de sustancias tóxicas para las plantas que limiten el crecimiento de las especies no deseadas. Estas sustancias se pueden aplicar al cultivo antes de sembrar (herbicidas de pre-siembra), inmediatamente después de la siembra y antes de la germinación del cultivo (herbicidas pre-emergentes), y después de la emergencia del cultivo y las malezas, cuando tanto el cultivo como las malezas tengan una altura ideal (herbicidas posemergentes). Además, también deben considerarse las características físicas del suelo (contenidos de arena, limo, arcilla y materia orgánica), el comportamiento del herbicida en el suelo (fotodescomposición, volatilización, disolución, adsorción a coloides, etc.), la efectividad del herbicida sobre las malezas particulares del cultivo, las condiciones climáticas del momento de la aplicación y el método de aplicación seleccionado para el deshierbe (Bernal, 2006).

### **1.3. Glifosato**

El glifosato, cuyo nombre químico es N-(fosfonometil) glicina, y fórmula  $C_3H_8NO_5P$  (Figura 1-1), es un ácido blanco, inoloro, que se presenta en forma de polvo cristalino, con un punto de fusión de 184,5 °C, un peso molecular de 169,1 g y una gravedad específica de 1,704. Este compuesto no es inflamable ni explosivo y tiene una presión de vapor de  $1,84 \times 10^{-7}$  mm Hg a 45°C. El glifosato es relativamente un ácido fuerte, con un pH 2 en solución acuosa al 1%. Su solubilidad en agua es de 1,2 wt% a 25°C, y aproximadamente 6 wt% a 100 °C. Es ligeramente soluble en unos pocos ácidos orgánicos fuertes, y relativamente insoluble en la mayoría de solventes orgánicos. Debido a su deficiente solubilidad en agua, las formulaciones comerciales de glifosato lo incluyen en forma de sales de isopropilamina, amonio o fosfonio entre otras (Farmer, 2001).

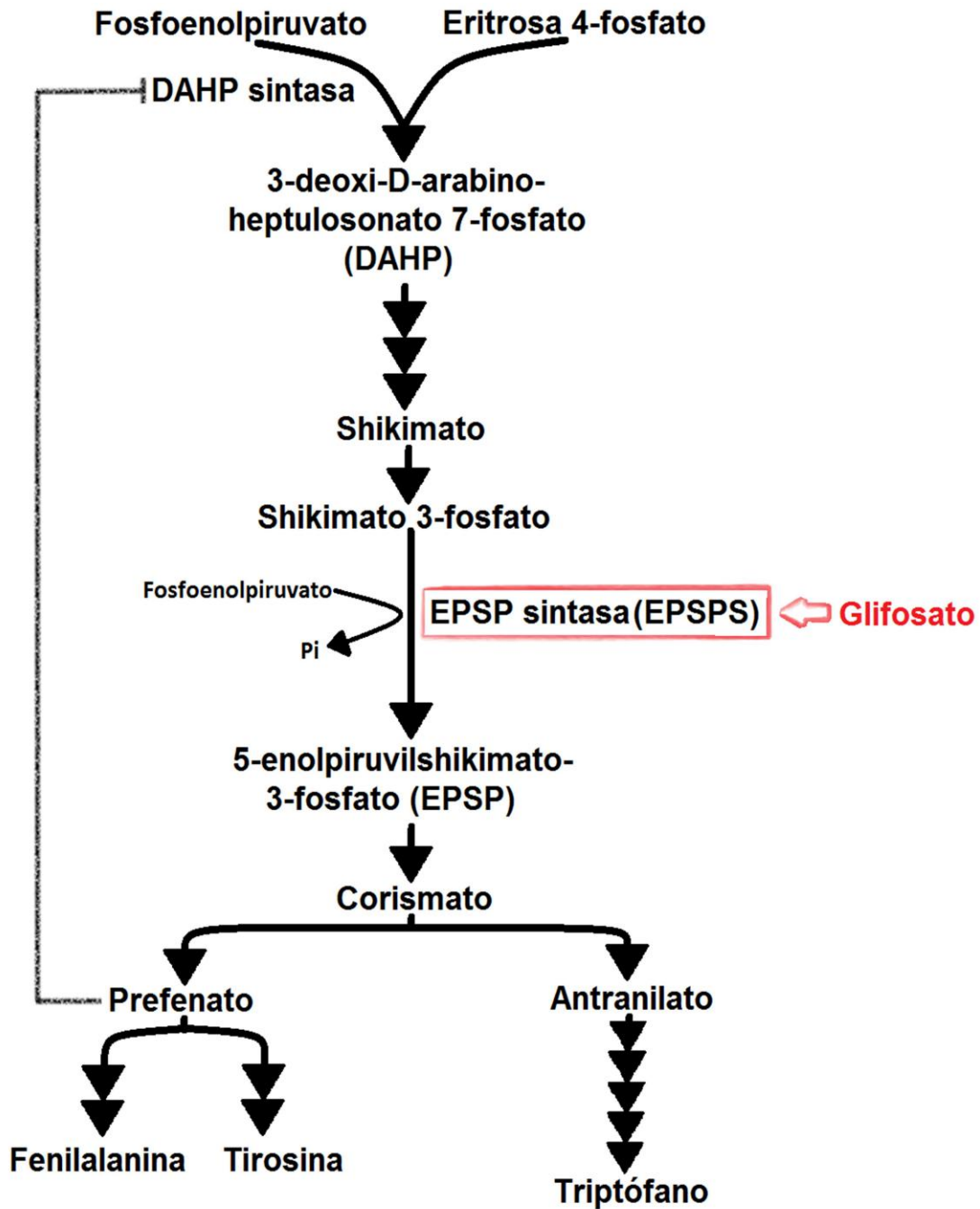
**Figura 1-1:** Fórmula química del herbicida glifosato



El glifosato es un herbicida sistémico pos-emergente, de amplio espectro, con actividad sobre prácticamente todas las plantas anuales y perennes. Se usa alrededor de todo el mundo en el control de malezas en ámbitos agrícolas, industriales, de silvicultura y residenciales (Farmer, 2001).

El blanco del glifosato es la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), perteneciente a la ruta metabólica de síntesis de aminoácidos aromáticos (ruta del shikimato) (Figura 1-2). El glifosato inactiva la EPSPS debido a que es un análogo de un estado de transición del fosfoenolpiruvato, uno de los sustratos de la EPSPS. La inhibición conduce a la disminución de la inhibición de la ruta por retroalimentación, resultando en un flujo masivo de carbono, transformado en altos niveles de shikimato que se acumulan en los tejidos de la planta. La muerte de la planta se da probablemente por deficiencia de aminoácidos para la síntesis de proteínas, o por el incremento del flujo de carbono hacia la ruta del shikimato, lo que descompensa otras rutas metabólicas vitales. Todas las EPSPS vegetales son sensibles al glifosato, lo que hace que este sea un herbicida no selectivo (Duke y Powles, 2008)

**Figura 1-2:** Ruta del shikimato para la producción de aminoácidos aromáticos. En rojo se indica el blanco de la actividad del herbicida glifosato.



Adaptado de Duke y Powles, 2008.

## 1.4. Cultivos GM y tolerancia a herbicidas

La introducción comercial de cultivos GM tolerantes a herbicidas se inició en 1995 en Estados Unidos, con la introducción de una variedad de algodón tolerante a bromoxinil y canola tolerante al glufisinato de amonio, aunque el primero tuvo poca penetración en el mercado. El año siguiente (1996) se introdujo el primer cultivo tolerante a glifosato, que correspondió a una variedad de soya, y ha sido esta tecnología la de más amplia difusión y aceptación a la fecha (Duke y Cerdeira, 2010). Estos cultivares representan el 100% de la soya cultivada en Estados Unidos y Argentina, y el 96,5% de la soya cultivada en Brasil a 2016, conteniendo bien sea la característica exclusiva de tolerancia a herbicida, o de forma apilada con la característica de resistencia a insectos plaga. Para ese mismo año (2016), los cultivos de soya transgénica correspondieron al 50% del área total sembrada con cultivos biotecnológicos en el mundo, y el 78% de los cultivos de soya (incluyendo soya convencional), con un total global de 91,4 millones de hectáreas en 11 países (ISAAA, 2016). La tolerancia a herbicidas es una característica que ha sido favorablemente adoptada por los agricultores de diversos países productores como Estados Unidos, Argentina, Brasil y Canadá principalmente. Se ha estimado que aproximadamente el 90% de las plantas GM tolerantes a herbicidas que se cultivan en el mundo son cultivares tolerantes a glifosato, y están representadas principalmente por la soya, algodón, canola y maíz (Owen, 2010).

Para conferir tolerancia a los herbicidas u otras fitotoxinas en las plantas se han aplicado diversos enfoques. El blanco molecular del herbicida puede ser modificado de tal forma que esta sustancia no logre acoplarse a su objetivo y se genere una tolerancia. También se puede introducir en las plantas genes que codifiquen para enzimas que inactiven o degraden los herbicidas. Otra estrategia es generar en la planta un mecanismo que prevenga que el herbicida alcance su blanco molecular, incluyendo secuestro químico, translocación, o disminución en la internalización (Duke y Cerdeira, 2010).

En el caso de la tolerancia a glifosato, los desarrolladores aprovecharon la existencia de versiones bacterianas de la EPSPS que no son afines con el herbicida. Se encontró un gen de esta naturaleza en la cepa CP4 de *Agrobacterium sp.*, que es el transgen utilizado en casi todos los cultivos GM tolerantes al herbicida, con algunas excepciones en maíz y canola (Duke y Cerdeira, 2010).

La amplia adopción de cultivos GM tolerantes a herbicidas ha generado impactos positivos en los sistemas de producción agrícola, tales como un incremento en el nivel de control de malezas y consistencia en la eficacia del uso de herbicidas en comparación con los sistemas tradicionales, haciendo más sencillo este proceso; control en el impacto ambiental de los herbicidas al promover el uso de glifosato o glufosinato de amonio, los cuales se usan en fase post-emergente y tienen comportamiento edáfico y toxicológico favorable; favorecen la adopción de prácticas conservacionistas de cultivo, como el sistema de labranza mínima, el cual reduce la erosión del suelo, mejora la calidad del agua y disminuye la degradación del suelo (Owen, 2010; Green, 2012). Igualmente se han documentado efectos negativos asociados al uso de cultivos GM tolerantes a herbicidas, particularmente a glifosato, consistentes en la aparición de genotipos de malezas tolerantes al herbicida (Bonny, 2016). Estos efectos se han asociado principalmente a prácticas culturales relacionadas con el arado, momento de aplicación del herbicida, presencia de malezas filogenéticamente relacionadas al cultivo sembrado y falta de rotación de cultivos y herbicidas (Colbach *et al.*, 2017).

El glifosato es uno de los herbicidas más efectivos y útiles que existen. Es de acción lenta, lo que facilita su translocación desde las hojas hacia tejidos meristemáticos, incluyendo los que están bajo tierra. Tiene unas buenas características de seguridad ambiental, entre ellas su baja toxicidad hacia otros organismos. No es muy móvil en el suelo, lo que reduce su arrastre hacia cuerpos acuáticos, y tiene una vida media relativamente corta en el suelo. Antes de la introducción de cultivos GM tolerantes a glifosato, éste solo podía ser usado en lugares en los que se quería evitar totalmente el crecimiento vegetal, o con métodos que evitaran su contacto con las plantas de interés, por lo que los cultivos GM abrieron la posibilidad de usarlos directamente sobre el cultivo (Duke y Cerdeira, 2010).

El principal impacto de los cultivos tolerantes a herbicidas es proveer de un sistema de control de malezas más económico y fácil de utilizar por los agricultores, en comparación con el sistema tradicional (Brookes y Barfoot, 2017). El agricultor puede hacer el control de malezas con una o dos aplicaciones de un herbicida específico durante el ciclo de crecimiento, en lugar de usar estrategias complicadas que incluyen diferentes herbicidas, incorporados al suelo o de aplicación foliar. También lo puede aplicar únicamente cuando observe que hay crecimiento de malezas, debido a su acción pos-emergente. Esta



tecnología promueve el uso de una cantidad limitada de herbicidas, generalmente los de menor toxicidad hacia el humano y menor recalcitrancia en el ambiente, reduciendo así la incidencia de intoxicaciones en trabajadores agrícolas e impactos ambientales negativos. El arado se puede reducir, e incluso eliminar, lo que reduce el gasto en combustibles fósiles en los equipos de arado, reduciendo así las emisiones de CO<sub>2</sub> y reduciendo el disturbio mecánico sobre el suelo (Green, 2012).

Respecto a la adopción de soya tolerante a herbicidas por parte de los agricultores, el principal beneficio observado ha sido una reducción en el costo de producción debido a la disminución en el gasto en herbicidas. En 2015, el uso de soya tolerante a herbicidas aumentó los ingresos agrícolas brutos en 3.820 millones de dólares, y desde 1996 ha generado 50.000 millones de dólares de ingresos adicionales para los agricultores. Del total acumulado de ganancias sobre los ingresos agrícolas por el uso de soya tolerante a herbicidas, 23.600 millones de dólares (47%) se han debido al aumento de rendimiento o el uso como cultivo de rotación, y el restante 53% se ha debido al ahorro en los costos (Brookes y Barfoot, 2017).

## **1.5. Optimización de transgenes para mejores niveles de expresión en plantas transgénicas**

Cuando se trata de plantas transgénicas es importante obtener niveles de expresión adecuados de los genes que se introducen para generar una nueva y deseada característica de interés en la agricultura comercial. Cuando los transgenes tienen bajos niveles de expresión pueden llevar a efectos inesperados asociados a problemas de bioseguridad, o simplemente a que no se alcanza el efecto deseado. Cuando la naturaleza del transgen es procariota, el llevarlo a un sistema eucariota puede ser causa de expresión baja o ausente. Se ha encontrado que el uso de genes procariotas modificados de acuerdo con las características de sus contrapartes de plantas (aspectos de regulación transcripcional, estabilidad del ARNm, eliminación de secuencias de splicing a nivel del ARNm, utilización de promotores especiales, uso codónico y eficiencia traduccional) ha permitido obtener niveles de expresión de hasta 100 veces mayor que sus versiones sin modificar (Perlak *et al.*, 1993; Strizhov *et al.*, 1996; Liu, 2009).

## 1.6. Derechos de propiedad intelectual sobre desarrollos biotecnológicos

Los cultivos GM son un resultado de la investigación científica que ha sido rápidamente adoptado por los agricultores debido a los beneficios que aporta, pero que han sido objeto de controversia, debido a las posiciones políticas de grupos ecologistas radicales. Variedades GM de uso comercial han sido desarrolladas desde 1994, entre las cuales se incluyen plantas resistentes a insectos plaga, resistentes a virus, tolerantes a herbicidas, tolerantes a sequía, y con mejoras en calidad, como el clavel azul (Chaparro-Giraldo, 2011). Las entidades que han desarrollado la mayor parte de los cultivos GM comerciales, que en su mayoría corresponden a corporaciones multinacionales, han protegido cada uno de los elementos involucrados en el proceso como secuencias de ADN, vectores, cepas bacterianas, variedades vegetales, protocolos de transformación vegetal, protocolos de cultivo de tejidos, etc., mediante derechos de propiedad intelectual (DPI), que según las normas que rigen en cada país pueden asignarse en forma de marcas, patentes y/o títulos de obtentor de variedades vegetales (Chaparro-Giraldo y Ávila, 2013).

Para evitar infringir cualquier tipo de protección que exista sobre los desarrollos tecnológicos asociados a la producción de plantas transgénicas, previamente a la liberación comercial de nuevas variedades GM, e incluso a la puesta en marcha del proyecto de diseño y construcción de esta nueva variedad, se debe llevar a cabo un análisis de libertad de operación. Este estudio parte de descomponer la nueva variedad GM en cada uno de sus componentes biológicos y procesos implicados en su construcción, teniendo en cuenta la región geográfica donde se desea liberar comercialmente el cultivo. Luego se hace una búsqueda exhaustiva de patentes u otras formas de protección a los DPI de cada uno de los elementos, global y localmente (Hincapié y Chaparro-Giraldo, 2013). Una vez se conoce el paisaje completo de DPIs que pueden estar involucrados en el desarrollo de la línea transgénica, se establece la estrategia para maximizar la libertad de operación estrategias que pueden ser: rediseñar las construcciones genéticas, establecer licencias libres de regalías, tramitar licencias de manera individual o a través de consorcios, o una combinación de todas las anteriores (Kryder *et al.*, 2000).

El desarrollo y liberación comercial de variedades GM se regula en los diferentes países que han adoptado esta tecnología, según las normativas locales. Por ejemplo, en China, las variedades vegetales transgénicas que se deseen comercializar deben superar cinco etapas de pruebas: investigación en laboratorio, pruebas a pequeña, mediana y larga escala y, certificación en bioseguridad; ya sean estas variedades producidas localmente o sean importadas (Yaya-Lancheros y Chaparro-Giraldo, 2007; Chaparro-Giraldo, 2011). Así mismo, en las fases de desarrollo y liberación se deben considerar las posibles restricciones que impongan las normativas de protección a los derechos de propiedad intelectual. Diferentes elementos y procesos dentro del desarrollo de una variedad GM pueden encontrarse sujetos a patentes o permisos controlados para su utilización que restringen su uso comercial. Tal es el caso de algunos vectores de clonación, cepas de *A. tumefaciens*, secuencias genéticas, entre otras. En algunos países es permitido patentar especies vegetales, mientras que en otros no, como en Colombia. Igualmente, si se precisa usar material genético nativo para el desarrollo de innovaciones biotecnológicas, en Colombia se necesitan en algunos casos permisos y contratos de acceso a recursos genéticos (Yaya-Lancheros y Chaparro-Giraldo, 2007; Chaparro-Giraldo, 2011).

## **1.7. Antecedentes del grupo de investigación en la generación de eventos transgénicos tolerantes a herbicidas en soya**

En 2014, Jiménez diseñó una serie de casetes de expresión para transformación genética vegetal, que conferían tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio, a los que nombró E-IGP, E-IGP2 y E-2, para tolerancia a glifosato; y Bar-IGP y Bar-2 para tolerancia a glufosinato de amonio. La finalidad de uso de estos casetes era para transformación de soya, así que, como primer paso en el proceso de diseño, desarrolló una optimización de uso codónico para soya de las secuencias codificantes de la proteína CP4 EPSPS en los casetes E-IGP y E-IGP2, y para la proteína Bar en el casete Bar-IGP. Para validar la funcionalidad de los casetes diseñados, Jiménez transformó explantes de *Nicotiana benthamiana* con los casetes E-IGP y Bar-IGP, encontrando que plantas que integraron los transgenes en su genoma efectivamente expresaban las proteínas de interés. Además, desarrolló un estudio de libertad de operación sobre los casetes de

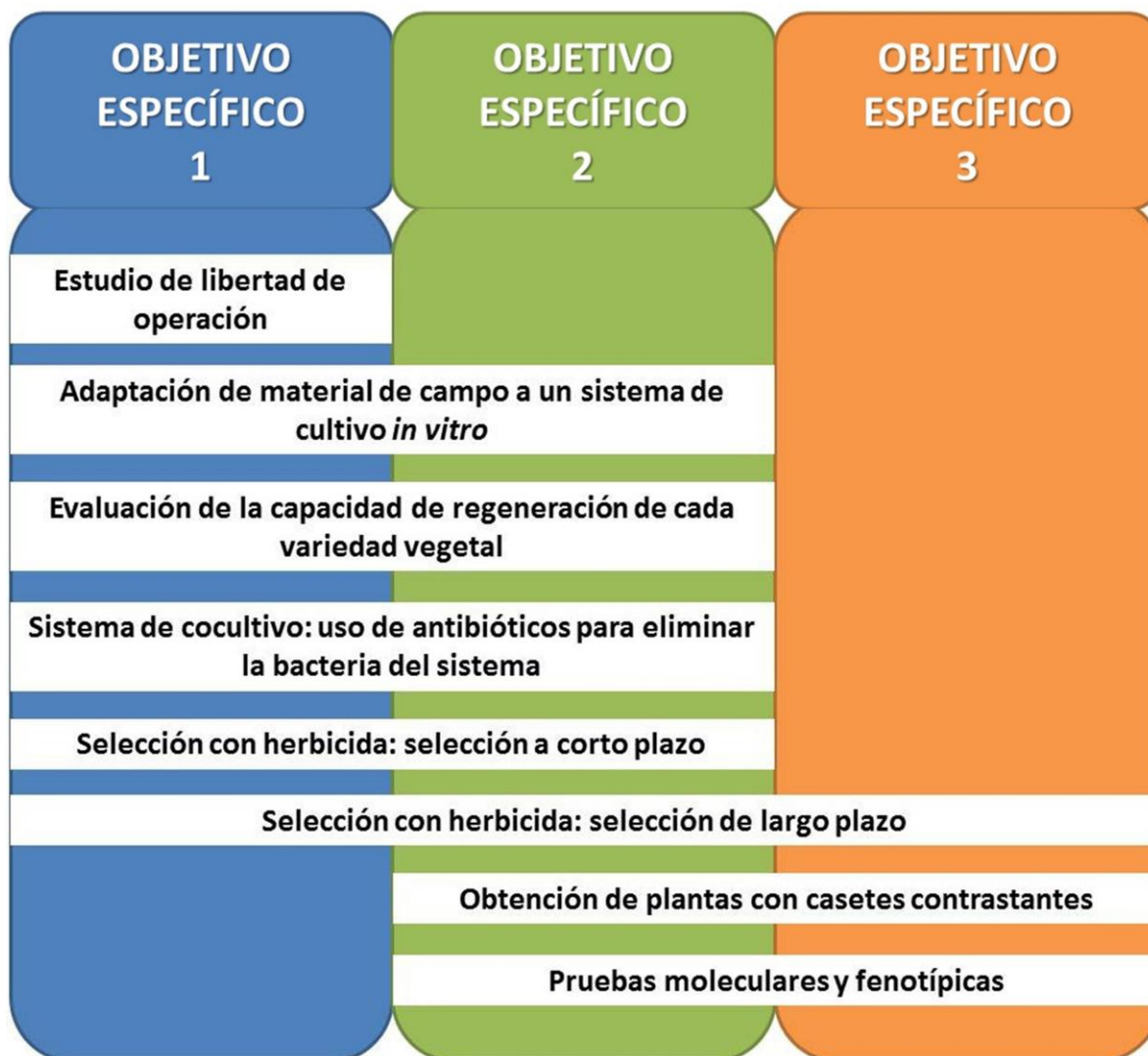
expresión para comercialización en territorio colombiano, encontrando que no había restricciones para su comercialización (Jiménez y Chaparro-Giraldo, 2016).

Simultáneamente al trabajo de Jiménez (2014), Gómez (2013) avanzó en la evaluación de tratamientos de desinfección de semillas de soya con sustancias líquidas, y en el uso de hormonas vegetales para la inducción de brotes múltiples en condiciones de cultivo *in vitro* de soya.

## 2. Capítulo 2: Metodología

Para alcanzar los objetivos propuestos se plantearon una serie de actividades, ligadas en la mayoría de los casos al logro simultáneo de diferentes objetivos como lo ilustra la Figura 2-1. Cada uno de estos puntos se irá desarrollando dentro del documento para la comprensión del proceso.

**Figura 2-1:** Actividades asociadas al cumplimiento de los objetivos propuestos.



## 2.1. Lugar de trabajo

El presente trabajo fue desarrollado dentro de las actividades del grupo de investigación en Ingeniería Genética de Plantas, de la Facultad de Ciencias - Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular y área de Cultivo de Tejidos vegetales del Departamento de Biología, y en el área de cuartos controlados de crecimiento vegetal en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia.

## 2.2. Estudio de libertad de operación

Considerando el interés del grupo de investigación por generar variedades GM con posibilidades futuras de comercialización, previo al inicio de las actividades del laboratorio y al final del proceso, se desarrolló un estudio de libertad de operación para evitar, hasta donde sea posible, la violación de derechos de terceros. Inicialmente se establece la lista de elementos (materiales biológicos, protocolos) que se van a utilizar en el desarrollo de la línea transgénica. Luego se hace la búsqueda de patentes para cada uno de los elementos.

Se revisaron registros bibliográficos, enfocándose en el sistema de patentes. Para esto se utilizaron bases públicas de datos de patentes: Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos (<https://www.uspto.gov/patents-application-process/search-patents>), ESPACENET de la Oficina de Patentes Europea (<https://worldwide.espacenet.com/>), “The Lens” especializada en desarrollos en ciencias aplicadas (<https://www.lens.org/lens/>), PATENTSCOPE de la Organización Mundial de Propiedad Intelectual (<https://patentscope.wipo.int/search/es/search.jsf>), y Superintendencia de Industria y Comercio (<http://sipi.sic.gov.co/sipi/Extra/IP/PT/Qbe.aspx?sid=636372817312608100>). Igualmente se revisaron secuencias depositadas en bases de datos de acceso libre, como la base de nucleótidos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), la base de datos japonesa de DNA (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>), Phytozome (<http://www.phytozome.net/>), entre otros. Primero se hace la búsqueda global, para determinar la existencia de patentes sobre los elementos usados en el desarrollo de la innovación, en el escenario internacional. Luego se hace la búsqueda local, para determinar cuáles de esas patentes

han sido solicitadas nacionalmente, y si están vigentes, o si existe alguna que solo haya sido solicitada localmente. A partir de esa información se establece la estrategia para maximizar la libertad de operación de la futura línea transgénica de soya tolerante a glifosato.

Es importante señalar que los resultados del estudio de libertad de operación son contextuales, deben ser actualizados continuamente y validados por un abogado especializado en propiedad intelectual, antes de la liberación comercial. Este es un campo que tiene una enorme complejidad, y puede causar efectos legales negativos, si no se procede adecuadamente.

### 2.3. Material vegetal

Como material vegetal se emplearon las variedades de soya Soyica P-34, SK7 y P29, que fueron seleccionadas porque tenían la mayor demanda comercial por parte de los productores colombianos, a la fecha de planteamiento de este trabajo. Estas variedades han sido desarrolladas por fitomejoramiento convencional por parte de una institución de carácter público (Instituto Colombiano Agropecuario) y dos empresas privadas (Semillas Kamerún y Semillas Panorama), quienes las han seleccionado por su alta adaptación al cultivo en agroecosistemas colombianos. Sus características se detallan en la Tabla 2-1.

**Tabla 2-1:** Variedades de soya empleadas en el presente estudio

<b>Variedad</b>	<b>Soyica P-34</b>	<b>SK7</b>	<b>P29</b>
<b>Adaptación (msnm)</b>	300-1.200	300-1.200	300-1.200
<b>Tipo de crecimiento</b>	Determinado	Semideterminado	Indeterminado
<b>Período vegetativo (días)</b>	110	110 – 112	105 – 115
<b>Altura de la planta (cm)</b>	69	101	100
<b>Color de flor</b>	Blanca	Blanca	Lila
<b>Color de pubescencia</b>	Café	Café	Café
<b>Color del grano</b>	Amarillo, hilium negro	Amarillo, hilium negro	Amarillo, hilium café
<b>Peso de 100 semillas (g)</b>	19	22,1	7,5
<b>Contenido de aceite (%)</b>	20	20,47	21,37
<b>Contenido de proteína (%)</b>	39	38,66	40,07

**Tabla 2-1:** (Continuación)

<b>Población recomendada (plantas/ha)</b>	450.000	400.000	200.000
<b>Rendimiento comercial (kg/ha)</b>	2.700	2.600	2.600
<b>Desarrollador</b>	Instituto Colombiano Agropecuario	Semillas Kamerún	Semillas Panorama

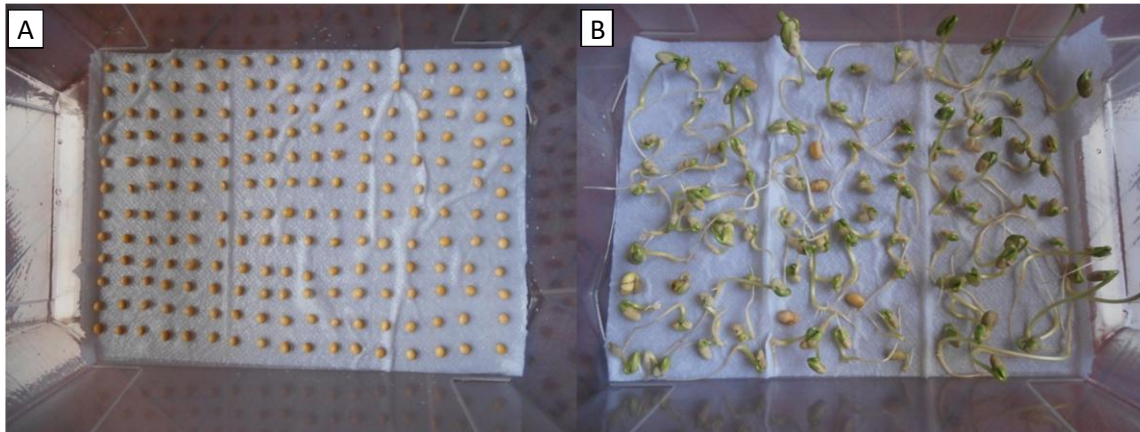
## **2.4. Adaptación de material de campo a un sistema de cultivo *in vitro***

El material vegetal de partida consistió en semillas maduras donadas por las empresas Semillas Kamerún (Cartago – Valle del Cauca), quienes proveyeron las variedades SK7 y Soyica P34; y la empresa Semillas Panorama (Ibagué – Tolima), quienes facilitaron la variedad P29. Estas semillas fueron producidas en campo con fines de uso como semilla comercial. No presentaban ningún tipo de tratamiento fungicida o insecticida al momento de su utilización, y contenían entre 11 a 12% de humedad.

A partir de semillas de cada una de las variedades se estandarizó inicialmente la técnica adecuada de desinfección de semilla. Para determinar una posible afectación de la técnica de desinfección sobre la germinación y desarrollo fisiológico de plántulas, se estableció un valor de germinación basal de semillas por cada variedad, sin aplicar ningún tratamiento desinfectante. Para ello, se tomaron 200 semillas de cada variedad, que fueron depositadas dentro de una bandeja plástica conteniendo papel absorbente humedecido con agua (Figura 2-2A). Estas semillas germinaron en 5 días a 27°C, fotoperiodo 16/8 (luz/oscuridad) (Figura 2-2B), al cabo de los cuales se registró el porcentaje de germinación basal por variedad.



**Figura 2-2:** Prueba de germinación basal sin tratamiento desinfectante. A. Semillas dispuestas sobre papel absorbente humedecido con agua. B. Quinto día de germinación de semillas.

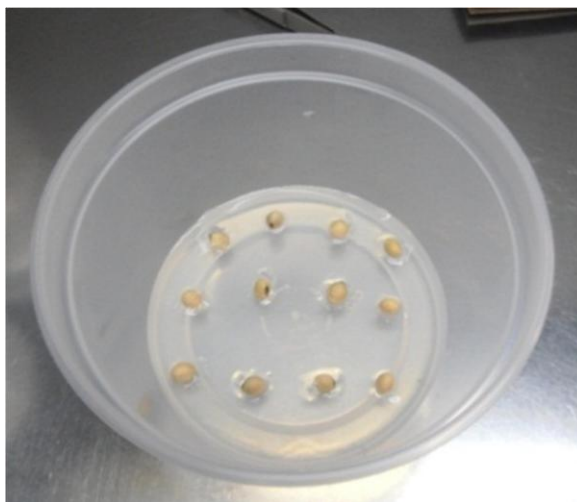


Una vez establecido un valor basal de germinación sin tratamiento desinfectante, se procedió a evaluar dos tipos de tratamientos:

1. Desinfección en fase líquida (DFL): Siguiendo la metodología planteada por Gómez (2013), se hizo un lavado inicial con agua jabonosa, seguido de lavado con etanol al 70% por 1 minuto y lavado con hipoclorito de sodio (NaClO) 3% adicionado con 2 gotas de Tween 20 por 15 minutos. Cada lavado con jabón, etanol e hipoclorito de sodio finalizó con tres lavados con agua destilada estéril, dentro de cabina de flujo laminar. Las semillas fueron luego sembradas sobre medio estéril.
2. Desinfección en fase gaseosa (DFG): Siguiendo la metodología de esterilización por gas cloro. En cabina de extracción de gases, las semillas se introducen dentro de un desecador de vidrio, y junto a ellas se hace una mezcla de 100 mL de hipoclorito de sodio al 5% más 4 mL de HCl 10N. El recipiente se sella y se permite el contacto de las semillas con el gas generado por la mezcla durante 16 horas. Al cabo de este tiempo se retiran las semillas del desecador y se emplean en los procesos subsecuentes dentro de cabina de flujo laminar, en condiciones de esterilidad (Paz *et al.*, 2004; Paz *et al.*, 2006).

144 semillas de cada variedad fueron sometidas a cada uno de los tratamientos (DFL y DFG). Una vez desinfectadas fueron sembradas sobre medio de germinación (0,7% de agar-agar disuelto en agua y esterilizado por autoclave) contenido dentro de cajas de polipropileno de 10 cm de diámetro por 6 cm de altura (Figura 2-3). Para cada variedad, las 144 semillas fueron distribuidas en 12 cajas conteniendo 12 semillas cada una (Figura 2-3).

**Figura 2-3:** Organización de las semillas sobre medio de germinación.



Las semillas se llevaron a germinación a 27°C, fotoperiodo 16/8 (luz/oscuridad), durante 5 días. Al cabo de este tiempo se contabilizó el porcentaje de germinación para cada variedad en los dos tratamientos. Tomando este dato se determinó la tolerancia de cada variedad al método de desinfección, según la ecuación:

$$\text{Tolerancia al método de desinfección} = \frac{\% \text{ de semillas germinadas en el tratamiento}}{\% \text{ de semillas germinadas en el control}} \times 100$$

El valor de tolerancia al método de desinfección permite evidenciar la afectación que causa el tratamiento (DFL y DFS) sobre la germinación de semillas de cada una de las variedades. Igualmente se hicieron observaciones sobre el desarrollo morfológico de los germinados.

Una vez desarrollada esta fase se seleccionó el tratamiento de desinfección de semillas que presentara una mayor tolerancia al método de desinfección para las tres variedades

en estudio. Se evaluó la influencia del genotipo vegetal con respecto a la capacidad de ser llevado a un sistema de cultivo *in vitro*, que requiere total ausencia de microorganismos ambientales, lo que a su vez influye en la posibilidad de transformar genéticamente dicha variedad.

## 2.5. Evaluación de la capacidad de regeneración de cada variedad vegetal

Después de seleccionar el método más adecuado de desinfección de semillas se procedió a evaluar la capacidad de regeneración del material vegetal. Para ello se tomaron 200 semillas de cada variedad vegetal, se sometieron a desinfección y se germinaron en esterilidad, sobre medio de germinación en las condiciones descritas anteriormente. Las plántulas germinadas proveen el explante de nudo cotiledonar utilizado en todos los procesos subsecuentes, el cual se prepara según lo planteado por Zhang *et al.* (1999) de la siguiente manera: se toman semillas germinadas durante 5 días, verdes y de apariencia sana (Figura 2-4A), y se les remueve la testa. Luego se corta el hipocótilo 5 mm debajo de la unión al cotiledón con un corte transversal (Figura 2-4B). Con un corte longitudinal, se divide el hipocótilo por la mitad de tal forma que se separen los dos cotiledones (Figura 2-4C). Cada mitad constituye un explante. Se retira la plúmula (primera hoja visible) y se hacen 7 a 12 cortes verticales (paralelos al eje embrionario) sobre la cara plana del cotiledón, en el sitio de unión cotiledón-hipocótilo, de 3 a 4 mm de longitud.

**Figura 2-4:** Preparación del explante de nudo cotiledonar. A. Semillas germinadas durante 5 días. B. corte del hipocótilo. C. Separación de los cotiledones. Explante completamente preparado.



Una vez preparados los explantes, se seleccionaron 240 explantes de nudo cotiledonar por cada una de las variedades vegetales, eligiendo aquellos que presentaran mejores características morfológicas (color verde, sin laceraciones ni manchas). Estos explantes fueron distribuidos en 40 cajas de polipropileno con medio de regeneración (sales B5 1X, vitaminas Gamborg 1X, sacarosa 30 g/L, bencil amino purina (BAP) 1,67 mg/L, MES 3mM, agar 7 g/L, pH 5,7), ubicando 6 explantes por caja con la cara adaxial hacia arriba (Figura 2-5).

**Figura 2-5:** Organización de explantes en medio de regeneración.



Se permitió el crecimiento y regeneración de los explantes durante 2 semanas, a 27°C con fotoperiodo 16/8 (luz/oscuridad). Al cabo de este tiempo se hizo reemplazo del medio de cultivo por medio de regeneración fresco, y se permitió el crecimiento durante 2 semanas más, bajo las mismas condiciones ambientales.

Al cumplirse 4 semanas de crecimiento en medio de regeneración se hizo conteo de los explantes que generaron brotes y de los que no lo generaron para cada una de las variedades. Igualmente, sobre cada uno de los explantes que sí generaron brotes se hizo el conteo de cuantos brotes fueron capaces de regenerar.

Esta medición permitió determinar la capacidad de cada genotipo vegetal para regenerar brotes en un sistema de regeneración *in vitro*, lo que afectaría la posibilidad de producir eventos genéticamente modificados usando como vehículo a la bacteria *A. tumefaciens*. Además, permitió avalar el sistema de regeneración propuesto sobre los genotipos vegetales en estudio.

## 2.6. Sistema de cocultivo

### 2.6.1. Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas en el presente estudio incluyeron la cepa de *A. tumefaciens* EHA105, adquirida por donación del Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (Cenicaña) al grupo de investigación de Ingeniería Genética de Plantas de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá; la cepa de *A. tumefaciens* AGL0, adquirida por compra directa al banco de cepas de la American Type Culture Collection (ATCC) bajo la denominación ATCC®BAA-100™, lote No. 1936214; y la cepa ATCC® 53213™, sin denominación particular de cepa dentro de las tradicionalmente referenciadas para *A. tumefaciens*, adquirida igualmente por compra directa al banco de cepas ATCC, lote No. 2818184. Esta última cepa se escogió debido a que tiene incluido el vector pMON546, el cual transfiere a células vegetales un transgén proveniente de petunia codificante de una enzima 5-enolpiruvil-3-fosfoshikimato (EPSP) sintasa que les confiere tolerancia a glifosato (Patente US 4971908). Cada una de las cepas se hizo crecer en medio de cultivo líquido Luria Bertani (LB), en un agitador temperado a 28°C, agitación de 200 rpm durante 18 horas. Al cumplirse este tiempo cada unidad de cultivo bacteriano fue mezclada a partes iguales con una solución estéril de glicerol al 40% para alcanzar una concentración final de glicerol de 20%. Se hicieron alícuotas de la biomasa microbiana con glicerol de 500µL cada una y se conservaron a -80°C hasta su utilización. Una vez retirada una alícuota del congelador de -80°C se consumía completamente o se descartaba el volumen restante, de tal modo que nunca se reutilizaran alícuotas microbianas.

Para hacer un acercamiento a la caracterización molecular de las cepas se hizo un ensayo de PCR múltiple, según el procedimiento descrito por Deeba *et al.* (2014), utilizando los juegos de primers detallados en la Tabla 2-2.

Para hacer un acercamiento a una caracterización fenotípica de las cepas en estudio se hizo una prueba de resistencia a los antibióticos kanamicina (50 mg/L), rifampicina (50 mg/L), vancomicina (100 mg/L), cloranfenicol (40 mg/L), gentamicina (70 mg/L), estreptomycin (70 mg/L) y espectinomicina (70 mg/L), adicionando cada antibiótico en medio de cultivo sólido Luria Bertani (LB), sembrando cada cepa bacteriana sobre medio

de cultivo con cada uno de los antibióticos y permitiendo crecimiento durante 24 horas a 28°C. Se registraron los resultados como positivo si había crecimiento bacteriano que indicaba que la cepa era resistente, o negativo si no se presentaba crecimiento bacteriano, lo que indicaba que la cepa era sensible al antibiótico.

**Tabla 2-2:** Primers usados para caracterización molecular de cepas de *Agrobacterium tumefaciens*. Secuencias tomadas de Deeba *et al.*, 2014

Nombre del set de primers	Secuencia primer directo (5'-3')	Secuencia primer reverso (5'-3')	Tamaño esperado de amplificado
Ach5FtsZ	GAACTTACAGGCGGGCTGGG T	CGCCGTCTTCAGGGCACTT TCA	369 pb
C58GlyA	CCACCACCACGACGCACAAG TCT	TGCCGAGACGGACACCCGA C	423 pb
pTiBo542	CCCGCTGAGAATGACGCCAA	CCTGCGACACATCGTTGCT GA	766 pb
nptI	CTGCGATTCCGACTCGTCCA	CGGGCAATCAGGTGCGACA	572 pb

### 2.6.2. Transformación de las bacterias con los casetes de tolerancia a herbicida

Los casetes de expresión utilizados en el presente trabajo corresponden a tres casetes previamente reportados como generadores de tolerancia al herbicida glifosato en plantas, tanto por parte del grupo de investigación en Ingeniería Genética de Plantas de la Universidad Nacional de Colombia (IGP), como por parte de Monsanto (Tabla 2-3). Todos codifican una proteína EPSPS con poca afinidad hacia el glifosato, lo que confiere la tolerancia al herbicida. Entre ellos difieren en las secuencias promotoras y las secuencias codificantes de la proteína EPSPS, según se muestra en la Tabla 2-3.

**Tabla 2-3:** Casetes de expresión utilizados en el presente trabajo

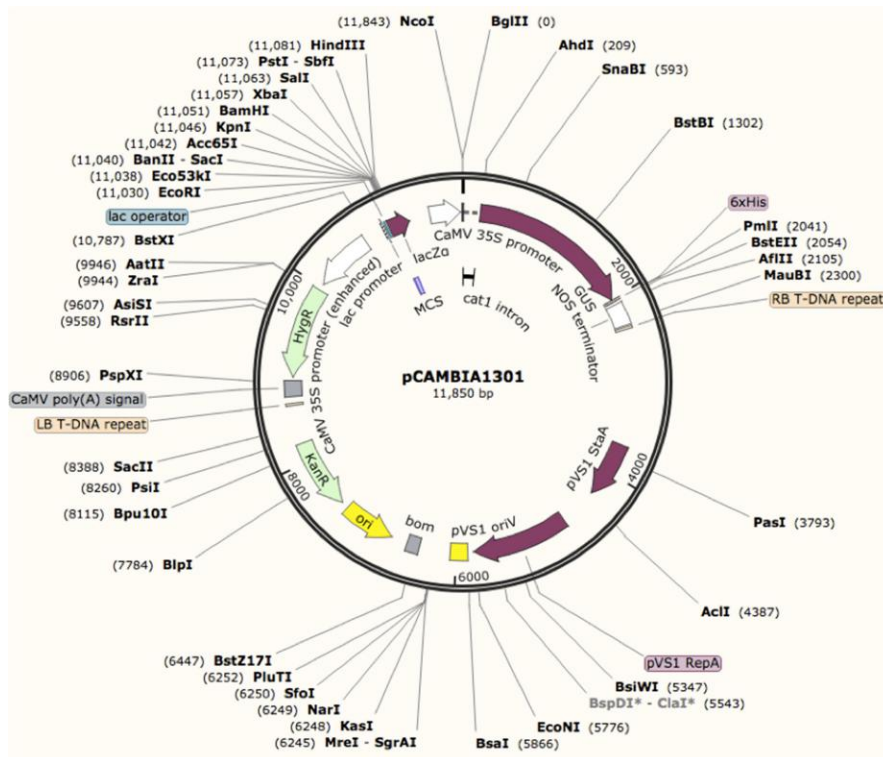
Nombre	Fuente	Promotor	Péptido de tránsito	Secuencia codificante	Terminador
E-IGP	Jiménez, 2014	GmUbi	Petunia	EPSPS CP4 optimizado	NOS
E-2	Patente US 5633435 / Jiménez, 2014	CaMV 35S (X2)	Petunia	EPSPS CP4 original	NOS
pMON546	Patente US 4971908	CaMV 35S	Petunia	EPSPS de Petunia	NOS

GmUbi: Ubiquitina de soya

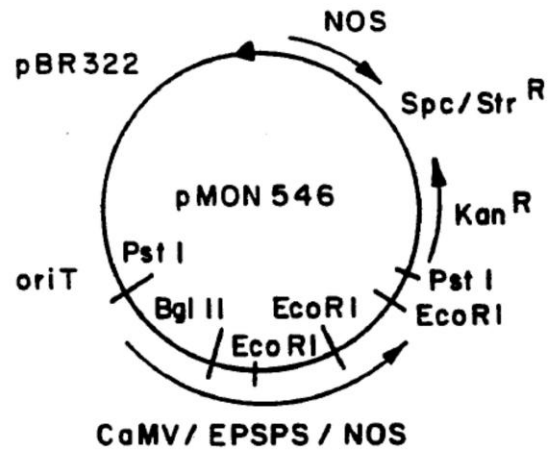
CaMV 35S: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor

Los casetes de expresión E-IGP y E-2 se encontraban incluidos dentro de un vector de transformación pCAMBIA1301 (Figura 2-6), y fueron diseñados por IGP. Estos casetes fueron sintetizados e insertados dentro del vector por parte de la empresa GeneRay Biotechnology (Shanghái – China, <http://www.generay.com.cn/english/gene.asp>). El casete pMON546 ya se encontraba insertado dentro de un vector de transformación vegetal (Patente US 4971908) (Figura 2-7).

**Figura 2-6:** Vector de transformación pCAMBIA1301.



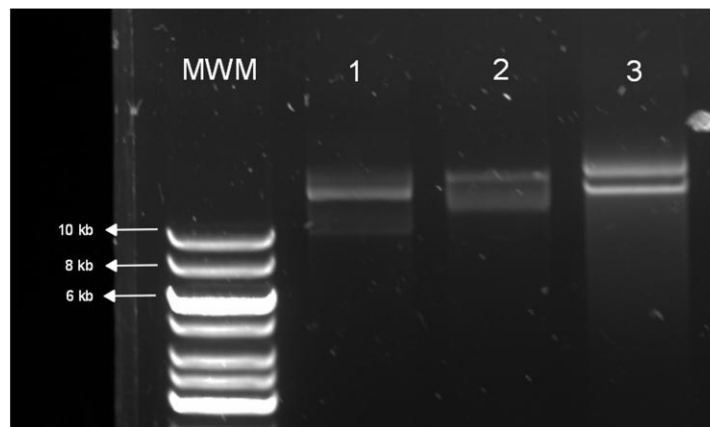
Tomado de <http://www.huayueyang.com.cn/product/276835254#>

**Figura 2-7:** Vector de transformación pMON546

Tomado de Patente US5188642A

Para transformar las cepas EHA105 y AGL0 con los vectores E-IGP y E2 según el caso, se extrajo cada vector a partir de cepas de *Escherichia coli* DHA5 $\alpha$  que contenían cada plásmido y que se encontraban crioconservadas en glicerol al 20% a -80°C, utilizando el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit® (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. También se hizo extracción de plásmidos de la cepa ATCC 53213 para ser utilizado como control en las pruebas moleculares. Para verificar que la extracción fue exitosa se analizaron 6 $\mu$ L del producto del miniprep en un gel de agarosa al 0,7% (Figura 2-8).

**Figura 2-8:** Verificación de la extracción de plásmidos por electroforesis en gel de agarosa 0,7%. El marcador de peso utilizado corresponde al GeneRuler 1 kb DNA Ladder® (Thermo Scientific) (carril MWM). Carril 1 vector E-IGP. Carril 2 vector E-2. Carril 3 vector pMON546.

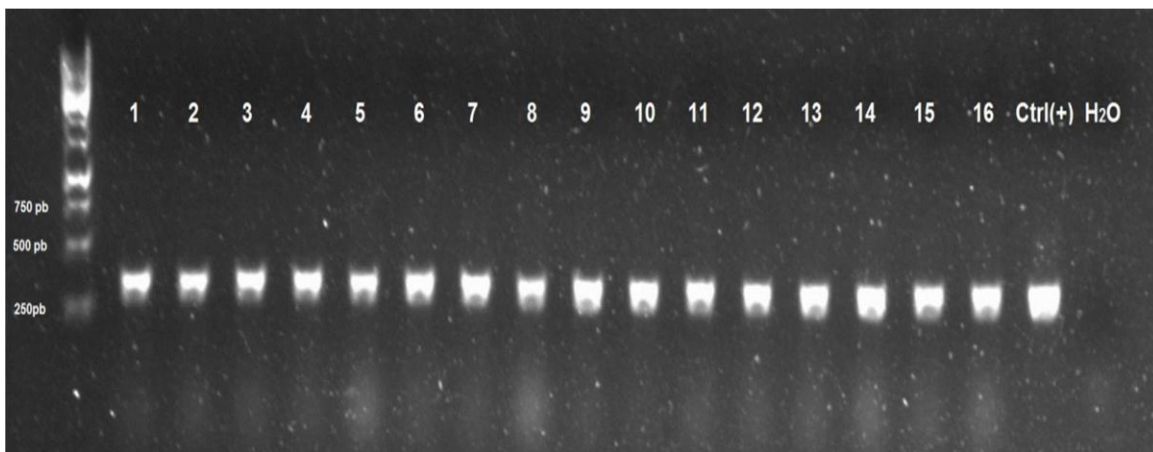




Por otra parte, se prepararon células electrocompetentes de las cepas EHA105 y AGL0 mediante lavados en glicerol estéril al 10% en frío, que fueron alicuotadas por 50µL y conservadas a -80°C hasta su utilización.

La transformación bacteriana se hizo por electroporación, utilizando el equipo MicroPulser™ (BioRad), en su programa predeterminado de transformación de *Agrobacterium* (1 pulso de 2,20 kV). Las células electrotransformadas fueron sembradas en agar LB adicionado con 50 mg/L de kanamicina, y se permitió su crecimiento durante 3 días. Al completarse este período se individualizaron 16 colonias de cada cepa y sobre ellas se hizo un ensayo de PCR de colonia para verificar si habían tomado el plásmido correspondiente. Se utilizaron los juegos de primers E-IGP (Dir: ACGTGCTCATGAACCCTACAC; Rev: GCTATACGGTGATCGAGATGC) y E-2 (Dir: ATATCCGATTCTCGCTGTCCG; Rev: CCATCAGGTCCATGAACTCC) reportados por Jiménez (2014) (Figura 2-9). Se escogió una de las colonias que hubieran resultado positiva a PCR en cada caso, y ésta fue utilizada para hacer las transformaciones vegetales.

**Figura 2-9:** Ensayo de PCR para verificación de la incorporación del plásmido vector en las cepas de *A. tumefaciens*. El marcador de peso utilizado corresponde al GeneRuler 1 kb DNA Ladder® (Thermo Scientific). Carriles 1 al 16 corresponden a 16 colonias individuales de la cepa EHA105 electrotransformadas con el vector E2. Carril Ctrl(+) corresponde plásmido vector. Carril H2O corresponde a un control absoluto (agua).

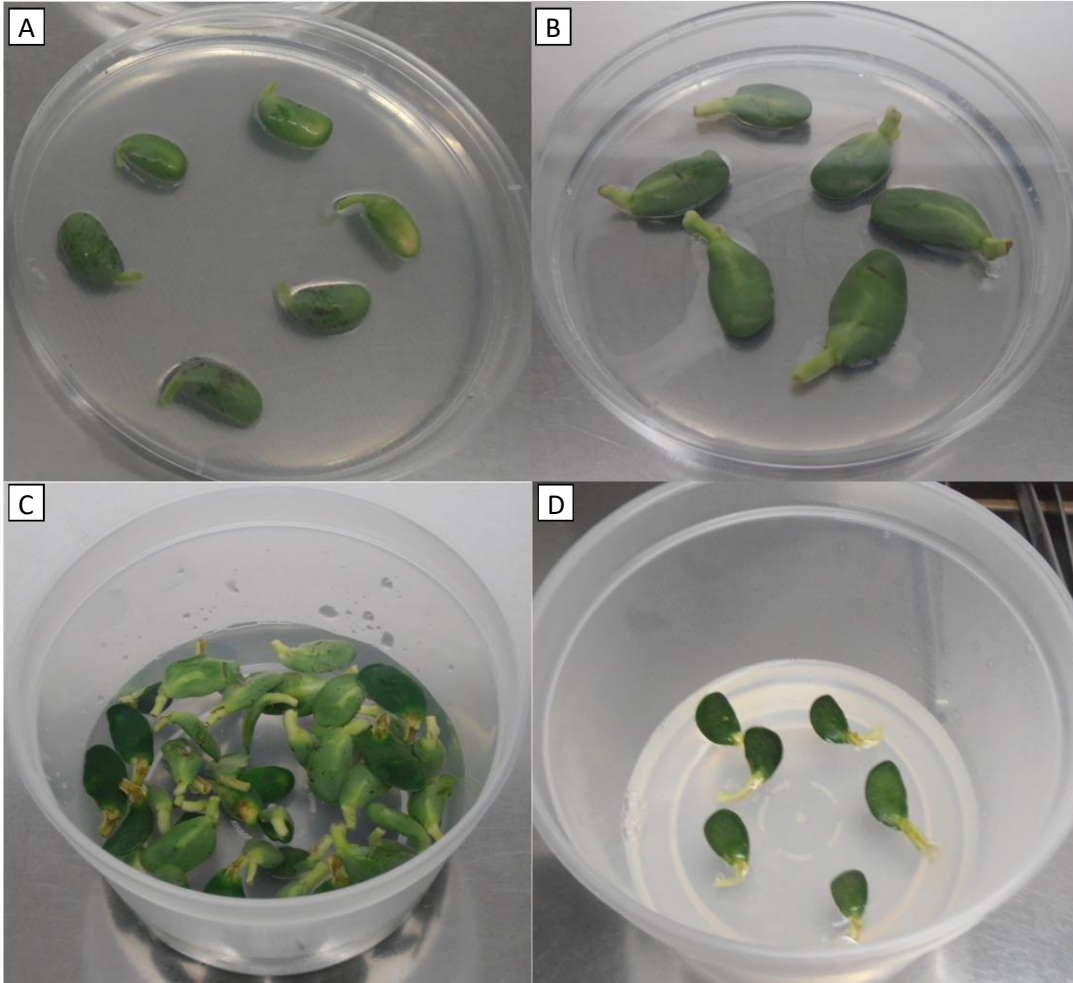


### 2.6.3. Proceso de cocultivo

Una vez obtenidas las cepas de *A. tumefaciens* recombinantes que contienen los plásmidos vectores con los casetes de transformación vegetal para tolerancia a glifosato, se procedió a transformar tejidos vegetales usando las bacterias como vehículo de transformación. Para ello se utilizaron explantes de nudo cotiledonar preparados de la forma descrita en el apartado 2.5 (Figura 2-4).

La inoculación de la bacteria sobre los tejidos vegetales se desarrolló según lo descrito por Zhang *et al.* (1999) de la siguiente forma: A partir de un stock de la cepa criopreservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  se inoculan 30 mL de caldo LB. Se permite crecimiento durante 12 horas a  $28^{\circ}\text{C}$  con agitación de 200 rpm. Concluido el crecimiento, por centrifugación se separa la biomasa del medio de cultivo, se elimina el medio LB y se reemplaza por medio de cocultivo líquido (Sales B5 0,1X, vitaminas Gamborg 1X, sacarosa 30 g/L, ácido giberélico (GA) 0,25 mg/L, BAP 1,67 mg/L, MES 20 mM, acetosiringona 200  $\mu\text{M}$ , pH 5,7), resuspendiendo la biomasa microbiana en él. Una vez preparado el explante de nudo cotiledonar como se describió anteriormente, se inoculan grupos de 40 explantes con la biomasa microbiana resuspendida en medio de cocultivo y se deja incubando durante 30 min. Luego se llevan los explantes a medio de cocultivo sólido (Sales B5 0,1X, vitaminas Gamborg 1X, sacarosa 30 g/L, GA 0,25 mg/L, BAP 1,67 mg/L, MES 20 mM, acetosiringona 200  $\mu\text{M}$ , agar 7 g/L, pH 5,7) en cajas de Petri, 6 explantes por caja (Figura 2-10A). Se permite crecimiento durante 3 días a  $28^{\circ}\text{C}$  (Figura 2-10B) al cabo de los cuales los explantes se retiran del medio de cocultivo. Se realizan 3 lavados para retirar mecánicamente restos de biomasa bacteriana utilizando agua estéril adicionada con carbenicilina a 500mg/L (Figura 2-10C), con agitación a 410 rpm por 40 min cada lavado. Finalizados los lavados se secan los explantes con papel absorbente estéril y se siembran sobre medio de regeneración en cajas de polipropileno, con la cara adaxial hacia arriba (Figura 2-10D).

**Figura 2-10:** Proceso de cocultivo e inicio de la regeneración sobre explantes de nudo cotiledonar de soya. A. Explantes inoculados sobre medio de cocultivo. B. Explantes inoculados a tercer día de crecimiento en cocultivo. C. Lavados para retirar la bacteria. D. Siembra de los explantes lavados sobre medio de regeneración.



## 2.7. Uso de antibióticos para eliminar la bacteria del sistema

Luego de determinar el comportamiento de cada una de las variedades vegetales en el medio de regeneración planteado, se procedió a evaluar una variable que debe ser introducida a este medio de regeneración: el antibiótico para el control de la bacteria. Según observaciones hechas en ensayos preliminares de transformación con las tres cepas (no incluidos en el presente documento), se determinó que la cepa más

recalcitrante de ellas tras su inoculación sobre tejido vegetal es la ATCC 53213 (portadora del vector pMON546), por lo cual fue seleccionada para desarrollar el ensayo de uso de antibióticos para eliminar la bacteria del sistema de transformación vegetal. Para evaluar la capacidad de 4 diferentes antibióticos para eliminar la bacteria del sistema de transformación y a su vez evaluar la afectación que pudiera presentar el material vegetal ante la presencia de los antibióticos en el medio de cultivo, se hizo un diseño de bloques completos aleatorizados, en el cual se ensayaron combinaciones sencillas, dobles, triples y cuádruple de antibióticos (Tabla 2-4)

**Tabla 2-4:** Diseño del ensayo de evaluación de antibióticos para retirar la bacteria del sistema

Tratamiento No.	Antibiótico presente	Unidades experimentales		
		Variedad vegetal		
		SK7	P29	Soyica P34
0	Sin antibiótico, sin bacteria	100	100	100
1	Timentina (Timen)	100	100	100
2	Vancomicina (Vanco)	100	100	100
3	Carbenicilina (Carbe)	100	100	100
4	Cefotaxima (Cefo)	100	100	100
5	Timen + Vanco	100	100	100
6	Timen + Carbe	100	100	100
7	Timen + Cefo	100	100	100
8	Vanco + Carbe	100	100	100
9	Vanco + Cefo	100	100	100
10	Cefo + Carbe	100	100	100
11	Vanco + Timen + Cefo	100	100	100
12	Vanco + Timen + Carbe	100	100	100
13	Cefo + Carbe + Vanco	100	100	100
14	Cefo + Carbe + Timen	100	100	100
15	Timen + Vanco + Cefo + Carbe	100	100	100

El ensayo se realizó por triplicado. Para cada montaje se desinfectaron y germinaron 850 semillas de cada una de las variedades, de las cuales se prepararon y escogieron 1.600 explantes, seleccionando los más verdes y sin manchas o laceraciones. Estos 1.600 explantes fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de 100 explantes por cada uno de los 16 tratamientos que se especifican en la Tabla 2-4, por cada variedad. Cada antibiótico evaluado fue esterilizado por filtración y adicionado al medio de regeneración antes de servir el medio estéril dentro de sus contenedores. Los explantes de cada tratamiento se sembraron sobre el medio de regeneración adicionado con el antibiótico correspondiente, con la cara adaxial hacia arriba. Se emplearon las concentraciones de

antibiótico mayormente reportadas para cada uno de los antibióticos de la siguiente forma: timentina 100 mg/L, carbenicilina 500 mg/L, cefotaxima 250 mg/L y vancomicina 50 mg/L. Se permitió el crecimiento y regeneración de los explantes a 27°C, con fotoperíodo 16/8 (luz/oscuridad) durante 2 semanas. Al cabo de este tiempo se hizo reemplazo del medio de cultivo por medio de regeneración fresco, nuevamente adicionado con el mismo tratamiento de antibióticos, y se permitió el crecimiento durante 2 semanas más, bajo las mismas condiciones ambientales. Los resultados se midieron a las 4 semanas de regeneración, como porcentaje de explantes que produjeron brotes en cada uno de los tratamientos. Se observó también si había reactivación de la bacteria al finalizar el proceso o durante el mismo, y si la morfología de los explantes y los brotes correspondía con lo normalmente esperado cuando no hay adición de antibióticos en el medio de cultivo. Al concluir este ensayo se determinó una combinación de antibióticos adecuada para eliminar la bacteria del sistema de transformación vegetal que sería utilizada en todos los ensayos posteriores.

## **2.8. Selección con herbicida**

Dentro del sistema de transformación vegetal se contempla un paso simultáneo a la regeneración, y en muchos casos abarca también las fases de elongación y/o enraizamiento, en el cual se usan agentes de selección como herbicidas o antibióticos para hacer presión sobre las células no transformadas, y favorecer el crecimiento y posterior regeneración de plántulas, a partir de células transformadas. En el caso particular de esta investigación, el casete de expresión que se inserta en el genoma de la planta contiene un único gen que confiere tolerancia al herbicida glifosato, de tal forma que esta misma característica fue utilizada como factor seleccionador del material *in vitro*. Se planteó ensayar dos esquemas de selección de corto y de largo plazo.

### **2.8.1. Selección de corto plazo**

En primera instancia se ensayó un esquema de selección únicamente durante el período de la regeneración (4 semanas), de manera similar a la usada con otros herbicidas (Paz *et al.*, 2004, Yang *et al.*, 2016). Para lograr esto se propuso determinar la mínima concentración de glifosato que causara mortalidad a plantas no transformadas, durante el

período de regeneración. Para ello se evaluaron tres rangos de herbicida (bajo, medio y alto), en las tres variedades vegetales, según se esquematiza en la Tabla 2-5.

**Tabla 2-5:** Diseño experimental de selección a corto plazo con herbicida

Concentración de herbicida evaluado (mg/L)	Concentración de herbicida evaluado ( $\mu\text{M}$ )	Unidades experimentales (explantos) por variedad		
		SK7	P29	Soyica P34
<b>Rango bajo</b>				
1	5,91	30	30	30
2	11,82	30	30	30
3	17,73	30	30	30
4	23,64	30	30	30
5	29,55	30	30	30
6	35,46	30	30	30
7	41,37	30	30	30
8	47,28	30	30	30
9	53,19	30	30	30
10	59,10	30	30	30
<b>Rango medio</b>				
10	59,10	30	30	30
20	118,20	30	30	30
30	177,30	30	30	30
40	236,40	30	30	30
50	295,50	30	30	30
<b>Rango alto</b>				
50	295,50	30	30	30
100	591,00	30	30	30
150	886,50	30	30	30
200	1.182,00	30	30	30
250	1.477,50	30	30	30
300	1.773,00	30	30	30

Se desinfectaron y germinaron semillas, y de ellas se prepararon explantes de nudo cotiledonar, como se describió en apartados anteriores de este documento, seleccionando 30 explantes sanos por concentración y por variedad (Tabla 2-5). Estos explantes no fueron inoculados con *A. tumefaciens*. Los explantes fueron sembrados con la cara adaxial hacia abajo sobre medio de cocultivo (Figura 2-9A), y se les permitió crecimiento durante 3 días a 27°C. Al terminar el cocultivo, los explantes fueron trasladados a medio de regeneración adicionado con glifosato de grado reactivo (PhytoTechnology Laboratories) a partir de un stock a 200 mg/L, preparado en agua destilada, de acuerdo con el tratamiento asignado (Tabla 2-5). El herbicida se adicionó al medio de cultivo previo a la esterilización, aprovechando su alta estabilidad térmica que le permite tolerar

temperaturas de hasta 198°C (Chen *et al.*, 2012). Por cada concentración de herbicida se sembraron 5 cajas de polipropileno con 6 explantes por caja. Se permitió crecimiento durante 2 semanas a 27°C, fotoperiodo 16/8 (luz/oscuridad). Al terminar estas dos semanas se hizo reemplazo del medio de regeneración por medio fresco, igualmente adicionado con glifosato según el tratamiento, y se permitió crecimiento durante 2 semanas más bajo las mismas condiciones.

Al finalizar las 4 semanas de regeneración se evaluó el efecto del herbicida sobre el tejido vegetal, observando la aparición de zonas de clorosis o necrosis, y determinando cual fue la concentración de herbicida en la que se observa afectación por el herbicida, pero que el nudo cotiledonar no perdiera su vitalidad, para que permitiera la regeneración de plántulas a partir de células transformadas.

Una vez determinada la mínima concentración de herbicida que ocasionaba daño evidente a los explantes no transformados, se procedió a transformar explantes de las tres variedades con el casete E-IGP y pMON546. Una vez transformados los explantes se hizo selección con la concentración de glifosato elegida durante el período de regeneración (4 semanas), y se retiró el herbicida durante el período de elongación (4 semanas) para permitir el desarrollo de brotes a partir de células transformadas, sin la presión de la presencia del herbicida. Se evaluó la eficiencia de la selección de acuerdo con la cantidad de brotes que hubieran logrado desarrollarse eficientemente en el medio de elongación.

### **2.8.2. Selección a largo plazo**

Como segunda opción de selección de transformantes primarios se evaluó una selección de largo plazo, en la que el herbicida estuviera presente durante la mayor cantidad de tiempo posible durante el proceso de generación de plantas GM. En este caso se hizo una revisión de literatura que permitiera diseñar una estrategia adecuada para la selección del material vegetal empleado en el presente trabajo, encontrando que son escasos los reportes que utilizan el herbicida glifosato en procesos de selección *in vitro* de plantas genéticamente modificadas. Se escogieron tres reportes que se consideraron relevantes respecto al uso de glifosato en selección *in vitro*, y basados en ellos se construyeron dos estrategias de selección, que diferían en las concentraciones de glifosato utilizadas y en el

momento de inicio de la selección en el período de regeneración. Se detallan concentraciones y tiempos de selección en la Tabla 2-6, tanto de los reportes de referencia como de las estrategias diseñadas en el presente trabajo.

**Tabla 2-6:** Estrategias de selección *in vitro* con glifosato reportadas en otros estudios y diseñadas en este trabajo.

Referencia	Explante	Regeneración		Elongación		Enraizamiento
		Tiempos	Selección	Tiempo	Selección	
Clemente <i>et al.</i> , 2000	Nudo cotiledonar	4 días	En medio de regeneración sin glifosato	4 a 10 semanas	En medio de elongación con glifosato entre 50 a 25 $\mu\text{M}$	Sin selección
		4 semanas	En medio de regeneración con glifosato entre 150 a 75 $\mu\text{M}$			
Monsanto (Patente US 8592212 B2)	Eje de la semilla	3 días	Medio líquido OR con 200 $\mu\text{M}$ de glifosato en oscuridad	5 a 6 semanas	Medio WPM con 75 $\mu\text{M}$ de glifosato	Sin selección
		7 días	Medio MSR con 200 $\mu\text{M}$ de glifosato en oscuridad			
Dow Agro Science (Patente US20140173780 A1)	Semilla dividida	2 semanas	Medio de regeneración sin glifosato	6 a 10 semanas de proceso total. Tiempo de selección varía entre 0 hasta 4 semanas	Medio de elongación con 25 $\mu\text{M}$ de glifosato	Sin selección
		2 semanas	Medio de regeneración con glifosato entre 25 a 100 $\mu\text{M}$			
Estrategia 1 (El presente trabajo)	Nudo cotiledonar	2 semanas	Medio de regeneración sin glifosato	4 semanas	Medio de elongación con 35 $\mu\text{M}$ de glifosato	Sin selección
		2 semanas	Medio de regeneración con glifosato a 148 $\mu\text{M}$	2 a 6 semanas	Medio de propagación sin glifosato	
Estrategia 2 (El presente trabajo)	Nudo cotiledonar	4 semanas	Medio de regeneración con glifosato a 100 $\mu\text{M}$	4 semanas	Medio de elongación con 35 $\mu\text{M}$ de glifosato	Sin selección
				2 a 6 semanas	Medio de propagación sin glifosato	



Una vez definidas las estrategias de selección de largo plazo, se hizo un modelo lineal generalizado que combinara las variables de estrategia de selección de largo plazo, variedad vegetal y cepa bacteriana, para realizar transformación con el casete E-IGP, como se esquematiza en la Tabla 2-7.

**Tabla 2-7:** Modelo lineal generalizado combinando variables de estrategia de selección de largo plazo, variedad vegetal y cepa bacteriana.

Tratamiento	Estrategia de selección (*)	Variedad vegetal	Cepa bacteriana	Casete de expresión	Unidades experimentales
Estrategia 1	1	SK7	EHA105	E-IGP	130
			AGL0	E-IGP	130
		P29	EHA105	E-IGP	130
			AGL0	E-IGP	130
		Soyica P34	EHA105	E-IGP	130
			AGL0	E-IGP	130
Control relativo a estrategia 1	1	SK7	ninguna	ninguno	130
		P29	ninguna	ninguno	130
		Soyica P34	ninguna	ninguno	130
Estrategia 2	2	SK7	EHA105	E-IGP	130
			AGL0	E-IGP	130
		P29	EHA105	E-IGP	130
			AGL0	E-IGP	130
		Soyica P34	EHA105	E-IGP	130
			AGL0	E-IGP	130
Control relativo a estrategia 2	2	SK7	ninguna	ninguno	130
		P29	ninguna	ninguno	130
		Soyica P34	ninguna	ninguno	130
Control Absoluto	Ninguna	SK7	ninguna	ninguno	130
		P29	ninguna	ninguno	130
		Soyica P34	ninguna	ninguno	130

\*: Según lo descrito en la tabla 2-6

De la misma forma como se ha descrito en apartados anteriores de este documento, se desinfectaron y germinaron semillas de las tres variedades vegetales, y a partir de ellas se prepararon explantes de nudo cotiledonar en cantidad suficiente que permitiera la selección de 130 explantes verdes, de apariencia fisiológica sana, sin laceraciones o manchas, para cada una de las variedades vegetales y tratamientos evaluados como se describe en la Tabla 2-7. Según al tratamiento al que pertenecieran, los explantes fueron

inoculados con las cepas EHA105 o AGL0 transformadas con el casete E-IGP, como se describió en las secciones 2.6.2 y 2.6.3. Explantes no inoculados igualmente fueron sometidos al cultivo en medio de cocultivo, lavados y demás procesos que se llevan a cabo con los explantes inoculados.

Todos los explantes fueron sembrados sobre medio de regeneración (descrito en sección 2.5) dentro de cajas de polipropileno (Figura 2-10D), adicionado con la combinación de antibióticos seleccionada según lo descrito en la sección 2.7 y además adicionado con glifosato de grado reactivo (PhytoTechnology Laboratories) a partir de un stock a 200 mg/L, preparado en agua destilada, a la concentración correspondiente a cada tratamiento (Tabla 2-6). El herbicida se adicionó al medio de cultivo previo a la esterilización, aprovechando su alta estabilidad térmica (Chen *et al.*, 2012). Se permitió crecimiento durante 2 semanas a 27°C y fotoperiodo 16/8. Estas dos primeras semanas de crecimiento en medio de regeneración se denominan en apartados posteriores como “Regeneración 1” (Reg 1). Al cumplirse estas 2 primeras semanas se trasladaron los explantes a medio fresco de regeneración, adicionando antibióticos y glifosato según como correspondiera a su tratamiento asignado, y se le permitió crecimiento bajo las mismas condiciones descritas durante dos semanas adicionales. En apartados posteriores del documento se describen estas dos semanas adicionales como “Regeneración 2” (Reg 2), con las cuales se completa un periodo total de regeneración de 4 semanas. En el paso de Reg 1 a Reg 2 se eliminó el hipocótilo de cada explante.

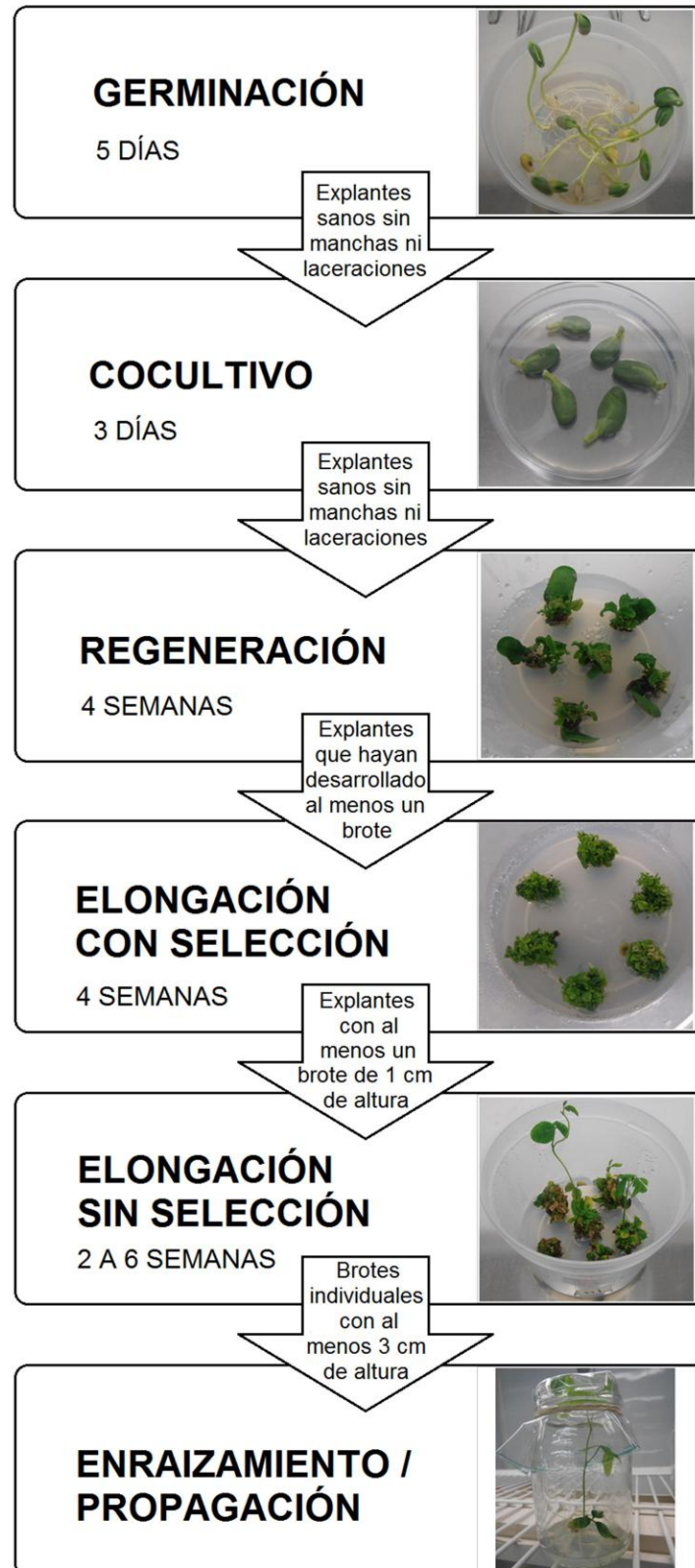
Al finalizar la Reg 2 se trasladaron los explantes que hubieran regenerado al menos un brote a medio de elongación (Sales B5 1X, vitaminas Gamborg 1X, sacarosa 30 g/L, GA 0,5 mg/L, ácido indol acético (IAA) 0,1 mg/L, BAP 0,7 mg/L, glutamina 50 mg/L, asparragina 50 mg/L, MES 3 mM, agar 7 g/L, pH 5,7) adicionado con los antibióticos seleccionados previamente y con 35 µM de glifosato (Tabla 2-6). Al hacer este cambio de medio se eliminó el cotiledón de todos los explantes transferidos. Se permitió crecimiento durante 2 semanas a 27°C con fotoperiodo 16/8 (luz/oscuridad). A este periodo de 2 semanas en medio de elongación se le denomina posteriormente como “Elongación 1” (Elo 1). Al cumplirse este tiempo se hace reemplazo por medio fresco de elongación, nuevamente adicionado con antibióticos y con glifosato a 35 µM. Se permite crecimiento durante 2 semanas adicionales bajo las mismas condiciones de luz y temperatura. A estas dos semanas adicionales de crecimiento en medio de elongación se les denomina

posteriormente como “Elongación 2” (Elo 2). En el proceso de cambio de los explantes de Elo 1 a Elo 2 se hace un corte en la base del explante para retirar el tejido más antiguo y dejar tejido fresco en contacto con el medio de cultivo.

Al completarse el periodo de elongación con herbicida y con antibiótico, los explantes de apariencia sana, que evidenciaran crecimiento de al menos 1 cm de al menos uno de sus brotes regenerados, fueron trasladados a medio de propagación (Sales MS 0,66 X, vitaminas Gamborg 1X, sacarosa 30 g/L, agar 7 g/L, pH 5,7) para que terminaran de elongar los brotes que habían regenerado sin la presión de selección del herbicida ni los antibióticos. Se permitió crecimiento en este medio a 27°C con fotoperiodo 16/8 (luz/oscuridad), durante un período que osciló entre 2 a 6 semanas. Este tiempo dependía de la generación de brotes de altura mínima de 3 cm en cada una de las variedades y tratamientos. En posteriores apartados de este documento se nombra este periodo de crecimiento como “Elongación 3” (Elo 3). El proceso completo de generación de eventos genéticamente modificados se resume en la Figura 2-11.

Para determinar la efectividad de cada estrategia de selección de largo plazo se llevó el recuento de cuántos explantes pasaban de una fase a otra (de Reg 1 a Reg 2, de Reg 2 a Elo 1, de Elo 1 a Elo 2 y de Elo 2 a Elo 3), para cada una de las variedades y tratamientos. Además, se evaluó el desarrollo morfológico de los explantes en cada estrategia de selección para determinar afectación del herbicida de acuerdo con su esquema de uso sobre el tejido vegetal.

**Figura 2-11:** Proceso de generación de eventos transgénicos empleado en el presente trabajo.



### **2.8.3. Individualización de posibles transformantes primarios, nomenclatura y propagación**

Al generarse brotes con la altura deseada (mínimo 3 cm) y de apariencia sana en el periodo E103, estos fueron individualizados dentro de envases de vidrio de 5 cm de diámetro por 12 cm de altura, conteniendo medio de propagación.

A cada uno de los brotes individualizados se les asignó una nomenclatura que incluía una letra para distinguir la variedad a la que pertenecía cada planta, de la siguiente manera: “K” para la variedad SK7, “P” para la variedad P29 y “S” para la variedad Soyica P34. La nomenclatura en todos los casos incluía la letra “J” para indicar que era una planta transformada con el vector E-IGP, y finalmente incluyó un número que indicaba un orden consecutivo de cosecha y que diferenciaba una línea de otra dentro de una misma variedad.

El material vegetal fue propagado antes de desarrollar cualquier análisis molecular o fenotípico sobre él, para tener biomasa para consumir en estas pruebas y paralelamente conservar copias de la línea para endurecer, propagar o cualquier análisis posterior. La propagación de estas plantas se hizo tomando como explantes yemas axilares y terminales, y en cada pase sembrando estas yemas sobre medio de propagación dentro de envases de vidrio, como un único explante por envase. Estos explantes de propagación se conservaron en condiciones de crecimiento de 27°C, con fotoperiodo 16/8 (luz/oscuridad) durante un tiempo aproximado de un mes, al cabo del cual habían alcanzado la altura y desarrollo morfológico necesarios para obtener a partir de ellos nuevos explantes de propagación. El tiempo máximo que se permitió crecimiento del explante fue de 2 meses. Si al cumplirse este tiempo el explante no crecía era descartado por su falta de vigor.

## **2.9. Obtención de plantas con casetes contrastantes**

Según los resultados obtenidos respecto al uso de herbicidas para hacer selección sobre explantes transformados, y las observaciones hechas en estos ensayos sobre el comportamiento de las variedades vegetales y cepas bacterianas, se seleccionó una

variedad vegetal y una cepa bacteriana para generar plantas con otros casetes contrastantes, que igualmente hubieran sido diseñados para conferir tolerancia a glifosato en plantas susceptibles.

Según las metodologías anteriormente detalladas y esquematizadas en la Figura 2-11, se transformaron 300 explantes de la variedad vegetal seleccionada como la más apta según los procesos usados en este trabajo, con la cepa ATCC 53213, conteniendo el plásmido pMON546. Igualmente se transformaron 300 explantes de la misma variedad vegetal con el casete E-2, usando como vehículo la cepa de *A. tumefaciens* seleccionada como la más apta según las observaciones de fases anteriores. Se empleó la mejor combinación de antibióticos, determinada según lo descrito en la sección 2.7, y la mejor estrategia de selección con herbicida determinada según lo descrito en la sección 2.8.

Siguiendo el mismo proceso anteriormente descrito, se individualizaron los posibles transformantes primarios, y se les asignó una nomenclatura que incluía la combinación "5M" para indicar que eran plantas transformadas con el casete E-2 y la cepa seleccionada como la mejor en apartados anteriores, o la combinación "MM" para indicar que eran plantas transformadas con el plásmido pMON546 utilizando como vehículo la cepa ATCC 53213. Luego se les asignó un número que indica un consecutivo de cosecha y que permite diferenciar las diferentes líneas transformadas con el mismo casete. De la misma manera como se describió anteriormente, estas plantas fueron propagadas *in vitro* antes de hacer cualquier análisis molecular o fenotípico sobre ellas.

## **2.10. Pruebas moleculares y fenotípicas**

Para hacer una caracterización parcial de los eventos generados se desarrollaron los siguientes análisis.

### **2.10.1. Determinación de presencia / ausencia del transgén**

A partir de tejido vegetal de cada una de las líneas obtenidas, se hizo extracción de ADN total utilizando la metodología de buffer CTAB (CTAB 2%, Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2%) (Doyle, 1991). El ADN extraído se resuspendió

en buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM) y se cuantificó por espectrofotometría usando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y su software asociado.

Se desarrolló ensayos de PCR sobre el ADN extraído utilizando el kit Kapa3G Plant PCR (Kapa Biosystems). Como control positivo se utilizó ADN plasmídico extraído como se describió en la sección 2.6.2. En cada ensayo se usó un control absoluto (agua) para verificar que los reactivos no tuvieran contaminaciones que originaran falsos positivos. Cada reacción tuvo un volumen total de 20 µL, e incluyó 20 ng de ADN vegetal ó 5 ng de ADN plasmídico, según el caso. Los demás componentes de la reacción se adicionaron según las instrucciones del fabricante. Como primers se emplearon los siguientes:

**Tabla 2-8:** Primers usados en pruebas moleculares

Secuencia que detecta	Secuencia de los primers (5' – 3')	Tamaño del amplificado
E-IGP	Dir: CTTTGCTGAAGGAGCTACCG Rev: GTGATCGAGATGCGTAGCAA	205 pb
E-2	Dir: CGCGATCATACTGGAAAAGAT Rev: ATCAGCACGTTGAGGATGGT	212 pb
pMON546	Dir: AGGAGCATCGTGGAAAAGA Rev: GATTTTCAGCGTGCCTCTCC	166 pb
Actina *	Dir: GCCGTCCTCTCTGTATGC Rev: GCAATGCCAGGGAACATAGT	518 pb

\* Tomado de Manna *et al.*, 2016

El programa de amplificación comprendió una desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 20 seg, hibridación a 56°C por 15 seg y extensión a 72°C por 30 seg. Al final se hizo una extra extensión a 72°C durante 5 min. Los productos se analizaron en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, junto a un marcador de peso molecular para verificar su tamaño.

Se consideraron como positivas las plantas que evidenciaron en el ensayo de PCR un amplicón del tamaño correspondiente al esperado según el juego de primers empleado en la reacción, y a partir del DNA aislado.

### 2.10.2. Expresión del transgén

Se detectó la expresión de la proteína CP4 EPSPS de *A. tumefaciens* utilizando la prueba cualitativa de ELISA comercial Roundup Ready CP4 EPSPS (Agdia), que reconoce específicamente esta proteína. Se utilizó biomasa de cada planta evaluada a partir de material vegetal propagado *in vitro*, que haya resultado positiva en los ensayos de PCR. El procedimiento de preparación del material, procesamiento y posterior revelado se desarrolló siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción enzimática fue detectada por espectrofotometría utilizando el equipo iMark™ Microplate Reader (Bio Rad), a una longitud de onda de 655 nm. Junto a las muestras analizar se usó como control positivo un concentrado de la proteína CP4 EPSPS incluido en el kit de la prueba, y como control negativo buffer MEB (que corresponde al buffer de “extracción” de la proteína) sin biomasa. Se consideró como positiva una reacción cuando su absorbancia fue superior a 0.1.

### 2.10.3. Número de copias del transgén que se insertaron en el genoma de la planta

La determinación del número de copias del transgén que se insertaron en el genoma de la planta se hizo por la técnica de Southern Blot aplicada únicamente sobre ADN de las plantas que resultaron positivas en la prueba de PCR. Los procedimientos y reactivos utilizados siguieron los propuestos por la plataforma de aplicaciones de digoxigenina para hibridaciones en filtro de Roche (Eisel *et al.*, 2008).

La sonda de detección para los casetes E-IGP, E-2 y pMON546 correspondió a un producto de PCR de tamaño reducido (menos de 250 pb) marcado con digoxigenina (DIG), un antígeno que permite una posterior detección mediante la unión a un anticuerpo específico marcado enzimáticamente (Eisel *et al.*, 2008). Para producir las sondas se emplearon los primers previamente descritos para la técnica de PCR (Tabla 2-8), usando el kit PCR DIG Probe Synthesis (Roche). Como ADN molde en la producción de las sondas se utilizó 0,2 pg/μL de ADN plasmídico, obtenido según lo descrito en la sección 2.6.2. Demás reactivos y condiciones de la reacción se emplearon siguiendo las indicaciones del fabricante. Para verificar la efectividad de marcaje de las sondas, se



analizó el producto de PCR marcado con DIG junto a un producto de PCR sin marcar, en una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se verificó el marcado observando las diferencias en el tamaño de los amplificados, siendo mayor el de las sondas marcadas con DIG.

Para el montaje del blot se digirieron 20 µg de ADN con las enzimas *PvuII* y *NdeI* (New England Biolabs) durante 16h a 37°C, en un volumen de reacción de 500 µL. Completada la digestión el ADN se precipitó usando isopropanol y se resuspendió en 25 µL de buffer TE. La totalidad del ADN resuspendido fue cargado analizado en un gel de agarosa al 0,7% y electroforesis a 70V durante 2 horas. En el gel simultáneamente con las muestras se usó como control positivo 4 ng de ADN plasmídico y un marcador de peso molecular marcado con DIG (DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled (Roche)).

Se hizo transferencia a una membrana de nylon positivamente cargada (Roche) por capilaridad usando buffer SSC20X (NaCl 3M, Citrato de sodio 0,3M, pH 7,0) durante 16 horas. Luego se hizo hibridación de la membrana con las sondas marcadas con DIG dentro de horno de hibridación a 35°C durante 16 horas en buffer de hibridación DIG Easy Hyb (Roche). Al completarse la hibridación se hicieron dos lavados con buffer astringente (NaCl 0,3M, Citrato de sodio 30 mM, SDS 0,1% pH 7,0) a 65°C. Se ligó a la membrana un anticuerpo anti DIG ligado a fosfatasa alcalina (Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche)) y se reveló por quimioluminiscencia usando el sustrato CDP-Star (Roche). El revelado y digitalización de las membranas se desarrolló usando el equipo ChemiDoc™ XRS+ Imaging System (Bio-Rad) y su software asociado. Se consideró como una inserción cada una de las bandas que aparecieran en el carril correspondiente a una muestra en la membrana, tras ser revelada.

#### **2.10.4. Endurecimiento y prueba de invernadero**

Partiendo de plantas completas *in vitro* de las líneas individualizadas para los tres casetes evaluados, se seleccionaron aquellas que hubiesen desarrollado al menos una raíz de mínimo 3 cm de longitud, y que tuvieran al menos dos hojas trifoliadas, para ser sometidas a endurecimiento en invernadero.

Para endurecer las plantas, éstas fueron retiradas del envase que las contenía cuidadosamente. Sus raíces fueron lavadas con agua de grifo a presión, para retirar la totalidad del medio de cultivo del tejido vegetal, y posteriormente fueron sembradas sobre turba estéril, dentro de germinadores de 50 pozos, a condiciones de alta humedad relativa, con una cubierta plástica transparente (Figura 2-12). Cada planta se identificó con su respectiva nomenclatura de línea. El endurecimiento fue desarrollado dentro de invernadero a 26°C, fotoperiodo natural.

**Figura 2-12:** Germinadores donde se realizó endurecimiento de plantas. Inicio del endurecimiento.



Se hizo adaptación progresiva a la atmósfera externa al germinador realizando orificios en la cubierta plástica, permitiendo crecimiento sin ningún orificio durante 5 días, seguido de 4 días con 4 orificios, luego 4 días más con 8 orificios y terminando con 4 días más con 10 orificios. Al terminar este periodo, se retiraba totalmente la cubierta para permitir a la planta adaptarse completamente a la atmósfera externa (Figura 2-13A) y se permitió su crecimiento durante una semana. Se seleccionaron plantas que hubieran desarrollado la brotación de nuevas hojas, con elongación de su tallo y raíces (Figura 2-13B), y éstas fueron trasladadas a materas de capacidad de 1 kg, individualmente (Figura 2-13C) completando el volumen de la matera con suelo. Una vez individualizadas, se permitió crecimiento durante una semana más antes de realizar prueba fenotípica.

**Figura 2-13:** Final del endurecimiento. A. Retiro de la cubierta plástica. B. Elongación de raíces en plantas endurecidas. C. Individualización de plantas endurecidas en materas de 1 kg.



Sobre las plantas individualizadas en materia de 1 kg, se aplicó glifosato comercial marca Victorius®, diluido al 0,5% en agua de grifo, utilizando un algodón impregnado del herbicida. La aplicación se hizo sobre toda la parte aérea de la planta, deslizando el algodón impregnado sobre el tejido vegetal. Como control positivo se aplicó herbicida de la misma manera sobre una planta sin transformar, y como control del diluyente del glifosato, se aplicó agua de grifo sobre una planta sin transformar.

Se permitió actuar al herbicida durante 10 días, sin descuidar la hidratación requerida por la planta, y al cumplirse este tiempo se observó el efecto de necrosis sistémica causada por el herbicida.

## **2.11. Análisis estadístico**

Según el diseño de cada experimento (completamente aleatorizado, bloques al azar, modelo lineal generalizado) se emplearon pruebas estadísticas para determinar la significancia de los datos obtenidos. Para los análisis estadísticas se aplicaron pruebas paramétricas y no paramétricas. Se realizaron pruebas de contraste de hipótesis para determinar los mejores tratamientos.

## 3. Capítulo 3: Resultados

### 3.1. Estudio de libertad de operación

Los datos se recuperaron de la suite The Lens (<https://www.lens.org/lens/>). The Lens es una iniciativa integrada que comprende los datos bibliográficos de la Oficina Europea de Patentes (1907-2016) y subvenciones (1980-2016), las solicitudes de la base de datos de la Oficina de Patentes de los Estados Unidos (USPTO) (2001-2016), las solicitudes en la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI-PCT) (1978-2016) y la base de datos de patentes australianas (durante los últimos 100 años). La Base de Datos de Patentes de la India (IPO) fue incluida en este proyecto. El marco de datos se decidió para el período 1996-2016 que abarca patentes concedidas, que incluye la introducción de soya tolerante a glifosato en EEUU. La búsqueda se realizó por combinación de palabras clave relacionadas con la soya GM y relacionadas con la tolerancia a herbicidas: GM, soya, genéticamente modificado, transgénico, tolerancia al glifosato, resistencia al glifosato, Roundup, Monsanto. La búsqueda se completó en marzo de 2016.

Las patentes relacionadas con la soya Roundup Ready (US4940835, US5188642, US5804425, US5312910, US5352605, US5530196, US5627061, US5633435, US5717084, US5728925) no están cubiertas por este marco debido a que ya se han explicado con éxito, en el contexto de su expiración y las posibilidades de un mercado de agrobiogénicos, similar a lo que sucede con los productos farmacéuticos, donde se puede explotar el producto GM sin restricciones de uso (Jefferson *et al.*, 2015).

Los datos de cada patente concedida se verificaron con respecto a (i) las reivindicaciones (b) el año de aplicación, y (c) los propietarios. Un análisis manual de los resultados preliminares reveló que algunos de ellos no están relacionados con esta investigación y no fueron considerados. Se seleccionaron 63 patentes que cumplían con los requisitos. Los resultados se presentan en forma de Tablas. La Tabla 3-1 presenta los principales

resultados, La Tabla 3-2 muestra los avances a lo largo de los años y la Tabla 3-3 muestra los propietarios para las patentes.

Los resultados de este estudio de libertad de operación se encuentran publicados:

Adriana Carolina Rojas Arias, Jessica Liliana Palacio, Alejandro Chaparro-Giraldo, Silvio Alejandro López-Pazos. 2017. Patents and genetically modified soybean for glyphosate resistance. World Patent Information.48, 47–51 (Anexo A).

**Tabla 3-1:** Patentes de soya tolerante a glifosato según reivindicaciones.

Reivindicaciones	Patente
Planta o una de sus partes	EP0536330 (B1); WO1992/000377 (A1); US8324457 (B2); EP1261695 (B1); US7951995 (B2); US20110224082 (A1); AU2005/208712 (A1); EP0218571 (B1); US6673989 (B2); US2012/0157308 (A1); AU1991/084085 (A); AU655197 (B2); US09056073; US08736772; CN103826443; US20140041083; US20130338006; US20120110688; US20110239321; JP2015006192; US2003200560; IPO245892.
Semilla	EP0536330 (B1); WO1992/000377 (A1); US8324457 (B2); EP1261695 (B1); US7951995 (B2); US20110224082 (A1); AU2005/208712 (A1); US6673989 (B2); US2012/0157308 (A1); AU655197 (B2); US09056073; US08736772; CN103826443; US20140041083; US20130338006; US20110224082; US20120110688; US20110239321; JP2015006192; US2003200560.
Cepa bacteriana	EP0536330 (B1); WO1992/000377 (A1); EP0218571 (B1); AU655197 (B2); AU1991/084085; US09056073; US08736772; US20140041083; IPO245892.
Promotor	EP0536330 (B1); EP1068341 (B1); WO1992/000377 (A1); EP1261695 (B1); AU1999/032095 (A); US5914451 (A); WO1999/051759 (A1); EP0218571 (B1); AU655197 (B2); US09056073; CN103826443; US7951995 (B2); US20120110688; US2014100110; US2003200560.
Casete de expresión	EP1728871 (B1); EP1068341 (B1); AU1999/032095 (A); US5914451 (A); WO1999/051759 (A1); US09056073; WO2013010094; WO2012075429.
Proteína	EP0536330 (B1); EP1068341 (B1); WO1999/051759 (A1); US2012/0157308 (A1); AU1991/084085 (A); AU655197 (B2); US8324457 (B2); US7951995 (B2); WO1992/000377 (A1); EP1261695 (B1); US20110224082 (A1); US2003200560.

**Tabla 3-1:** (Continuación)

Secuencia de DNA	EP0536330 (B1); EP1068341 (B1); WO1992/000377 (A1); EP1261695 (B1); AU1999/032095 (A); US7951995 (B2); US20110224082 (A1); WO1999/051759 (A1); EP0218571 (B1); US2012/0157308 (A1); AU1991/084085 (A); AU655197 (B2); US09056073; CN103826443; US20140041083; US20130338006; US8324457 (B2); US20110224082; US20120110688; US20110239321; JP2015006192; US2014100110; US2003200560; EP1728871 (B1); AU2005/208712 (A1); US5914451 (A).
Secuencia de RNA	WO1992/000377 (A1); EP1261695 (B1); CN103826443.
Métodos <i>in vivo</i> (Pruebas de campo)	WO1992/000377 (A1); US7951995 (B2); US6673989 (B2); US2012/0157308 (A1); AU1991/084085 (A); US20140041083; US20130338006; CN103826443; US20120110688; US20110239321; US2014100110 (A1); US2003200560 (A1).
Métodos <i>In vitro</i>	EP1728871 (B1); EP0536330 (B1); EP1068341 (B1); WO1992/000377 (A1); US8324457 (B2); EP1261695 (B1); AU1999/032095 (A); US7951995 (B2); US5914451 (A); WO1999/051759 (A1); EP0218571 (B1); AU1991/084085 (A); AU655197 (B2); US09056073; US08736772; CN103826443; US20130338006; US20140041083; US20110224082; US20120110688; US20110239321; US2014100110 (A1); IPO245892.
Partículas que contienen ADN	EP1068341 (B1); AU1999/032095 (A); US5914451 (A); WO1999/051759 (A1).
Métodos de selección	EP1068341 (B1); AU1999/032095 (A); US5914451 (A); WO1999/051759 (A1); US09056073.
Vector	EP0218571 (B1); US08736772.
Genoma modificado	CN103826443; US20140041083; US20130338006
Métodos de detección	US20140041083; US7951995 (B2); US2014100110; US2003200560
Producto alimenticio o aceite	CN103826443; US20130338006; US20140041083; US20110239321

**Tabla 3-2:** Patentes de soya tolerante a glifosato según año de solicitud.

Año	Patente
1986-1991	EP0536330 (B1); WO1992/000377 (A1); EP0218571 (B1); AU1991/084085 (A); AU655197 (B2)
1992-1996	US08736772.
1997-2001	EP1728871 (B1); EP1068341 (B1); AU1999/032095 (A); US5914451 (A); WO1999/051759 (A1); US6673989 (B2); US09056073.
2002-2006	AU2005/208712 (A1); US2003200560 (A1).
2007-2011	US8324457 (B); US7951995 (B2); US20110224082 (A1); US2012/0157308 (A1); US20140041083; US20130338006; US20110224082; US20120110688; US20110239321; IPO245892.
2012-2015	CN103826443; JP2015006192; US2014100110.

**Tabla 3-3:** Patentes de soya tolerante a glifosato según propietario.

Propietario	Patente
MONSANTO TECHNOLOGY LLC.	EP1728871 (B1); EP0536330 (B1); EP1068341 (B1); WO1992/000377 (A1); EP1261695 B1; AU1999/032095 A; US5914451 (A); WO1999/051759 (A1); EP0218571 (B1); AU1991/084085 (A); AU655197 (B2); US09056073; US08736772; JP2015006192.
PIONEER HI BRED INT	US2012/0157308 (A1)
MS TECHNOLOGIES LLC.	CN103826443; US20140041083; US20130338006; US20110239321.
DOW AGROSCIENCES LLC	US20120110688; CN103826443; US20140041083; US20130338006.
BAYER BIOSCIENCE NV	US20110239321
DU PONT	US2014100110 (A1); US2012/0157308 A1.
SYNGENTA LIMITED	US2003200560 (A1)
BASF PLANT SCIENCE GMBH	IPO245892

Por otra parte, se hizo una actualización del estudio de libertad de operación, desarrollado por Jiménez (2014), del cual se encontró lo siguiente:

#### Promotores

Los promotores utilizados en estos casetes de expresión son el promotor Gmubi (Chiera *et al.*, 2007) para el casete E-IGP y el p35S duplicado (Kay *et al.*, 1987) para el E-2.

Para el promotor Gmubi, además de las patentes mencionadas en el estudio de libertad de operación del 2014, se encontró la solicitud estadounidense US 2014/0053296 A1. Esta corresponde a una división de la patente US 8395021, solicitada el 7 de febrero del 2013, y publicada en 20 de febrero del 2014, en la cual se solicita la protección de una serie de promotores provenientes de la soya incluido el Gmubi, su uso en casetes de expresión para la transformación de genética de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Esta solicitud solo se presentó para Estados Unidos.

En la base de datos nacional se encontraron las solicitudes 16168921, 16171981, NC2016/0000501, NC2016/0000516, tituladas promotores novedosos de ubiquitina del maíz, pero corresponden a promotores diferentes al Gmubi.



Las patentes relacionadas con el promotor 35S en su versión simple y duplicada ya expiraron y no fueron solicitadas en Colombia. La búsqueda en la base de datos colombiana con las palabras claves promotor, promotores, 35S, CAMV35S, durante el periodo comprendido entre junio del 2014 y julio del 2017 únicamente mostró nueve registros no relacionados, en tanto que el registro histórico muestra un total de 19 registros, los cuales tampoco están relacionados.

### Gen *epsps*

La patente que protegía el gen *epsps* y todos sus posibles usos para transformación genética de plantas (US 5627061 A y familia de patentes derivadas), ya expiró y no fue solicitada para Colombia, por lo cual el uso de este gen está en el dominio público. Las patentes estadounidenses relacionadas con el péptido de transito de *Petunia hybrida* también pertenecen a esta familia, identificadas como US 5633435 y US RE39247 E1, las cuales tampoco fueron solicitadas para Colombia.

La búsqueda en la base de datos internacional de nuevas patentes relacionadas con el uso del gen *epsps* específicamente para transformación genética de plantas de soya, se realizó utilizando los filtros: palabra clave en reivindicaciones (cp4 EPSPS) y en todo el texto (soybean), entre el periodo junio 1 del 2014 y julio del 2017. La base de datos arrojó 30 resultados de los cuales ninguno está directamente relacionado con el objeto de estudio. Con el fin de ampliar la búsqueda, se utilizó como único filtro palabra clave dentro de las reivindicaciones (cp4 EPSPS), durante el mismo periodo de tiempo. En este caso se encontraron 32 registros de patentes y solicitudes de patentes algunos de los cuales están relacionados con eventos específicos en algodón, alfalfa, y brasicáceas, sin embargo, no afectan directamente el objeto de estudio.

En la base de datos colombiana también se realizó una búsqueda avanzada, utilizando como palabras clave EPSPS, cp4 EPSPS, glifosato, soya, soja, durante el mismo periodo de tiempo. La base de datos mostró 14 expedientes en total, ninguno de los cuales está directamente relacionado con el objeto de estudio. La búsqueda con las palabras péptido, péptidos, *Petunia hybrida*, mostró 20 registros no relacionados.

De estos resultados se concluye que no se encontraron patentes ni solicitudes que afecten el uso de los casetes de expresión E-IGP y E2 en el territorio colombiano. Las patentes que están directamente relacionadas siguen siendo las mismas reportadas en el estudio de libertad de operación del 2014, siendo US5196525, US5164316 y US5322938 para el promotor CaMV35S duplicado; WO2008140766A2 y US8395021B2 para el promotor Gmubi; WO92/04449, US5633435, US5627061, WO06/130436, US7632985, US8053184 y US7608761 para el gen *cp4 epsps*; US5633435 y USRE39247 para el péptido de tránsito de *Petunia hybrida*; y US6641996B1, US7176006B2 y US7148407 para el vector pCAMBIA..

#### Método de transformación y regeneración.

Al hacer la búsqueda en bases de datos de patentes se encontró que existen más de 1000 patentes que protegen metodologías de transformación y regeneración de soya a partir de nudo cotiledonar obtenido desde semillas germinadas, haciendo variaciones a la técnica en distintas fases. La técnica empleada en el presente trabajo corresponde a la descrita por Zhang *et al.* en 1999, en un artículo científico público. Dentro de los resultados obtenidos en la búsqueda de bases de datos de patentes, la que más cercanamente corresponde a la técnica empleada es la patente US5416011A y la familia de patentes derivadas, las cuales expiraron entre el año 2013 al 2016, y eran de propiedad de la empresa Monsanto. Estas patentes no fueron solicitadas para el territorio colombiano.

#### Variedades vegetales

En Colombia, los organismos vivos no son patentables, pero en el caso de las variedades vegetales, el estado otorga un tipo de protección conocido como “derecho de obtentor” al individuo o entidad que generen nuevas variedades vegetales de uso comercial, según el Régimen Común de Protección a los Derechos de Obtentor de Variedades Vegetales (decisión 345 de 1993), conocido internacionalmente como UPOV (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales), el cual en Colombia ratificó el Acta de 1978, estableciendo al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) como autoridad nacional competente para la gestión y ejecución del mencionado régimen (Decreto 533 de 1994). En comunicaciones personales con personal encargado del ICA del tema de protección de Derechos de Obtentor, se informó al grupo de investigación que las variedades Soyica

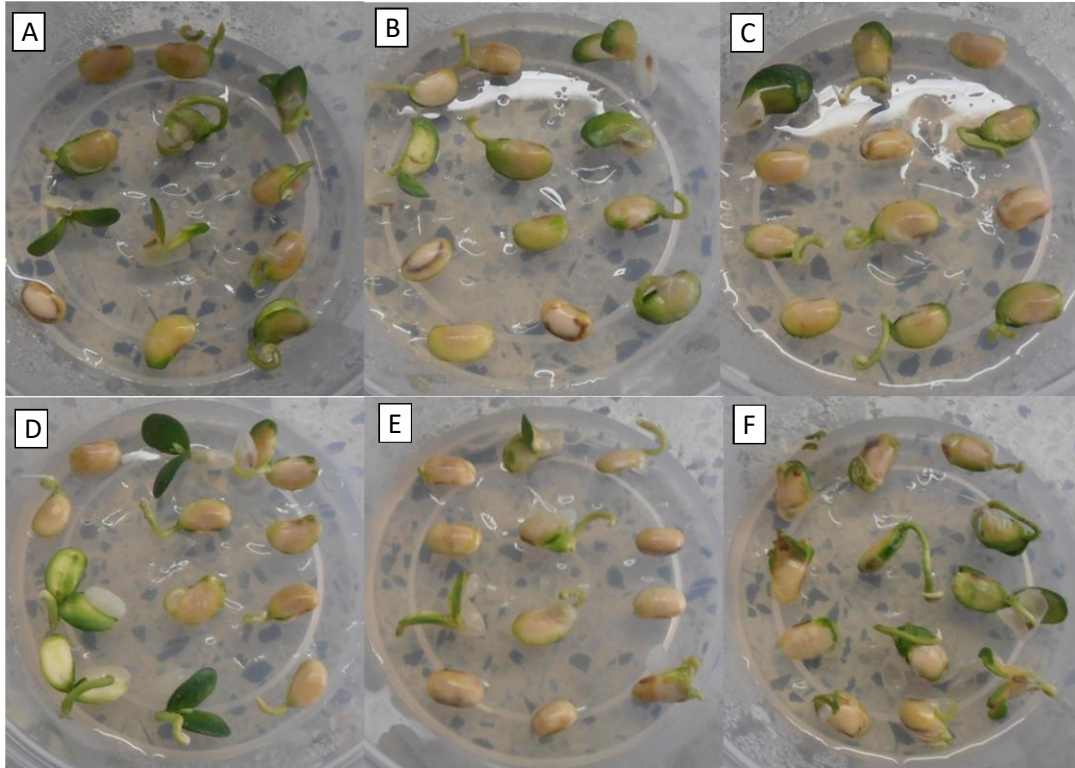
P34 y P29 no fueron protegidas, mientras que la variedad SK7 fue protegida desde el año 2014, y se encuentra vigente la medida de protección.

### **3.2. Adaptación de material de campo a un sistema de cultivo *in vitro***

En el ensayo de determinación de germinación basal por variedad (sin ningún tratamiento desinfectante) se observaron germinaciones de 189 semillas en la variedad SK7, 179 semillas en la variedad Soyica P34 y 186 semillas en la variedad P29, para un total de 94,5%, 89,5% y 93% respectivamente. Estos porcentajes fueron tomados como valor de referencia para determinar la afectación de las semillas según el sistema de desinfección.

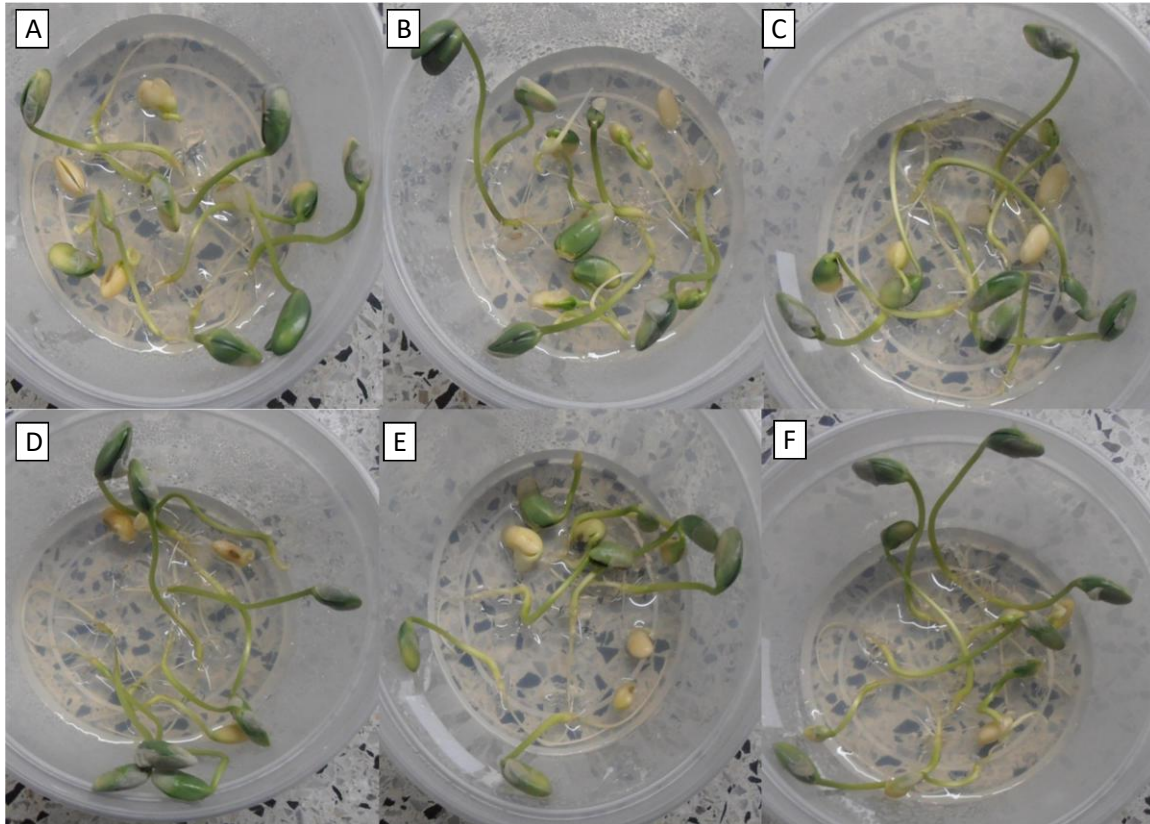
Cuando se desarrolló desinfección de las semillas utilizando sustancias líquidas (DFL) se observaron germinaciones de 23,6% para la variedad SK7 (34 semillas), 18,7% para la variedad Soyica P34 (27 semillas) y 26,4% para la variedad P29 (38 semillas). Al hacer la relación con las germinaciones basales, la tolerancia al método de esterilización para la DFL fue de 25% para la variedad SK7, 20,9% para la variedad Soyica P34 y 28,4% para la variedad P29. Adicionalmente, se observó que las semillas que germinaban lo hacían deficientemente, mostrando un pobre desarrollo de hipocótilo, con una longitud inferior a 2 cm, y ningún desarrollo de raíces, lo que dificultaría la generación de una planta completa (Figura 3-1). Se observó que la técnica de desinfección resultó bastante agresiva al reducir significativamente la germinación de las semillas sometidas a ella, lo que la hizo inadecuada para generar explantes sanos para transformación genética según las técnicas planteadas en el presente trabajo.

**Figura 3-1:** Germinación de semillas de soya desinfectadas con sustancias líquidas. Se presentan algunas unidades experimentales representativas de las variedades SK7 (A y B), Soyica P34 (C y D) y P29 (E y F).



Al desarrollar desinfección por gas cloro (DFG) las germinaciones observadas fueron de 71,5% para la variedad SK7 (103 semillas), 66% para la variedad Soyica P34 (95 semillas) y 69,4% para la variedad P29 (100 semillas). Al hacer la relación de las germinaciones de semillas desinfectadas contra semillas sin tratamiento desinfectante se encontró que la tolerancia al método de esterilización fue de 75,7% en la variedad SK7, 73,7% en la variedad Soyica P34 y 74,6% en la variedad P29. Bajo este tratamiento de desinfección se observó una germinación más cercana a la esperada en condiciones naturales, evidenciado en un mayor crecimiento del hipocótilo (superior a 6 cm en la mayoría de los casos), generación de raíces, y en general se observó la formación de plántulas vigorosas, con la capacidad de producir explantes sanos, utilizables en la técnica de transformación vegetal planteada en el presente trabajo (Figura 3-2).

**Figura 3-2:** Germinación de semillas de soya desinfectadas con gas cloro. Se presentan algunas unidades experimentales representativas de las variedades SK7 (A y B), Soyica P34 (C y D) y P29 (E y F).



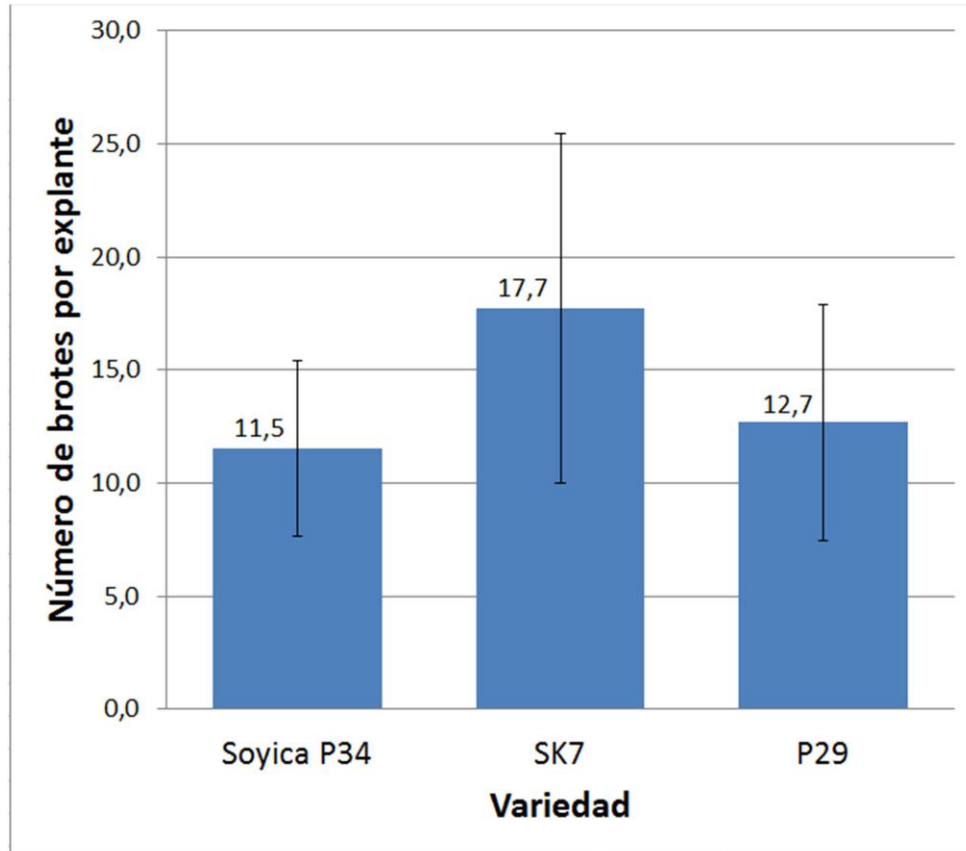
Debido a las diferencias morfológicas y en capacidad de germinación obtenidas entre semillas tratadas con cada una de las técnicas de desinfección, se escogió la desinfección por gas cloro como la más adecuada a utilizar bajo las condiciones del presente estudio. En ensayos posteriores, todas las semillas empleadas fueron desinfectadas siguiendo la metodología de gas cloro.

### **3.3. Evaluación de la capacidad de regeneración de cada variedad vegetal**

De los 240 explantes evaluados por cada variedad, desarrollaron brote regenerativo 212 explantes de la variedad Soyica P34 (88,3%), 181 explantes de la variedad SK7 (75,4%) y 231 explantes de la variedad P29 (96,2%). Al realizarse el recuento de brotes por explante

(sobre los explantes que regeneraron un brote) en cada variedad, se encontró que en promedio la variedad Soyica P34 regenera 11,5 brotes por explante ( $\pm 3,9$  brotes), la variedad SK7 regenera 17,7 brotes por explante ( $\pm 7,73$  brotes) y la variedad P29 regenera 12,7 brotes por explante ( $\pm 5,21$  brotes) (Figura 3-3).

**Figura 3-3:** Capacidad de regeneración de las variedades vegetales en número de brotes por explante.



Para determinar la normalidad de los datos se aplicó la prueba Shapiro-Wilk con ayuda del software R, obteniendo valores  $p$  de  $9,305e-8$  para la variedad P29,  $0,0003296$  para la variedad SK7 y  $0,0002986$  para la variedad Soyica P34. De este modo, debido a que el valor  $p$  es menor a  $0,05$  se rechaza la hipótesis de que los datos de las tres variedades provienen de una distribución normal con 95% de confianza.

La imposibilidad de asumir normalidad en este diseño hizo necesaria la utilización de pruebas no paramétricas con el fin de determinar qué variedad de soja presenta un mejor promedio de brotes por explante.

Se inició realizando el test de Kruskal-Wallis con ayuda del software R. Esta es una prueba no paramétrica que se utiliza cuando no se puede suponer normalidad, aplicada a  $k$  muestras para comparar el rango medio, es decir, se compara si las  $k$  muestras tienen igualdad en el rango medio o si al menos una de ellas es diferente (Hollander *et al.*, 2014). Se comparó si el promedio de brotes por explante de las semillas de soya es igual, o si al menos una es diferente. En términos estadísticos sería juzgar alguno de los siguientes sistemas de hipótesis:

- $H_0 : \mu_{Soyica P34} = \mu_{SK7} = \mu_{P29} \quad VS \quad H_a : \mu_{Soyica P34} \neq \mu_{SK7} = \mu_{P29}$
- $H_0 : \mu_{Soyica P34} = \mu_{SK7} = \mu_{P29} \quad VS \quad H_a : \mu_{Soyica P34} = \mu_{SK7} \neq \mu_{P29}$
- $H_0 : \mu_{Soyica P34} = \mu_{SK7} = \mu_{P29} \quad VS \quad H_a : \mu_{Soyica P34} \neq \mu_{P29} = \mu_{SK7}$
- $H_0 : \mu_{Soyica P34} = \mu_{SK7} = \mu_{P29} \quad VS \quad H_a : \mu_{Soyica P34} \neq \mu_{SK7} \neq \mu_{P29}$

Al realizar el test se obtuvo un valor  $p$  igual a 0 por lo cual se rechazó la hipótesis nula de que el promedio de brotes por explante es igual, sugiriendo que al menos uno de estos rangos medios es diferente a los demás. Por lo tanto, se procedió a utilizar el test de Wilcoxon, el cual se trata de una prueba no paramétrica que se utiliza cuando no se puede suponer normalidad, con el objetivo de comparar el rango medio de dos muestras para determinar si existen diferencias entre ellas, y de ser así identificar cuál es mayor (Hollander *et al.*, 2014). Se desarrolló la prueba dos a dos, con un  $\alpha=0,1$ , según se expresa a continuación:

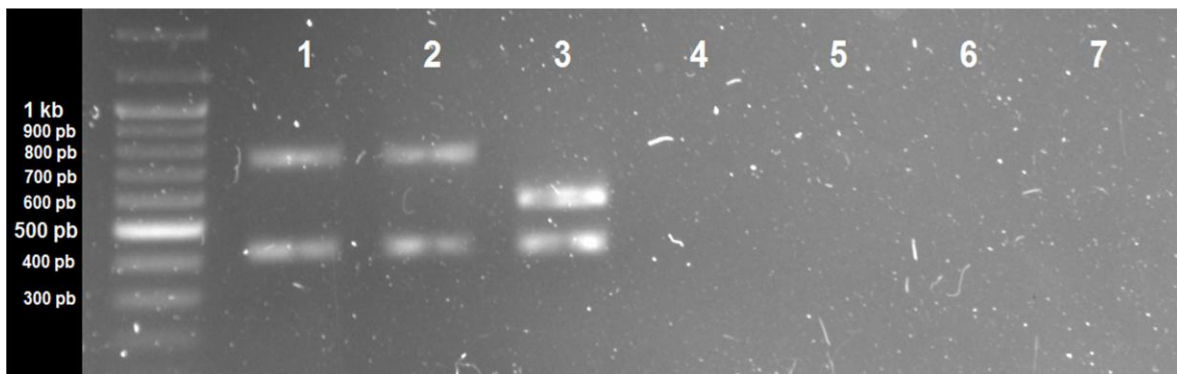
- $H_1 : \mu_{Soyica P34} = \mu_{SK7} \quad VS \quad H_a : \mu_{Soyica P34} < \mu_{SK7}$
- $H_2 : \mu_{P29} = \mu_{Soyica P34} \quad VS \quad H_a : \mu_{P29} < \mu_{Soyica P34}$
- $H_3 : \mu_{P29} = \mu_{SK7} \quad VS \quad H_a : \mu_{P29} < \mu_{SK7}$

Los valores  $p$  asociados a los test expuestos anteriormente fueron de 0,00 para la  $H_1$ , 0,99 para la  $H_2$  y 0,00 para la  $H_3$ . Para cualquier valor  $p$  menor que alfa se rechaza la hipótesis nula, indicando que el rango medio de brotes de la variedad SK7 es mayor que el rango medio de las variedades Soyica P34 y P29.

### 3.4. Acercamiento a la caracterización molecular y fenotípica de las cepas bacterianas

El conjunto de primers Ach5FtsZ es específico para la cepa LBA4404, no se observa amplificación para otras cepas de *A. tumefaciens*. El par de primers C58GlyA identifica las cepas C58C1, EHA101, EHA105 y GV3101 (no usada en este estudio) amplificando una banda de 423 pb. La pareja de primers pTiBo542 es específica para las cepas EHA101 y EHA105 (banda de 766 pb) y las distingue de las cepas C58C1, LBA4404 y GV3101 (no usada en este estudio). El conjunto de primers nptI genera un producto específico de 572 pb desde ADN de la cepa EHA101 únicamente (Deeba *et al.*, 2014). Al desarrollarse ensayos de PCR múltiple para caracterización de cepas de *A. tumefaciens* sobre las cepas empleadas en el presente estudio (AGL0, EHA105 y ATCC53213), se observó que las tres cepas amplificaron un fragmento de 423 pb esperado para el juego de primers C58GlyA. Así mismo, las cepas AGL0, derivada de la cepa EHA101 (Lazo *et al.*, 1991) y EHA105 generaron un amplificado de 766 pb, correspondiente al juego de primers pTiBo542. La cepa ATCC53213 produjo un amplificado de 572 pb, correspondiente al juego de primers nptI. Ninguna de las tres cepas produjo amplificación con los primers Ach5FtsZ (Figura 3-4).

**Figura 3-4:** PCR múltiple para caracterización de cepas de *A. tumefaciens*. carril 1: cepa AGL0; carril 2: cepa EHA105; carril 3 cepa ATCC53213; carriles 4 al 7: controles de agua sobre los primers pTiBo542 (4) Ach5FtsZ (5) C58GlyA (6) y nptI (7). El marcador de peso molecular usado corresponde al GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).





Se encontraron diferencias marcadas entre el patrón de resistencia a antibióticos de las diferentes cepas evaluadas, evidenciado por presencia/ausencia de crecimiento microbiano en medio adicionado con cada antibiótico, según se expresa en la Tabla 3-4.

**Tabla 3-4:** Patrón de resistencia a antibióticos de las cepas utilizadas

Cepa	Kanamicina 50 mg/L	Rifampicina 50 mg/L	Vancomicina 100 mg/L	Cloramfenicol 40 mg/L	Gentamicina 70 mg/L	Estreptomicina 70 mg/L	Espectinomicina 70 mg/L
AGL0	-	+	+	+	-	+	-
EHA 105	-	+	-	+	+	+	+
ATCC 53213	+	-	-	+	-	+	+

(-) no hubo crecimiento microbiano

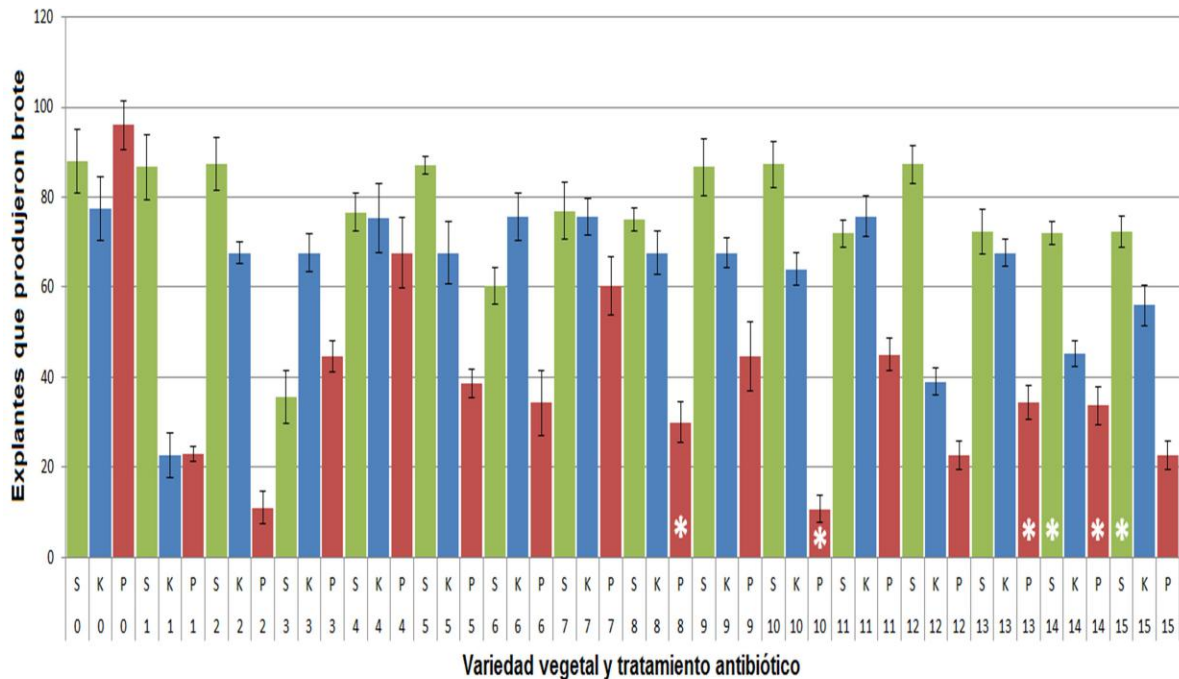
(+) la cepa desarrolló biomasa sobre el medio de cultivo

### 3.5. Uso de antibióticos para eliminar la bacteria del sistema

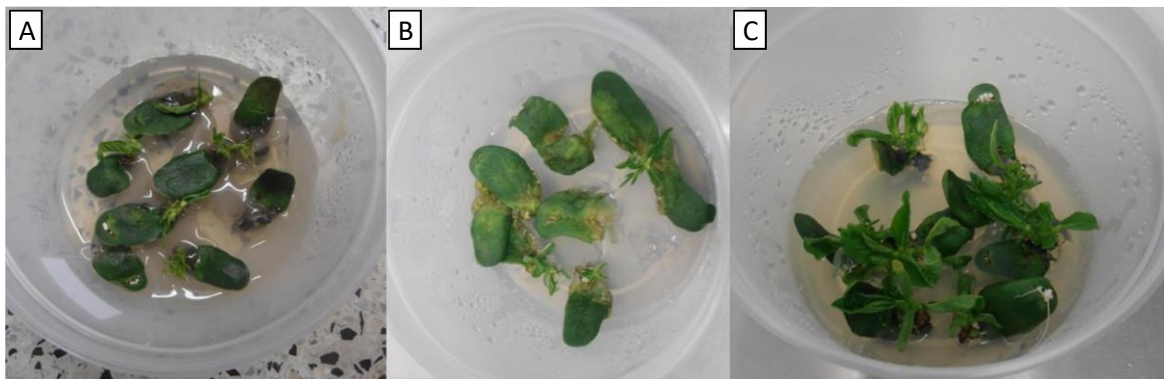
Al hacerse el recuento de explantes que regeneraron al menos un brote en los diferentes tratamientos y variedades vegetales, se observó que había grandes diferencias en el comportamiento entre variedades y tratamientos. Se promediaron los resultados obtenidos en las tres réplicas del ensayo y se graficaron los promedios como se observa en la Figura 3-5.

En general se observó que la aplicación de antibióticos afecta negativamente la regeneración de los explantes de soya en el sistema *in vitro* propuesto en este trabajo. En todas las combinaciones sencillas de antibiótico se observó reactivación de la bacteria a la primera (tratamiento 2) o a la cuarta semana (tratamientos 1, 3 y 4) (Figura 3-6A). En las combinaciones doble, triple y cuádruple no se presentó reactivación bacteriana, pero se observó que a medida que se adicionaba una mayor cantidad de antibióticos al medio de regeneración se disminuía la capacidad de regeneración de los explantes y aparecían malformaciones en las variedades P29 y Soyica P34 (Figura 3-6B).

**Figura 3-5:** Regeneración de explantes sometidos a diferentes tratamientos antibióticos. Las letras “S” (Soyica P34), “P” (P29) y “K” (SK7) corresponden a las variedades vegetales. Los números del 0 al 15 corresponden a los tratamientos antibióticos aplicados según se lista en la Tabla 2-4. Los asteriscos (\*) sobre algunas barras indican que en esa variedad y tratamiento ocurrieron malformaciones en los explantes.



**Figura 3-6:** Diferentes efectos observados ante combinaciones de antibióticos. (A) Reactivación de la bacteria, variedad SK7 tratamiento 2; (B) Malformaciones, variedad P29 tratamiento 8; (C) Crecimiento normal, variedad SK7 tratamiento 7.



Cada variedad vegetal respondió de forma diferente ante la adición de diferentes combinaciones de antibióticos. La variedad que mantuvo su capacidad regenerativa más estable entre los diferentes tratamientos fue Soyica P34, quien tiene un promedio entre tratamientos de 76,48 ( $\pm 13,7$ ) explantes con brote. Le sigue la variedad SK7, quien tuvo un promedio entre tratamientos de 63,29 ( $\pm 15,3$ ) explantes con brote. La variedad que vio afectada su regeneración en mayor medida fue la P29, con un promedio entre los tratamientos de 38,71 ( $\pm 21,8$ ) explantes con brote. Sin embargo, la variedad SK7 mostró tener "rusticidad" respecto a la adición de antibióticos al medio de regeneración, ya que en ningún caso presentó malformaciones y el vigor de sus brotes se mantuvo en todos los tratamientos, al contrario de las variedades Soyica P34 y P29, quienes decayeron en el vigor de sus brotes en las combinaciones de antibiótico triple y cuádruple.

Para analizar los resultados obtenidos en esta prueba se desarrolló una prueba de Análisis de Varianza (ANDEVA) que evalúa la importancia de uno o más factores, pues compara la media de la variable respuesta en los diferentes niveles de los factores (Melo *et al.*, 2007). Para este apartado se utilizó la función *aov* de la librería *stats* del software estadístico R y para una presentación más sencilla de interpretar se utilizó la librería *broom* (Tabla 3-5). La respuesta que se evaluó fue la capacidad de regeneración, es decir, la cantidad de explantes que presentaron por lo menos un brote.

**Tabla 3-5:** Tabla de Análisis de Varianza para uso de antibióticos

Factor	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Estadística F	p-valor
Antibiótico	15	16578,2152777777	1105,21435185185	5,32295513727446	3,59836074109329e-8
Variedad	2	35278,1805555555	17639,0902777777	84,9537341363904	4,37039799382048e-24
Residuals	126	26161,5972222222	207,631723985891		

Puede verse que existen diferencias significativas “a casi cualquier nivel de significancia” entre los efectos estimados de los antibióticos, es decir, entre el número de explantes promedio observados de cada tratamiento (antibiótico) ( $p < 0,0001$ ).

La comparación entre dos o más efectos del experimento se calculó bajo la metodología de contrastes, los cuales permiten evaluar las combinaciones de antibióticos que resultan ser estadísticamente más significativas (Melo *et al.*, 2007). Mediante la librería *agricolae*

es posible aplicar esta metodología propuesta por Tukey. Los resultados obtenidos se pueden apreciar en la Tabla 3-6.

**Tabla 3-6:** Resultados de prueba de contrastes sobre ensayo de uso de antibióticos

Número de Tratamiento §	Estimación	Error estándar	Estadística F	p-valor (+)
0	37,77777	6,79267	5,56154	1,52896e-7***
1	-5,22222	6,79267	-0,76880	0,44344
2	6	6,79267	0,88330	0,37875
3	8,77777	6,79267	1,29224	0,19863
4	23,88888	6,79267	3,51686	0,00060***
5	15,11111	6,79267	2,22461	0,02788*
6	7,44444	6,79267	1,09595	0,27518
7	21,66666	6,79267	3,18971	0,00179**
8	8,22222	6,79267	1,21045	0,22837
9	17	6,79267	2,50269	0,01360*
10	4,66666	6,79267	0,68701	0,49333
11	0,33333	6,79267	0,04907	0,96093
12	14,88888	6,79267	2,19190	0,03022*
13	8,77777	6,79267	1,29224	0,19863
14	1	6,79267	0,14721	0,88319
15	1,00001	6,79267	0,14721	0,88319
Intercepto	53,13194	5,09450	10,42926	9,70545e-19 ***
Variedad P29	-24,58333	2,94131	-8,35794	1,00061e-13***
Variedad Soyica P34	13,18750	2,94131	4,48354	0,00001***

§: Según lo explicado en la Tabla 2-4

+: Nivel de significancia: <0,001: \*\*\*; <0,01: \*\*; <0,05: \*

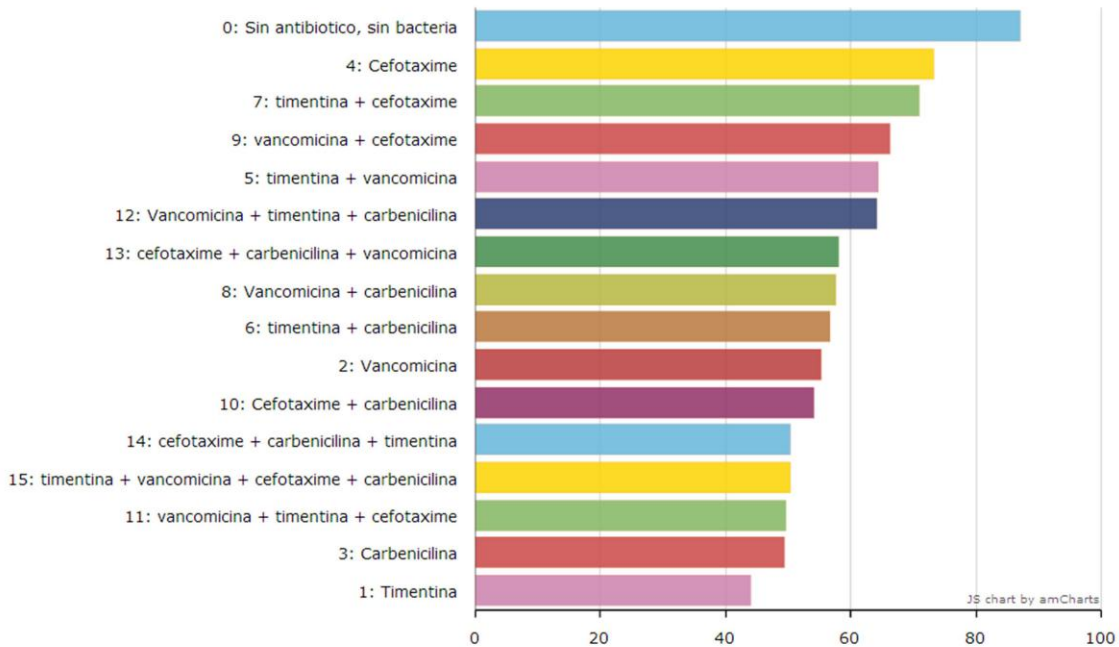
*Residual standard error: 14,41 on 126 degrees of freedom*

*Multiple R-squared: 0.6647, Adjusted R-squared: 0,6194*

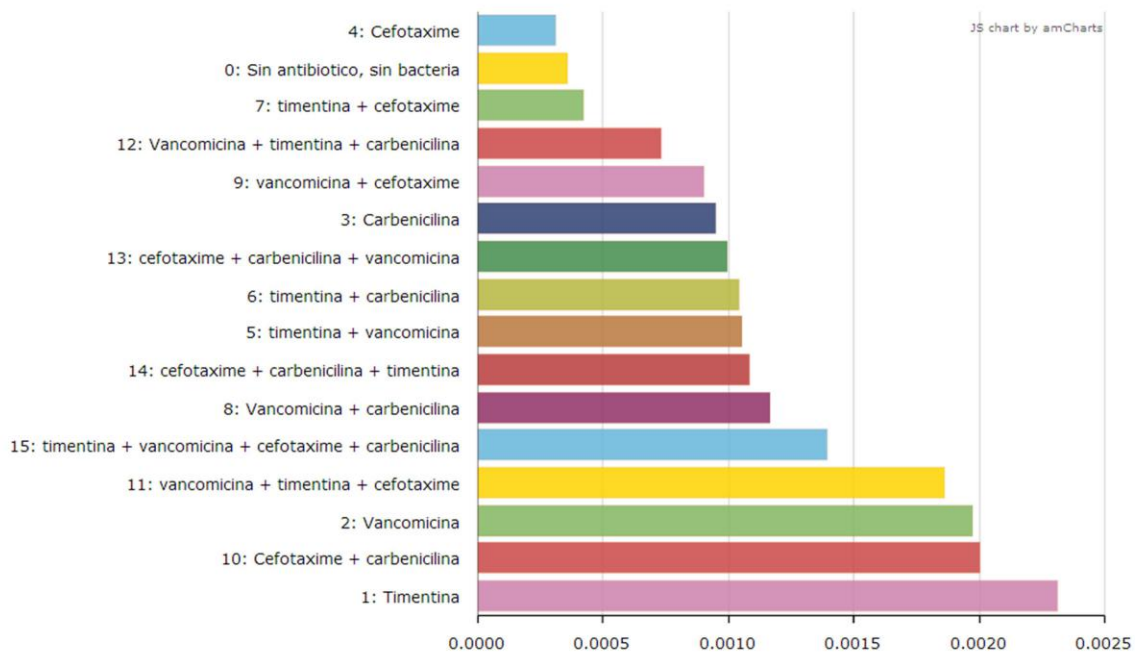
*F-statistic: 14,69 on 17 and 126 DF, p-value: < 2,2e-16*

Según los datos expuestos en la Tabla 3-6, los menores valores  $p$  corresponden en primer lugar al tratamiento control (tratamiento 0), en segundo lugar, al tratamiento con cefotaxima sola (tratamiento 4), y en tercer lugar al tratamiento con timentina + cefotaxima (tratamiento 7). Tomando el efecto combinado de las tres variedades se obtuvieron los datos de promedio de explantes por tratamiento (Figura 3-7) y coeficiente de variación de explantes por tratamiento (Figura 3-8).

**Figura 3-7:** Promedio combinado de regeneración de explantes de las tres variedades vegetales según tratamiento antibiótico.



**Figura 3-8:** Coeficiente de variación de regeneración de explantes entre las tres variedades vegetales según tratamiento antibiótico.



Según los datos graficados en las Figuras 3-7 y 3-8, se puede observar la misma tendencia obtenida en la prueba de contrastes, en la cual los tratamientos 0, 4 y 7 tienen

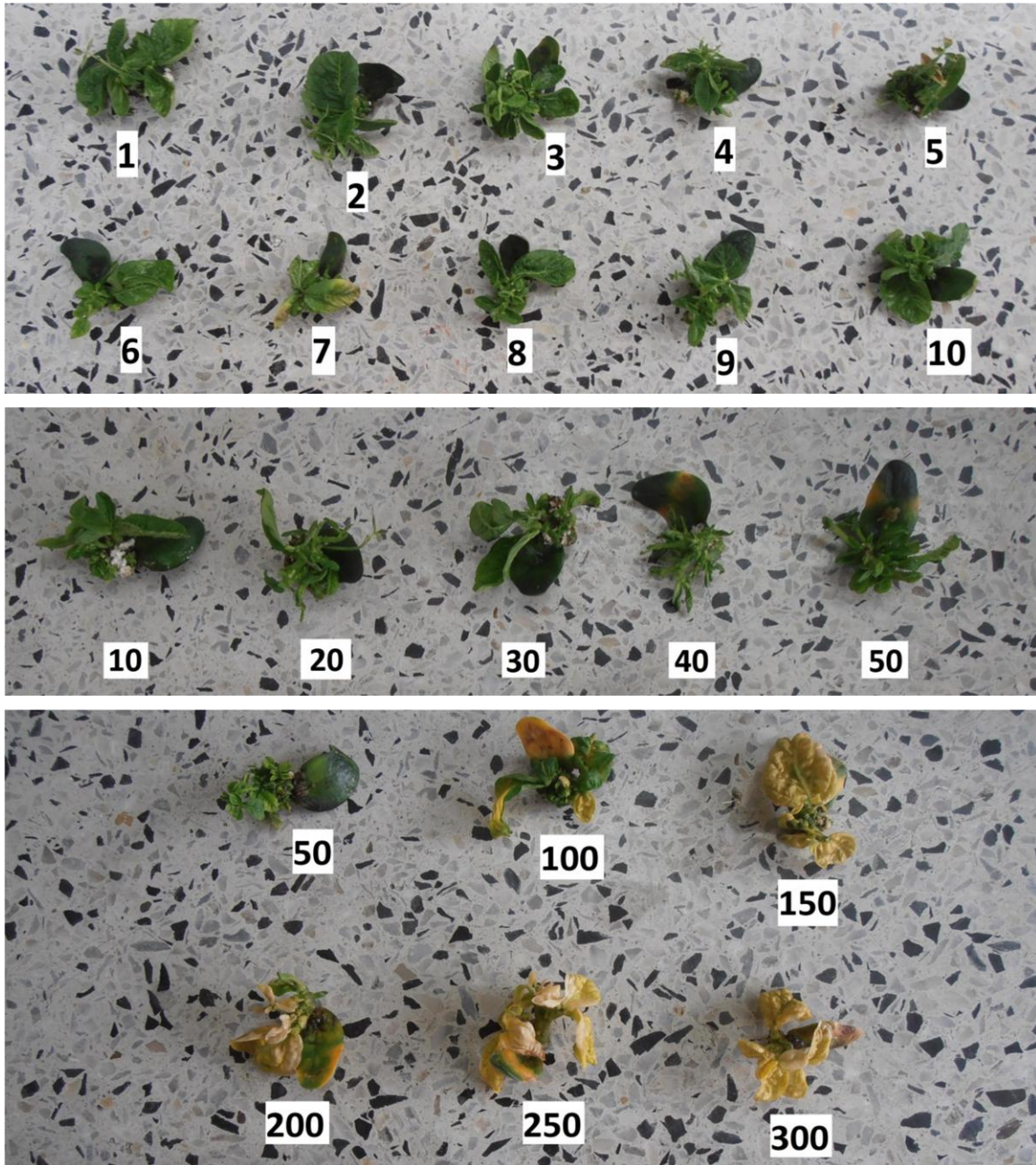
los resultados más adecuados al criterio de selección de antibiótico, que incluyen un alto promedio de regeneración y un bajo coeficiente de variación en la respuesta entre las tres variedades empleadas, pero debía considerarse que el tratamiento 0 es el control de la prueba y el tratamiento 4 tuvo reactivación bacteriana. Por tanto, para seleccionar una combinación de antibióticos adecuada para utilizar en posteriores ensayos se tuvo en cuenta que no presentara reactivación bacteriana, que no presentara malformaciones en ninguna de las variedades vegetales y que la capacidad regenerativa de las tres variedades fuera similar entre ellas dentro del tratamiento. Por no cumplir estos criterios las combinaciones 1, 2, 3, 4, 8, 10, 13, 14 y 15 fueron descartadas. Las combinaciones 11 y 12 igualmente se descartaron ya que, aunque no presentaron malformaciones en ninguna variedad, si redujeron el vigor de los brotes de las variedades P29 y Soyica P34. Entre los tratamientos restantes, el que ofrecía una mayor estabilidad en la regeneración de las tres variedades fue el tratamiento 7 (timentina + cefotaxima). De esta manera se seleccionó esta combinación de antibióticos para desarrollar los ensayos subsecuentes.

## **3.6. Selección con herbicida**

### **3.6.1. Selección de corto plazo**

Al cumplirse el período de regeneración (4 semanas) con las diferentes concentraciones de glifosato evaluadas, se observó el crecimiento de los explantes y la afectación que el herbicida produjo sobre ellos. En ninguno de los rangos evaluados se suspendió la regeneración de brotes, evidenciado por la presencia de explantes con brotes en todos los tratamientos. Se observó que, en los rangos bajo y medio de herbicida, al cabo de 4 semanas de regeneración no es evidente que haya una fuerte afectación fisiológica de los explantes, observando solo una ligera clorosis en las concentraciones de 40 y 50 mg/L de glifosato. En los explantes sometidos al rango alto de concentraciones de herbicida se observa un claro efecto “degradé”, en el que la clorosis ocasionada por el herbicida se incrementa conforme aumenta la concentración de glifosato (Figura 3-9)

**Figura 3-9:** Efectos de selección de corto plazo (4 semanas) con glifosato *in vitro*. Los números indican la concentración utilizada en el medio en mg/L de glifosato.

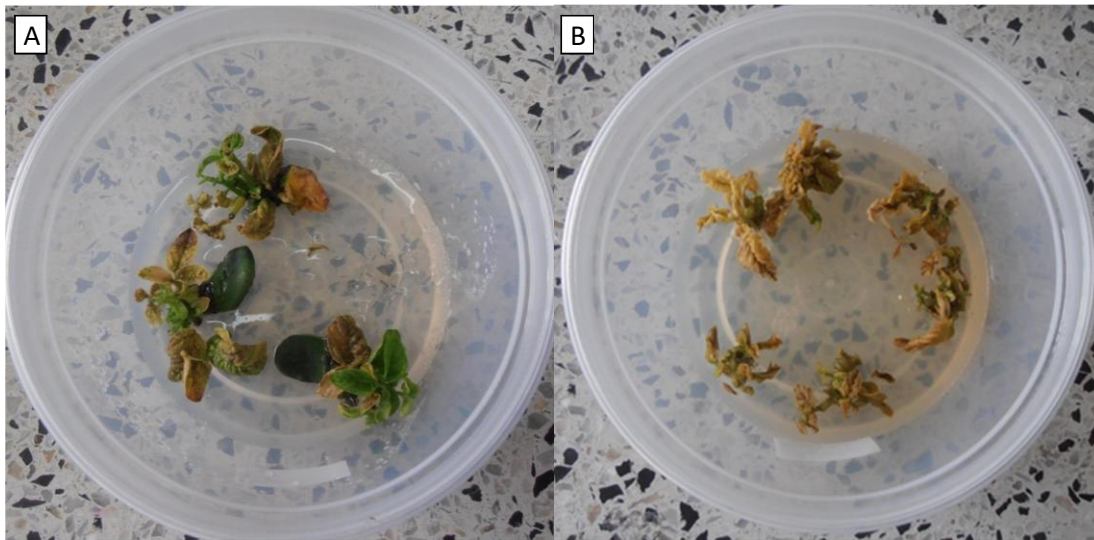


Según las observaciones hechas en el ensayo de selección a corto plazo, se escogió la concentración de 200 mg/L de glifosato para hacer ensayos de transformación vegetal, debido a que evidenciaba un claro efecto del herbicida sobre la biomasa vegetal en el período de regeneración, conservando fracciones del meristema verdes a partir de las

cuales podrían regenerarse brotes tolerantes que hubiesen regenerado a partir de células transformadas.

De este modo se adelantaron ensayos preliminares de transformación vegetal, en los que se hizo cocultivo de explantes de las tres variedades con las cepas ATCC53213 por una parte, y AGL0 y EHA105 con el vector E-IGP por otra. El herbicida se adicionó únicamente durante el período de regeneración y se retiró en las fases posteriores. En estos ensayos se observó que, a pesar de que al final del periodo de regeneración se obtenían explantes con brotación efectiva, e incluso con brotes verdes, de apariencia sana (Figura 3-10A), cuando estos eran trasladados a medio de elongación sin herbicida perdían completamente su viabilidad al cabo de 4 semanas (Figura 3-10B). Se observó el mismo fenómeno cuando la concentración de herbicida se redujo a 100 mg/L en el periodo de regeneración, y posteriormente se retiró en el periodo de elongación.

**Figura 3-10:** Selección de corto plazo sobre explantes transformados con casetes de tolerancia a glifosato. A: Final del periodo de regeneración. B: Final del periodo de elongación.



Los resultados obtenidos indicaron que la selección de corto plazo con glifosato no es una alternativa viable para hacer transformación *in vitro* de soya, según la metodología propuesta en el presente trabajo. Esto debido a que las concentraciones utilizadas durante la regeneración ocasionan un efecto deletéreo irreversible en todos los explantes, que se expresa durante el periodo de elongación. Por esta razón se descartó este método



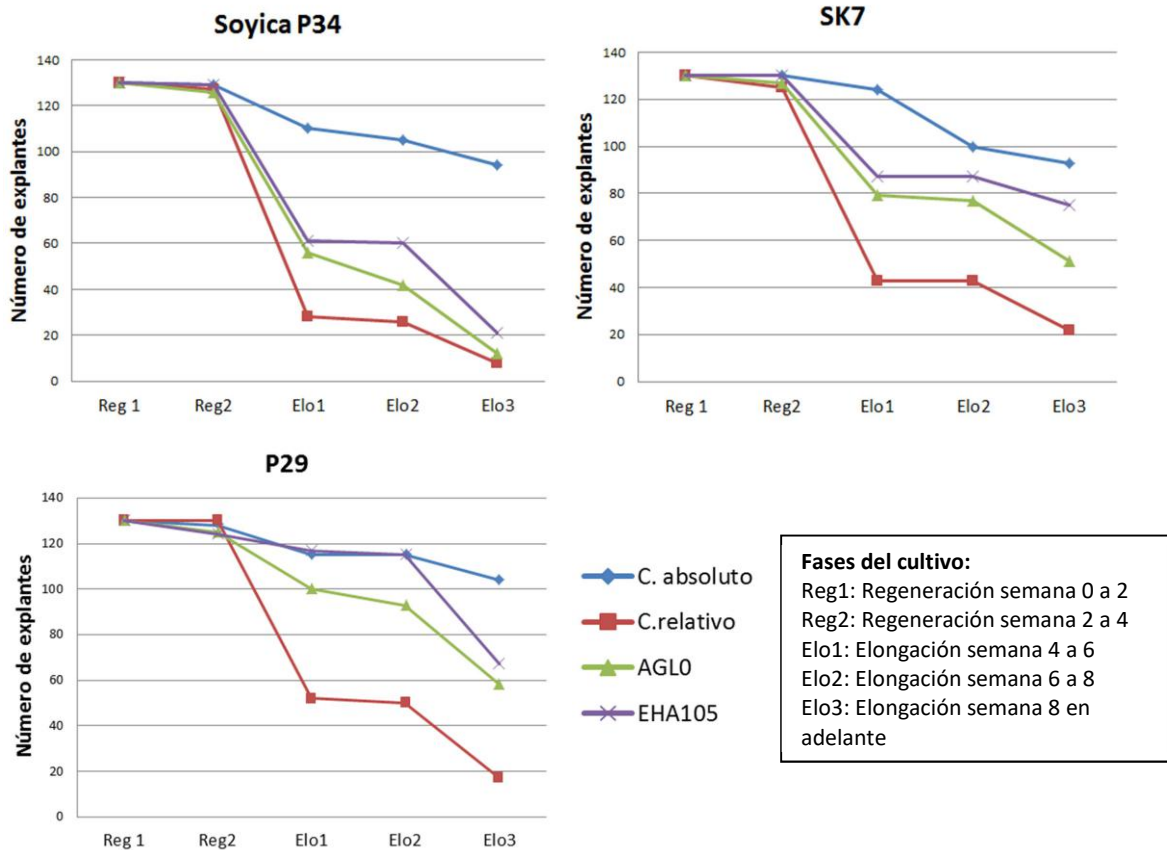
de selección y se ensayó un proceso que resultara menos agresivo sobre el tejido vegetal, pero que igualmente restringiera el crecimiento de brotes a partir de células no transformadas.

### **3.6.2. Selección a largo plazo**

En el ensayo de selección de largo plazo se hizo el recuento de explantes que iniciaron y que fueron pasando a cada fase del proceso de transformación, como un indicativo de la viabilidad del tejido. Esto debido a que, dentro del proceso planteado, para pasar a una siguiente fase, el explante debe cumplir ciertos criterios que conducen a una mayor tasa de recuperación de brotes efectivamente transformados, y que se esquematizan en la Figura 2-11.

En la Estrategia 1 se observó que en general, en las tres variedades vegetales la adición de glifosato al medio de cultivo redujo la regeneración de los explantes respecto al control sin adición de herbicida. Tomando como referencia los explantes sometidos al control absoluto que llegaron a la etapa Elo3 en cada variedad (100%), se observó que en la variedad Soyica P34 se presentó la mayor afectación por parte del herbicida, llegando a la etapa Elo3 el 8,5% de explantes en control relativo, el 12,8% en transformación con la cepa AGL0 y el 22,3% en la transformación con la cepa EHA105. Le sigue la variedad P29, en la cual alcanzaron la etapa Elo3 el 16% de explantes en el control relativo, el 55,8% en transformación con la cepa AGL0 y el 64,4% en transformación con la cepa EHA105. La variedad más tolerante a la adición de herbicida fue la SK7, en la cual alcanzaron la etapa Elo3 el 23,7% de explantes en control relativo, el 54,8% en transformación con AGL0 y el 80,6% en transformación con la cepa EHA105 (Figura 3-11).

**Figura 3-11:** Explantes recuperados en las diferentes fases de selección y elongación, sometidos a la estrategia de selección 1.

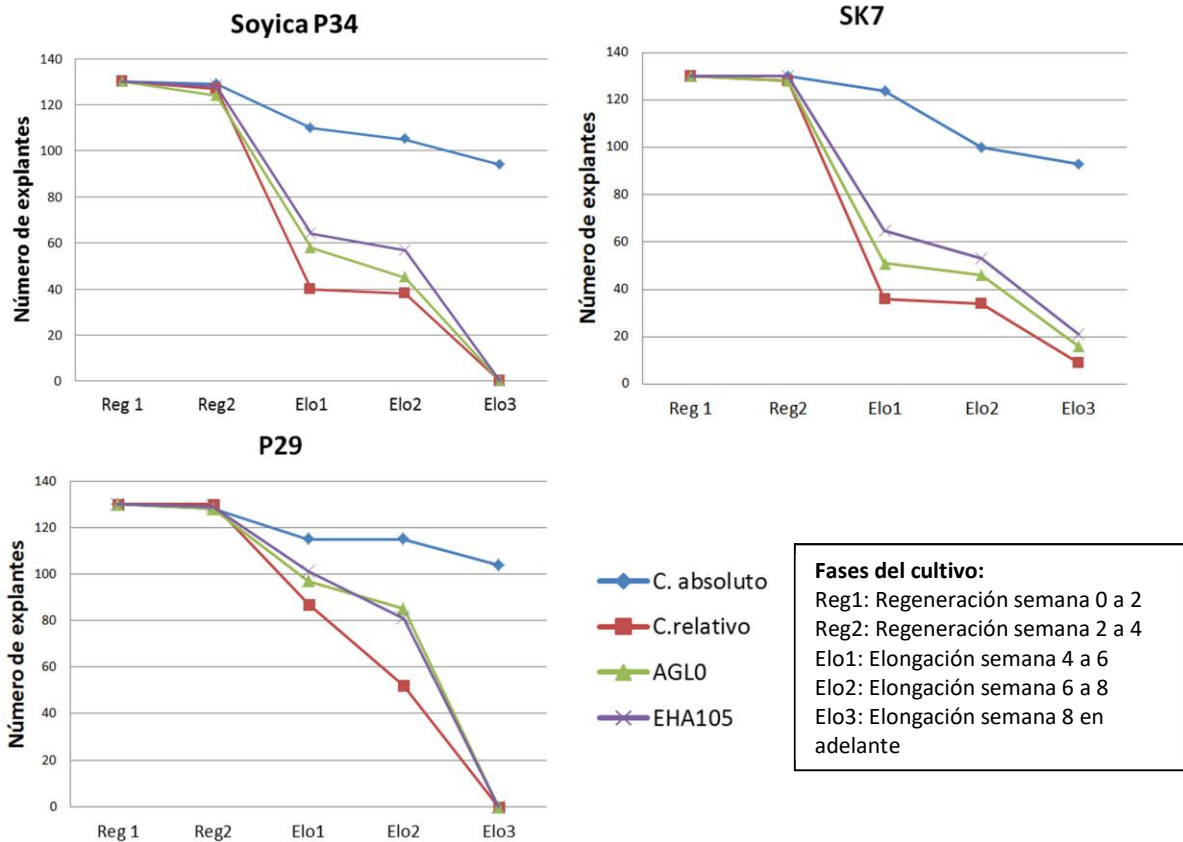


En esta estrategia, en general se obtuvieron explantes de apariencia sana, sin alteraciones morfológicas, en las tres variedades vegetales evaluadas. Aunque fue posible obtener explantes apropiados con las dos cepas bacterianas en todas las variedades, la cepa EHA105 fue la que generó la mayor cantidad de explantes adecuados en la etapa Elo3 en todos los casos. La variedad SK7 fue la que produjo una mayor cantidad de explantes adecuados en la fase Elo3, seguido por la variedad P29. La variedad Soyica P34 mostró una tolerancia menor al sistema de transformación planteado en este trabajo, lo que se evidencia por una escasa obtención de explantes adecuados en la etapa Elo3.

En la estrategia 2 se observó una afectación más acentuada del glifosato sobre el tejido vegetal, evidenciado en una nula recuperación de explantes en la fase Elo3 para las variedades Soyica P34 y P29, y una muy escasa recuperación de explantes adecuados en la fase Elo3 en la variedad SK7, de 9,7% en el control relativo, 17,2% en la

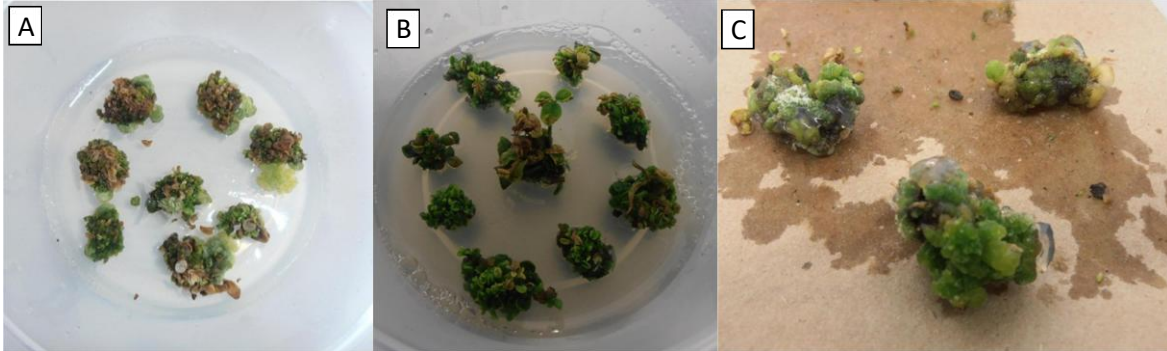
transformación con la cepa AGL0 y 22,6% en la transformación con la cepa EHA105, respecto a su control absoluto (100%) (Figura 3-12).

**Figura 3-12:** Explantes recuperados en las diferentes fases de selección y elongación, sometidos a la estrategia de selección 2.



La imposibilidad de recuperación de material adecuado en las variedades Soyica P34 y P29 se debió a que durante la fase Elo2, en estas dos variedades se generaba una alteración morfológica importante en todos los explantes, consistente en la transformación del explante de organogénico a callogénico (Figura 3-13), lo que hacía imposible de obtener algún brote útil para los procesos subsecuentes. Este fenómeno no ocurrió en la variedad SK7 la cual, aunque vio afectada su capacidad regenerativa, en ningún explante se generó tejido típico de callo.

**Figura 3-13:** Afectación morfológica en estrategia de selección 2. A. Explantes de la variedad P29 en la fase Elo2. B. Explantes de la variedad SK7 en la fase Elo2. C. Acercamiento, explantes de la variedad Soyica P34 al finalizar la fase Elo2.



Para hacer el análisis del Modelo lineal generalizado, el cual es una generalización flexible de la regresión lineal ordinaria, que permite relacionar la distribución aleatoria de la variable dependiente en el experimento con la parte sistemática, o no aleatoria, a través de una función, denominada función de enlace (McCullagh y Nelder, 1989), se consideró el siguiente modelo:

$$\begin{cases} y_k \sim \text{Gaussian}(\mu_k) \\ \mu_k = \eta_k = \beta_1 + \beta_2 \text{Estrategia1}_k + \beta_3 \text{Estrategia2}_k + \beta_4 \text{Variedad1}_k + \beta_5 \text{Variedad2}_k + \beta_6 \text{Cepa1}_k + \beta_7 \text{Cepa2}_k \\ y_1, \dots, y_n \text{ independientes} \end{cases}$$

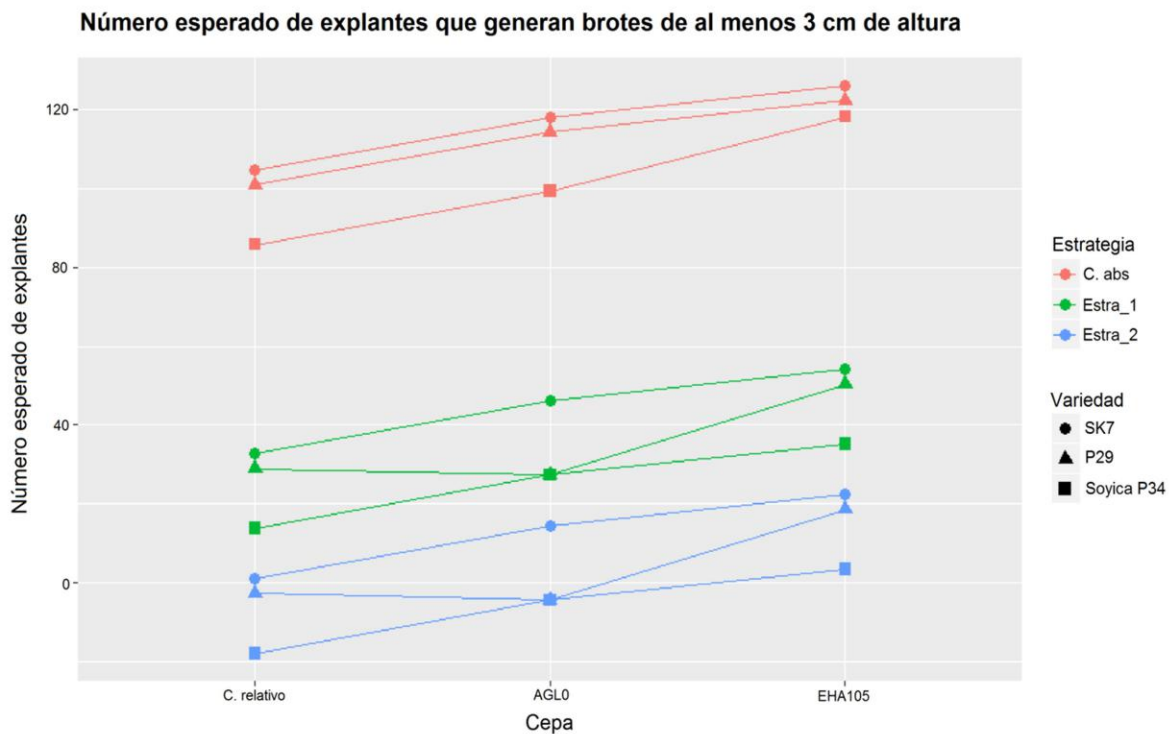
Donde  $Y_k$  = Número de explantes  $k$  que crecen al menos 3 cm. y  $x_k$  = Estrategias, Variedades y Cepas a la que se expone el  $k$ -ésimo explante.

El resultado del ajuste del modelo con función de enlace identidad se esquematiza en el Anexo B1, en el cual se asignaron las etiquetas de cepa 1 a AGL0, cepa 2 a EHA105, variedad 0 a SK7, variedad 1 a P29 y variedad 2 a Soyica P34.

Considerando que se asignó un  $\alpha=0,1$ , las variables son significativas en la columna de los p-valores ( $\text{Pr}(>|t|)$ ), es decir, las variables predictoras generan cambios en la variable de respuesta. Se observa una excepción en la variable de variedad P29, que indica que las variedades que presentan un mayor contraste en la prueba son SK7 y Soyica P34, siendo P29 poco contrastante con respecto a las demás, lo que hace que pierda significancia.

Luego se analizaron los valores de los parámetros del modelo, generando una gráfica de ajuste del modelo (Figura 3-14). Cada resultado negativo significa el número de explantes que no generó brotes de por lo menos 3 cm de altura, según la estrategia y variedad propuesta, y los resultados positivos presentes en las cepas representan lo contrario. Como el interés fue determinar la estrategia y variedad que menos mortandad tuviese y la cepa de la que se pudiera aislar un mayor número de brotes aptos para enraizamiento y propagación, la Estrategia 1, Variedad SK7 y Cepa EHA105 fueron las elegidas.

**Figura 3-14:** Ajuste del modelo lineal generalizado para evaluación de estrategias de selección de largo plazo. C. abs: control absoluto; C. relativo: control relativo; Estra: estrategia.



Para verificar el supuesto de normalidad del modelo se procede a graficar los datos como se esquematiza en el Anexo B2, donde puede observarse que los datos se ubican dentro de las bandas de confianza, indicando que el modelo tiene un ajuste adecuado. Igualmente, en la gráfica de Distancia de Cook, los datos se organizan de forma aleatoria, lo que avala el modelo. Para confirmar la independencia y normalidad de los residuos se procedió a aplicar las pruebas de Durbin-Watson y Shapiro-Wilk, cuyos resultados se detallan en la Anexo B3. El valor del estadístico de Durbin-Watson se aproxima a dos, lo

cual implica total independencia, y la prueba de Shapiro-Wilk no rechaza la hipótesis nula de normalidad, esto se aprecia ya que el valor p es "grande".

Durante la fase Elo 3 se permitió la elongación de los brotes regenerados que cumplieron los criterios para alcanzar esta fase. Los brotes que elongaron lo suficiente fueron individualizados y nominados según los criterios citados anteriormente (sección 2.8.3). Desde los explantes transformados y seleccionados utilizando la estrategia 1, se obtuvieron 37 líneas de la variedad P29, nombradas como PJ1, PJ2, PJ3....hasta PJ14 las que fueron transformadas con la cepa AGL0; y PJ15, PJ16, PJ17.....hasta PJ37 las que fueron transformadas con la cepa EHA105. De la variedad SK7 se obtuvieron 53 líneas nombradas como KJ1, KJ2, KJ3.....hasta KJ22 las transformadas con la cepa AGL0; y KJ23, KJ24, KJ25... hasta KJ53 las transformadas con la cepa EHA105. De la variedad Soyica P34 se obtuvo una única línea, nominada como SJ1, transformada con la cepa AGL0. Ninguno de los explantes seleccionados con la estrategia 2 produjeron brotes aptos para individualizar.

El ensayo de evaluación de estrategias de selección de largo plazo sugirió que la variedad vegetal más apta para someter al proceso de transformación propuesto en el presente trabajo era la SK7. Igualmente, que la estrategia de selección más adecuada era la estrategia 2, y que al transformar con la cepa EHA105 se obtenía la mayor cantidad de brotes potencialmente transgénicos. De esta forma, se escogió la variedad SK7, transformada con la cepa EHA105 y seleccionada con la estrategia 2, para generar líneas transgénicas que expresen casetes contrastantes. Siguiendo la metodología empleada para generar posibles transformantes primarios descrita en apartados anteriores, se obtuvieron 34 líneas potencialmente transformadas de la variedad SK7 con el casete E-2, usando la cepa EHA105. Se nombraron como 5M1, 5M2, 5M3.....hasta 5M34. Por otra parte, se obtuvieron 55 líneas independientes a partir de transformaciones hechas con el casete pMON546, utilizando la cepa ATCC53213 y la variedad SK7. Estas se nominaron como MM1, MM2, MM3....hasta MM55.

Todas las líneas individualizadas (KJ, PJ, SJ, 5M y MM) se propagaron antes de hacer cualquier análisis molecular o fenotípico sobre ellas, con el fin de tener biomasa suficiente para consumir en las pruebas y simultáneamente conservar una copia de la línea en el "banco de líneas" del grupo IGP. Durante este período de crecimiento se observó que el

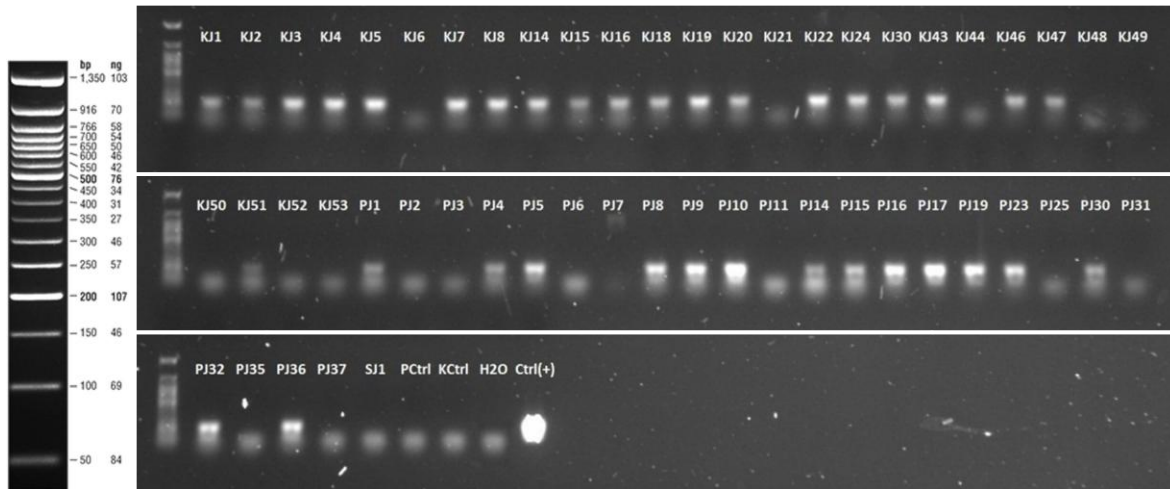
comportamiento de todas las líneas no era el mismo, habiendo líneas que crecieron satisfactoriamente en un periodo de un mes, y líneas que durante el mismo período no mostraron crecimiento alguno, o incluso murieron. Durante esta primera fase de crecimiento se perdieron algunas líneas que no se desarrollaron eficientemente. Las que crecieron normalmente propagaron, y una vez obtenida una cantidad suficiente de material vegetal que permitiera consumir biomasa en los análisis fenotípicos y moleculares sin perder la línea en el laboratorio, se desarrollaron estos análisis.

## **3.7. Pruebas moleculares y fenotípicas**

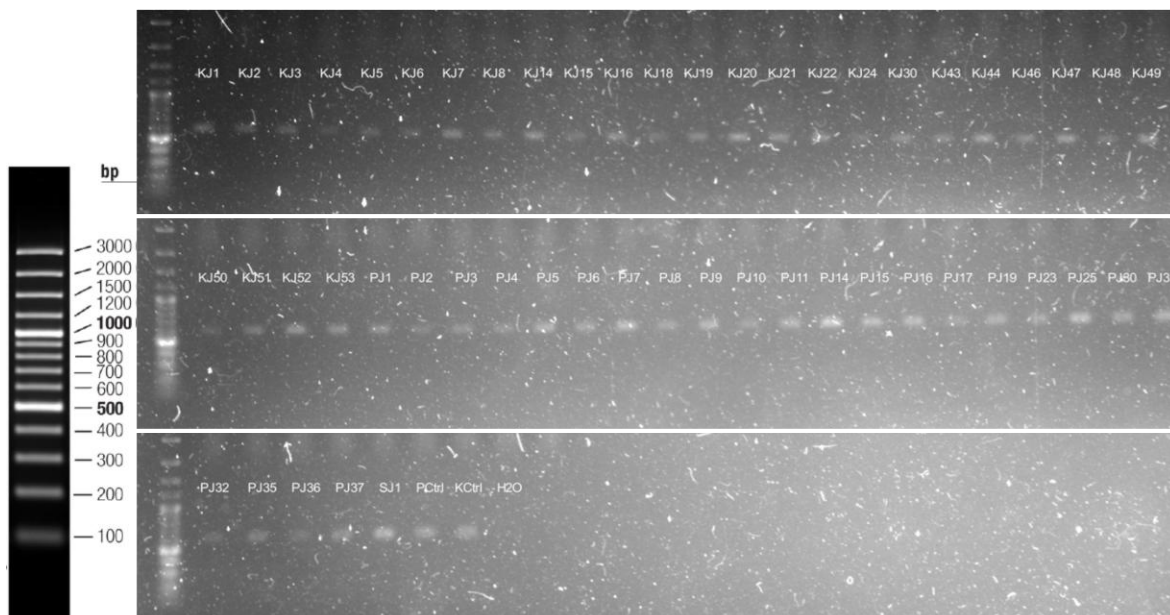
### **3.7.1. Determinación de presencia / ausencia del transgén**

Se hizo extracción de ADN de 53 líneas transformadas con el casete E-IGP, 18 líneas transformadas con el casete E-2 y 36 líneas transformadas con el casete pMON546, que superaron el proceso de selección *in vitro* y que además hubiese sido posible hacer su propagación. Sobre estas líneas se desarrolló ensayos de PCR para la detección del transgén, y del gen de actina como control de gen constitutivo (Figuras 3-15 a 3-20).

**Figura 3-15:** Detección del casete E-IGP sobre posibles transformantes primarios. El nombre de la línea se indica en la parte superior de cada carril. PCtrl: variedad P29 sin transformar, KCtrl: variedad SK7 sin transformar, H2O: control absoluto, Ctrl(+): control positivo, vector plasmídico E-IGP extraído por miniprep. El marcador de peso molecular corresponde al 50 bp DNA Ladder (New England Biolabs). Tamaño del amplificado: 205 pb.

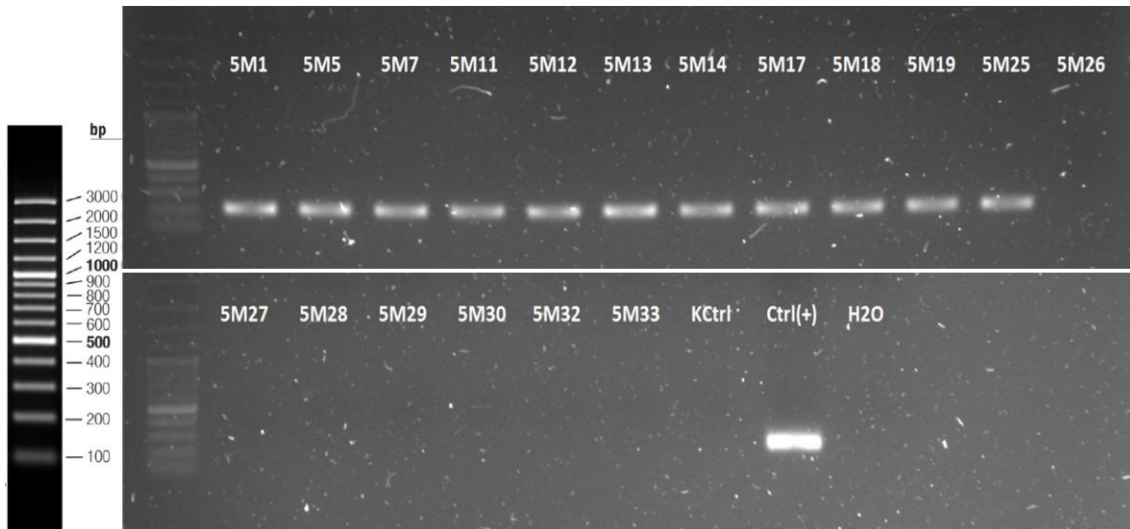


**Figura 3-16:** Detección del gen de actina sobre posibles transformantes primarios con el casete E-IGP. El nombre de la línea se indica en la parte superior de cada carril. PCtrl: variedad P29 sin transformar, KCtrl: variedad SK7 sin transformar, H2O: control de agua. El marcador de peso molecular corresponde al GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Tamaño del amplificado: 518 pb.

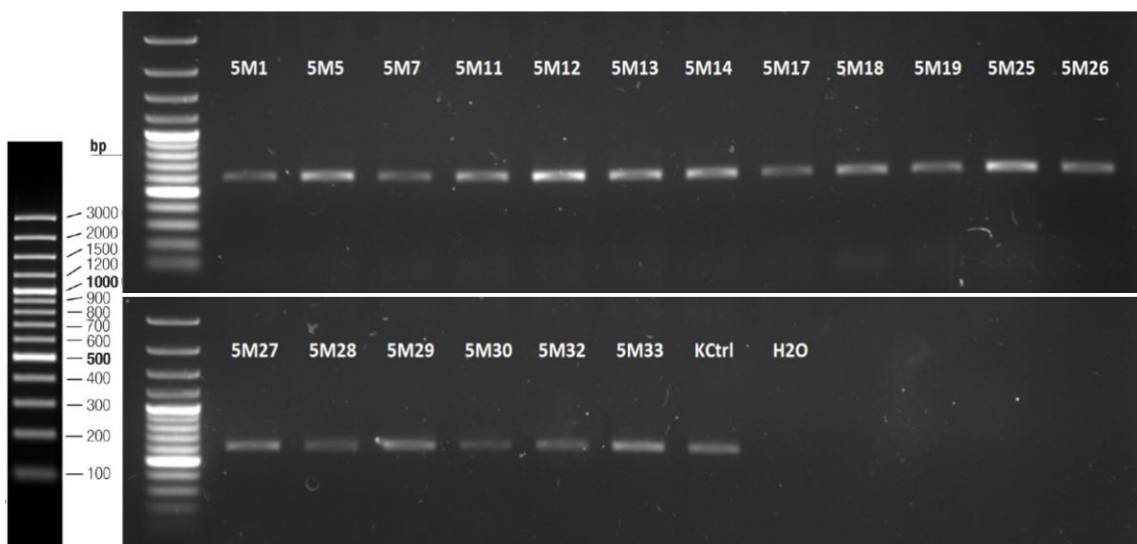




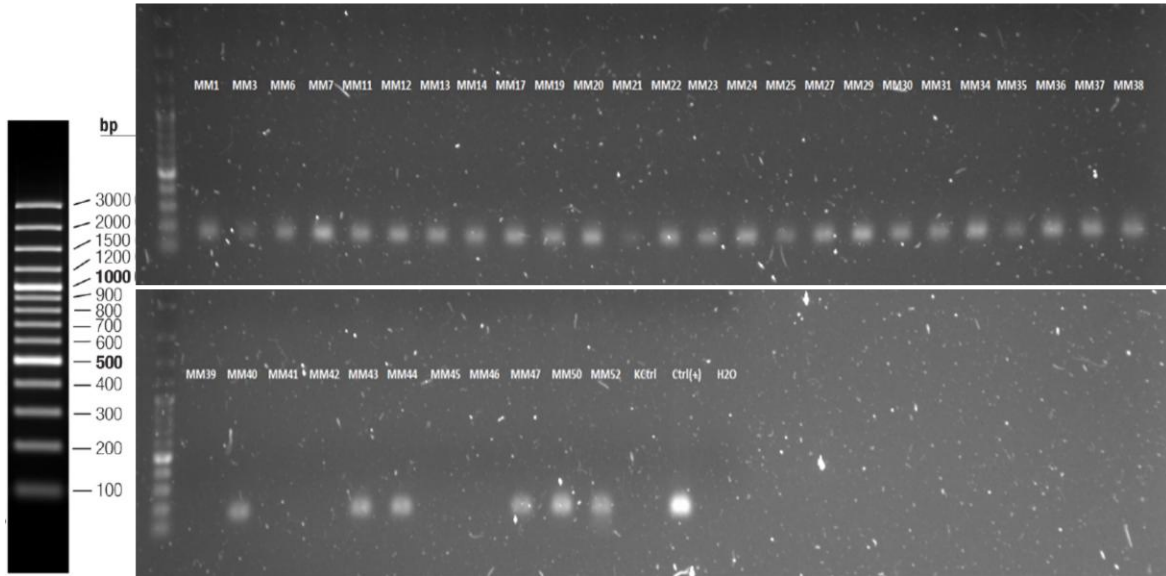
**Figura 3-17:** Detección del casete E-2 sobre posibles transformantes primarios. El nombre de la línea se indica en la parte superior de cada carril. KCtrl: variedad SK7 sin transformar, Ctrl(+): control positivo, vector plasmídico E-2 extraído por miniprep, H2O: control de agua. El marcador de peso molecular corresponde al GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Tamaño del amplificado: 212 pb.



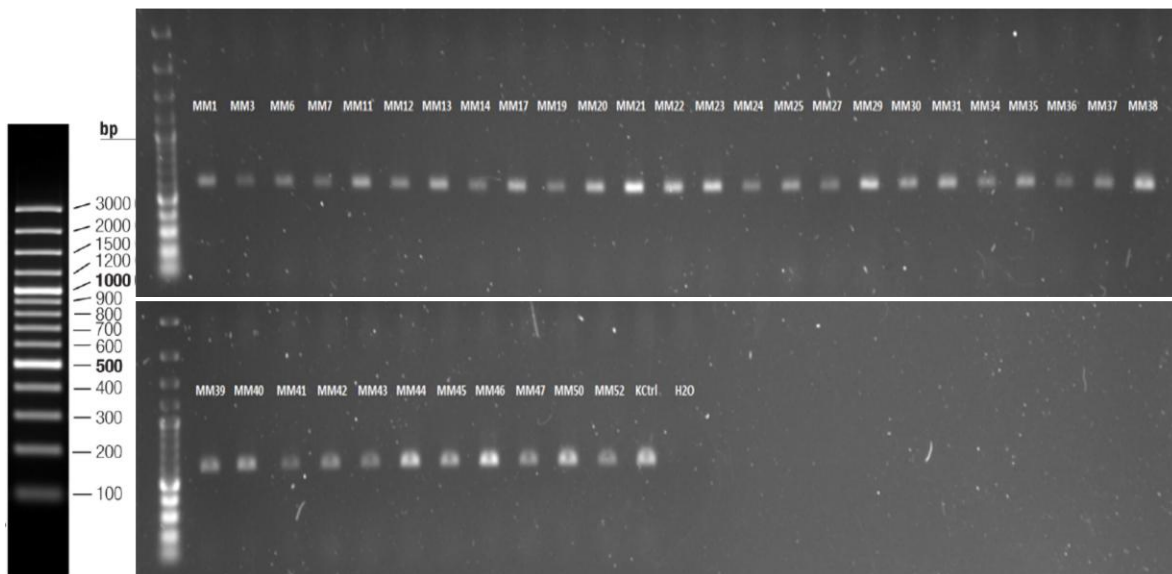
**Figura 3-18:** Detección del gen de actina sobre posibles transformantes primarios con el casete E-2. El nombre de la línea se indica en la parte superior de cada carril. KCtrl: variedad SK7 sin transformar, H2O: control de agua. El marcador de peso molecular corresponde al GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Tamaño del amplificado: 518 pb.



**Figura 3-19:** Detección del casete pMON546 sobre posibles transformantes primarios. El nombre de la línea se indica en la parte superior de cada carril. KCtrl: variedad SK7 sin transformar, Ctrl(+): control positivo, vector plasmídico E-2 extraído por miniprep, H2O: control de agua. El marcador de peso molecular corresponde al GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Tamaño del amplificado: 166 pb.



**Figura 3-20:** Detección del gen de actina sobre posibles transformantes primarios con el casete pMON546. El nombre de la línea se indica en la parte superior de cada carril. KCtrl: variedad SK7 sin transformar, H2O: control de agua. El marcador de peso molecular corresponde al GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Tamaño del amplificado: 518 pb.

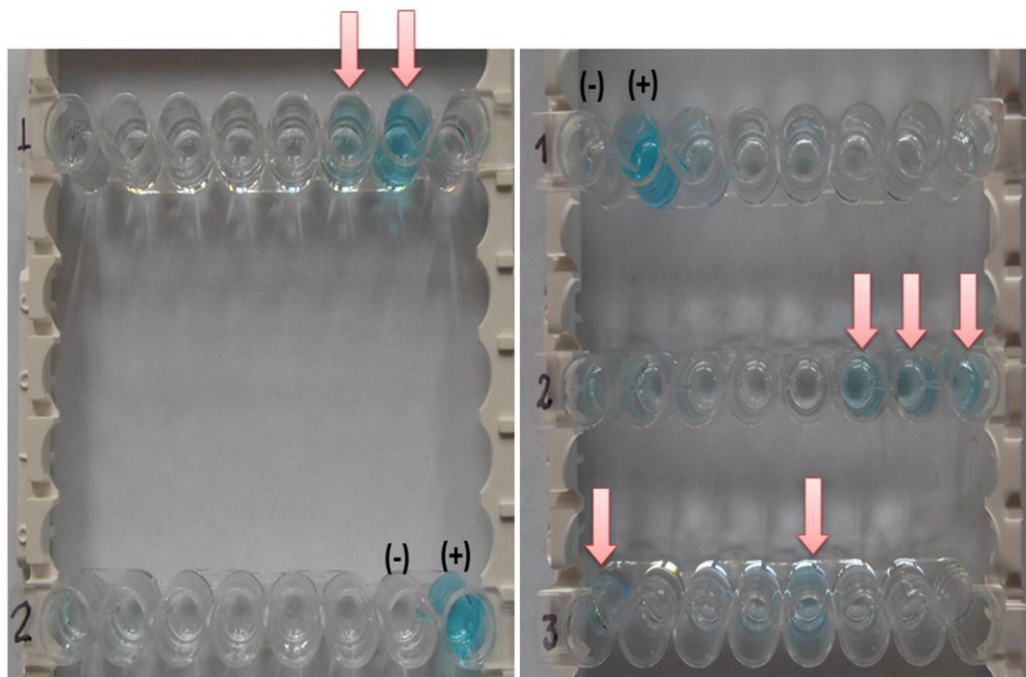


Se obtuvieron 35 líneas PCR positivas con el casete E-IGP, 11 líneas PCR positivas con el casete E-2 y 31 líneas positivas con el casete pMON546 (Tabla 3-8).

### 3.7.2. Expresión del transgén

Se hizo detección de la proteína CP4 EPSPS sobre las líneas transformadas con los casetes E-IGP y E-2 utilizando una prueba de Elisa comercial (Agdia). Se aplicó la prueba a 33 líneas transformadas con el casete E-IGP y 10 líneas transformadas con el casete E-2, las cuales sobrevivieron la propagación *in vitro* y produjeron biomasa suficiente para emplear en la prueba sin perder la línea. La presencia de la proteína en la muestra vegetal producía un viraje en la reacción de transparente a azul (Figura 3-21), posteriormente fue determinado por espectrofotometría, registrando los valores de absorbancia a 655nm (Tabla 3-7).

**Figura 3-21:** Resultado de la prueba de Elisa sobre posibles transformantes primarios. Las flechas indican el viraje de la reacción de transparente a azul cuando la proteína CP4 EPSPS se está expresando en los tejidos de la planta. La reacción incluyó controles positivo (+) (proveído dentro del kit) y negativo (-) (buffer de extracción sin material vegetal).



**Tabla 3-7:** Lecturas de absorbancia para prueba de Elisa CP4 EPSPS sobre las líneas generadas. En verde se resaltan los resultados que superaron un valor de 0,1 de absorbancia, considerados positivos.

Línea	Absorbancia	Línea	Absorbancia	Línea	Absorbancia
Ctrl (+)	0,77	KJ30	0,072	PJ19	0,084
Ctrl (-)	0,042	KJ43	0,149	PJ32	0,182
PCtrl	0,055	KJ46	0,103	PJ35	0,06
KCtrl	0,048	KJ47	0,108	PJ37	0,068
		KJ52	0,079		
KJ1	0,077			SJ1	0,077
KJ4	0,156	PJ2	0,054		
KJ5	0,084	PJ3	0,066	5M5	0,139
KJ6	0,057	PJ4	0,076	5M7	0,076
KJ7	0,164	PJ5	0,092	5M12	0,065
KJ8	0,171	PJ7	0,069	5M17	0,092
KJ15	0,177	PJ8	0,147	5M18	0,084
KJ18	0,148	PJ9	0,196	5M26	0,057
KJ20	0,079	PJ10	0,136	5M27	0,068
KJ21	0,068	PJ11	0,059	5M28	0,053
KJ22	0,097	PJ15	0,085	5M29	0,067
KJ24	0,092	PJ17	0,066	5M30	0,062

Ctrl (+): control positivo de proteína EPSPS purificada

Ctrl (-): control negativo de buffer de extracción de proteínas

PCtrl: Planta variedad P29 sin transformar

KCtrl: Planta variedad SK7 sin transformar

Se obtuvieron valores positivos para 12 líneas transformadas con el casete E-IGP y una línea transformada con el casete E-2 (Tabla 3-8).

**Tabla 3-8:** Resultados de pruebas de presencia/ausencia de transgén y detección de la proteína CP4 EPSPS sobre las líneas generadas

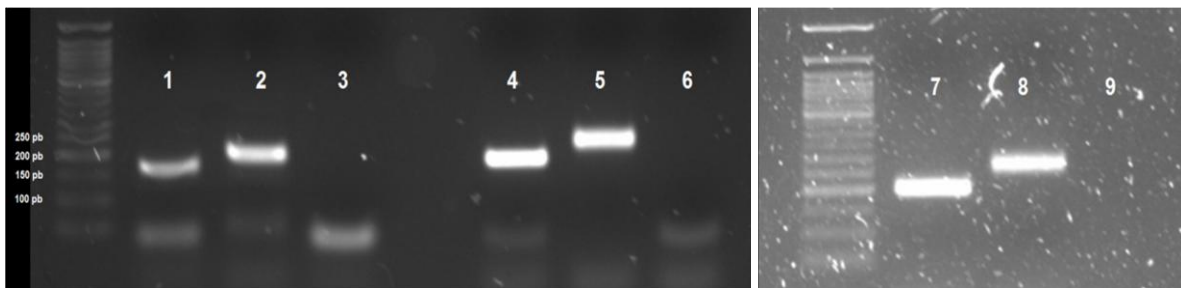
Casete	Varietal vegetal	Cepa bacteria	Transformantes primarios	PCR (+)	ELISA (+)	Frecuencia de transformación (PCR (+))	Transformantes funcionales (ELISA (+))
E-IGP	SK7	AGL0	22	14	5	10,8%	3,8%
		EHA105	31	6	3	4,6%	2,3%
	P29	AGL0	14	7	3	5,4%	2,3%
		EHA105	23	8	1	6,1%	0,8%
	Soyica P34	AGL0	1	0	0	0%	0%
		EHA105	0	0	0	0%	0%
E-2		EHA105	34	11	1	3,6%	0,3%
pMON 546	SK7	ATCC 53213	55	31	-	10,3%	-

Los resultados de las pruebas moleculares permiten identificar que se obtuvo una mayor frecuencia de transformación y una mayor cantidad de transformantes funcionales con la combinación entre el casete E-IGP, variedad vegetal SK7 y cepa bacteriana AGL0. En la variedad P29 fue ligeramente superior la frecuencia de transformación con la cepa EHA105, pero se obtuvo un mayor porcentaje de transformantes funcionales con la cepa AGL0.

### 3.7.3. Número de copias del transgén que se insertaron en el genoma de la planta

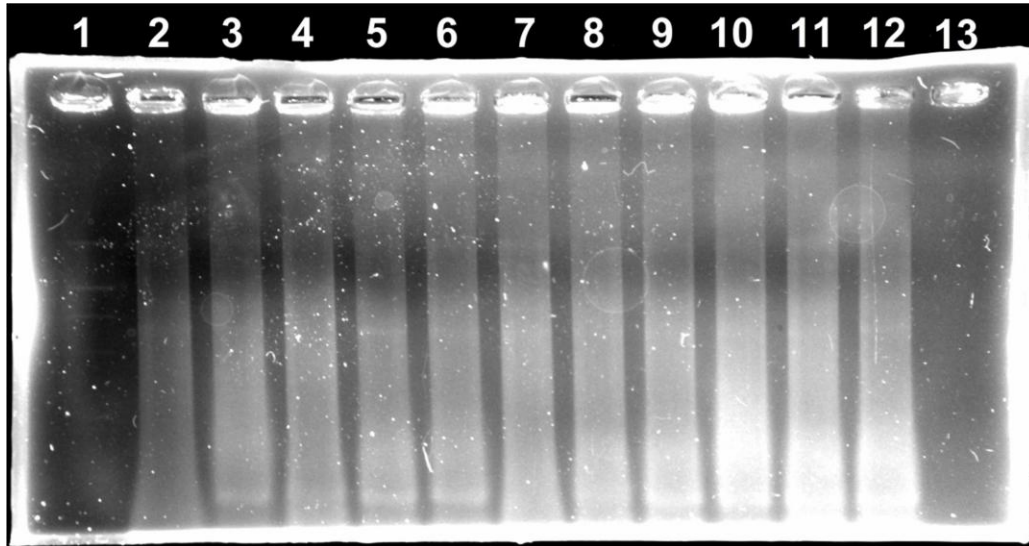
Mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% se verificó que las sondas para la detección de los casetes E-IGP, E-2 y pMON546 hubieran sido marcadas efectivamente con DIG, observando una banda de tamaño superior en las reacciones de síntesis con DIG, con respecto al tamaño de banda obtenido cuando no se incluyó DIG en la reacción (Figura 3-22)

**Figura 3-22:** Verificación del marcado de sondas con DIG. 1 a 3: reacciones para sonda pMON546; 4 a 6: reacciones para sonda E-IGP; 7 a 9: reacciones para sonda E-2. 1, 4 y 7: amplificaciones sin marcaje DIG; 2, 5 y 8: amplificaciones con marcaje DIG; 3, 6 y 9: controles de agua. El marcador de peso utilizado corresponde al 50 bp DNA Ladder (New England Biolabs)



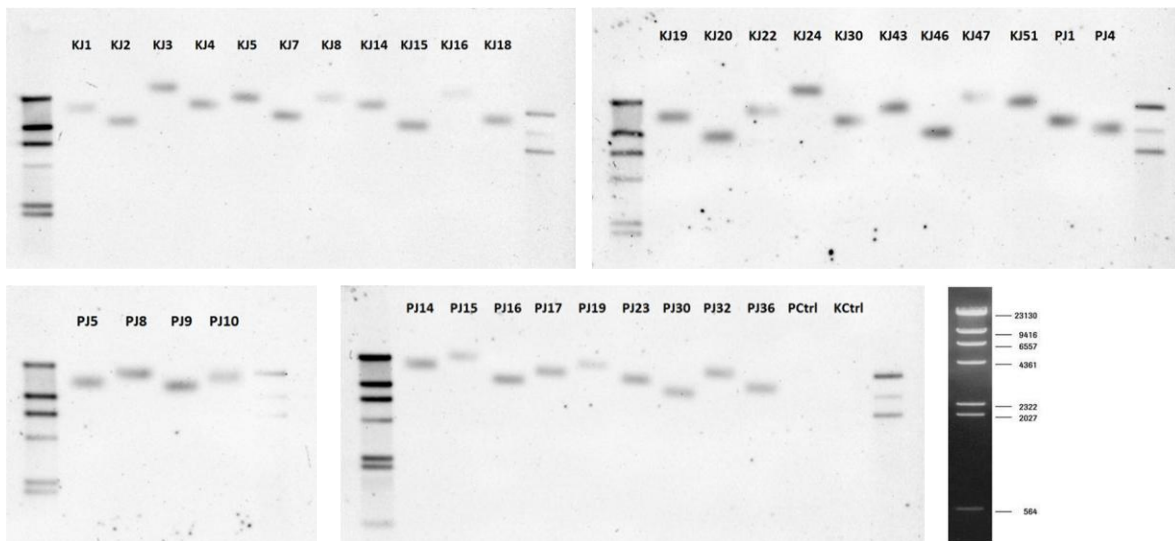
Se llevaron a cabo las digestiones del DNA vegetal y se corrieron en un gel de agarosa al 0,7%, con un esquema de corrida que en todos los casos incluyó un marcador de peso molecular en el extremo izquierdo marcado con DIG (DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled (Roche)), y un control positivo en el extremo derecho, consistente en el vector plasmídico conteniendo el casete de interés en cada caso (Figura 3-23).

**Figura 3-23:** Montaje general de ADN digerido para pruebas de Southern Blot. Carril 1: marcador de peso molecular DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled (Roche); Carriles 2 al 12: ADN vegetal digerido con las enzimas NdeI y PvuII; Carril 13: Control positivo de ADN plasmídico.



La prueba de Southern blot desarrollada sobre las líneas PCR positivo, evidenció que todas las líneas analizadas de los casetes E-IGP, E-2 y pMON546, tienen una única copia del transgén (Figuras 3-24 a 3-26).

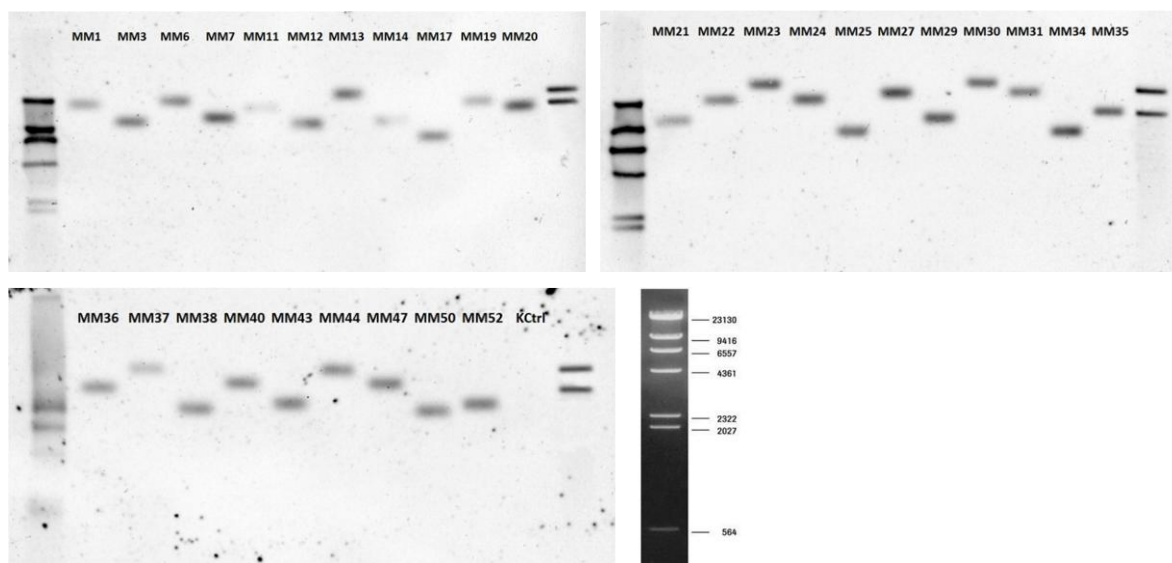
**Figura 3-24:** Southern blot para la detección de número de insertos del casete E-IGP. El nombre de la línea se indica en la parte superior de cada carril. PCtrl: variedad P29 sin transformar, KCtrl: variedad SK7 sin transformar. Cada membrana tiene en su extremo izquierdo un marcador de peso molecular correspondiente al DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled (Roche), y en su extremo derecho un control positivo, correspondiente al vector E-IGP.



**Figura 3-25:** Southern blot para la detección de número de insertos del casete E-2. El nombre de la línea se indica en la parte superior de cada carril. KCtrl: variedad SK7 sin transformar. Cada membrana tiene en su extremo izquierdo un marcador de peso molecular correspondiente al DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled (Roche), y en su extremo derecho un control positivo, correspondiente al vector E-2.



**Figura 3-26:** Southern blot para la detección de número de insertos del casete pMON546. El nombre de la línea se indica en la parte superior de cada carril. KCtrl: variedad SK7 sin transformar. Cada membrana tiene en su extremo izquierdo un marcador de peso molecular correspondiente al DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled (Roche), y en su extremo derecho un control positivo, correspondiente al vector pMON546.

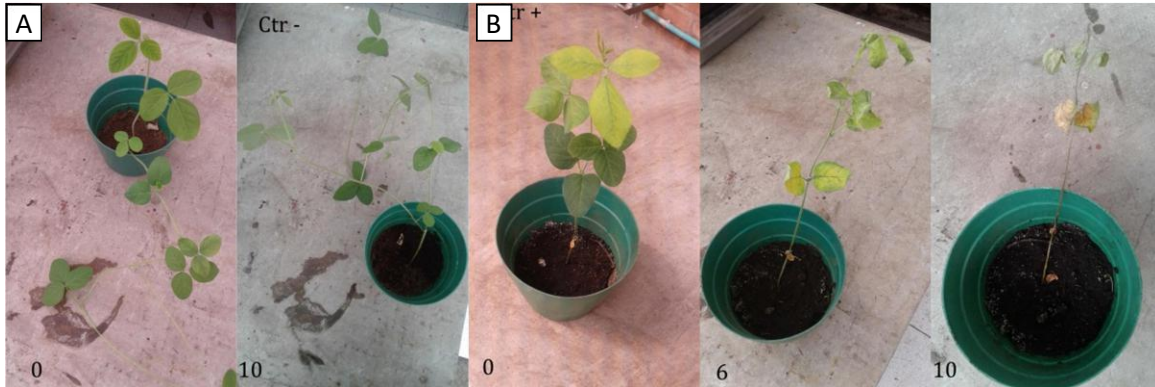


### 3.7.4. Endurecimiento y prueba de invernadero

En términos generales, la eficiencia del endurecimiento de las líneas producidas en el presente trabajo fue baja (alrededor de 10%), lo que conllevó a que solo una pequeña cantidad de líneas fueran exitosamente endurecidas. Las líneas cuyo endurecimiento transcurrió exitosamente fueron sometidas a aplicación de glifosato comercial, evidenciando que en los controles positivo y negativo se produjo el efecto esperado de necrosis total en el control positivo al cabo de 10 días de aplicación y ningún efecto nocivo en el control del diluyente del herbicida (Figura 3-27).



**Figura 3-27:** Controles de prueba fenotípica en invernadero. Plantas no transformadas de soya con aplicación del diluyente del herbicida (A) y de glifosato comercial al 0,5% (B). Los números en la parte inferior indican el día de tratamiento en el que fue tomada la fotografía.



Fotografías cortesía de Julián Mora

Respecto a las plantas transformadas con los tres casetes empleados en el presente trabajo, se observó que solamente fue posible endurecer plantas transformadas con el casete E-IGP, en su mayoría correspondientes a la variedad SK7. Al aplicar glifosato comercial sobre las plantas endurecidas, se encontró que las líneas KJ7, KJ8, KJ15, KJ18 y PJ32 toleraron efectivamente el herbicida, al no presentar muerte de la planta al cabo de 10 días (Figura 3-28), mientras que las líneas KJ24, KJ47 y SJ1 no toleraron el herbicida y murieron (Figura 3-28).

**Figura 3-28:** Plantas transformadas con el vector E-IGP sometidas a prueba fenotípica de invernadero. El nombre de cada línea se encuentra en la parte superior izquierda de cada fotografía. Los números en la parte inferior indican el día de tratamiento en el que fue tomada la fotografía.



Fotografías cortesía de Julián Mora

## 4. Capítulo 4: Discusión

### 4.1. Estudio de libertad de operación

A pesar de las controversias que despiertan, los cultivos transgénicos han demostrado ser una herramienta tecnológica benéfica para los agricultores que los adoptan, por las ventajas que generan, como el aumento en el rendimiento del cultivo, la disminución en el uso y en el costo de pesticidas, y el incremento de las ganancias para el agricultor, entre otros efectos, principalmente en países en vías de desarrollo (Klümper y Qaim, 2014). La primera planta transgénica comercial se lanzó al mercado en 1994 (Bruening y Lyons, 2000), y en los años posteriores se desarrollaron diversas características transgénicas de interés comercial, sobre los cuales se empleó la herramienta de protección a la propiedad intelectual conocida como patente. Considerando que a nivel mundial las patentes protegen la invención hasta 20 años, desde el año 2014 comenzaron a expirar las primeras patentes sobre las tecnologías básicas aplicadas a los cultivos transgénicos comerciales, reduciendo la posición monopólica de las compañías biotecnológicas líderes, al poder ser usada esas tecnologías en productos comerciales por parte de otras empresas o entidades públicas que quieran incursionar en el mercado (Grushkin, 2012). Este es el caso de la característica denominada Roundup Ready®, desarrollada por la compañía Monsanto, que confiere tolerancia al herbicida glifosato, de la cual la última patente asociada a esta tecnología venció en el año 2015 en el territorio estadounidense (Jefferson *et al.*, 2015).

Respecto de los elementos constitutivos del casete de expresión (regiones regulatorias, regiones codificantes, péptidos de tránsito) cuando se actualiza a julio de 2017 la información obtenida por Jiménez en 2014, se mantiene la conclusión de ese trabajo, en cuanto a que no se registran solicitudes de patentes, ni patentes en Colombia, lo cual sugiere que tendrían libertad de operación en el territorio nacional. Por otro lado, algunas de las patentes concedidas sobre estos elementos en otras jurisdicciones nacionales, ya expiraron, como es el notorio caso del gen *cp4 epsps*. Ello sugiere que la libertad de

operación podría incluir otros territorios, cuestión que deberá analizarse caso a caso. Similar situación se encontró en relación con los protocolos de transformación y de cultivo de tejidos vegetales que pueden afectar la innovación. Esto es, o bien no se han concedido ni solicitado patentes en el territorio nacional, o bien las que se han concedido en otras jurisdicciones han expirado. El principal problema encontrado, que confirma los hallazgos de Jiménez (2014), es el de la patente concedida a Monsanto en Colombia, mediante resolución 71.489 del 26 de noviembre de 2012 y titulada “Evento MON89788 de soja y métodos para la detección del mismo” que protege el uso de un inserto constituido por pFNV/Tsf1 – CTP2 – cp4EPSPS – tRbcS/E9. El análisis de las reivindicaciones otorgadas confirma que, puesto que en los casetes de expresión usados en el presente trabajo se usan regiones promotoras y péptidos de transito diferentes, los usos de estos casetes pueden no estar cubiertos por la patente concedida. Exámenes posteriores y actualizados para definir la comercialización de la innovación, confirmarán o no, estas conclusiones.

Como parte del presente trabajo, también se hizo una revisión exhaustiva del estado de las patentes a nivel mundial asociadas con la generación de eventos tolerantes a glifosato, principalmente en el cultivo de soja. Se evidenció que efectivamente la mayor parte de esas patentes se encuentran expiradas recientemente, o están próximas a expirar, suceso que, como se ha descrito en otros reportes (Grushkin, 2012; Jefferson *et al.*, 2015), deja abierta la posibilidad de desarrollar cultivos transgénicos genéricos con esta característica en particular, y en nuestro caso, en el territorio de Colombia.

En el trabajo se usaron variedades locales de soja, genotipos adaptados a las características tropicales colombianas, a través de años de programas de fitomejoramiento convencional. Estas variedades pueden estar protegidas por derechos de obtentor, en cuyo caso deben considerarse los derechos de las empresas desarrolladoras. Se encontró que el derecho de obtentor de la variedad Soyica P34 ya había expirado, que la variedad P29 no tiene protección por esta vía, y que la variedad SK7 tiene uno vigente. Estos resultados sugieren que, en el caso del desarrollo comercial de líneas transgénicas provenientes de las variedades Soyica P34 y P29 no habría problemas en este escenario, en tanto que en el caso de la variedad SK7 debe considerarse la negociación con la empresa desarrolladora. Una de las preguntas que quedan abiertas es si es posible conseguir derechos de obtentor para estas líneas

transgénicas derivadas de variedades comerciales, protegidas o no. Si cumplen con los criterios DHE (distinción, homogeneidad, estabilidad) y de novedad comercial, establecidos en los acuerdos de la Unión de Países Protectores de Obtenciones Vegetales (UPOV), a los que Colombia está adscrita, podría solicitarse esa forma de protección. En todo caso, sería como variedades esencialmente derivadas, asunto que no tendría efectos prácticos, cuando se usan variedades no protegidas como material de partida.

Un asunto que debe tenerse en cuenta en relación con los estudios de libertad de operación es el de la regulación nacional de bioseguridad, que afecta la liberación comercial. En el caso de Colombia se trata del decreto 4.525 del 2005 que reglamenta la ley 740 de 2002, que es el Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología. Allí se establece que para la variedad transgénica en particular, se debe demostrar eficacia biológica, eficacia agronómica, efecto sobre poblaciones no blanco, flujo de genes e inocuidad sobre los consumidores (Chaparro-Giraldo, 2013; Castaño, 2013). Cuando se trata de tecnologías maduras, con una larga historia de uso seguro y en distintas jurisdicciones nacionales, existe una gran cantidad de documentos que pueden servir como soporte para el proceso de liberación comercial. Esos documentos, son tanto artículos científicos, como pronunciamientos oficiales de autoridades regulatorias nacionales. Tal es el caso de la tolerancia al herbicida glifosato basada en el gen *cp4 epsps*, cuyo evento GTS 40-3-2 de Monsanto ha sido liberado en 27 países desde 1994 (ILSI Research Foundation, 2017). Para la construcción de la estrategia de desarrollo de agrobiogénicos, es un modelo que puede permitir disminuir los tiempos procesales y los costos del paquete regulatorio. Según McDougall (2011) basado en los datos de las corporaciones multinacionales desarrolladoras de cultivos transgénicos (BASF, Bayer, Dow, Dupont, Monsanto, Syngenta), se gastan 13 años y 136 millones de dólares: 23 % (31 millones) descubrimiento del gen, 51 % (69,9 millones) desarrollo del producto, 26 % (35,1 millones) regulación y registro. Sin embargo, Schiek *et al.* (2016) para una variedad de papa tolerante a gota construida por instituciones públicas en países subdesarrollados, reportaron gastos por 1,6 millones de dólares y 8 años de tiempo.

Resultados previos en análisis de libertad de operación para liberación comercial de líneas transgénicas realizados en Colombia (Jiménez-Barreto *et al.*, 2016; Jiménez y Chaparro-Giraldo, 2016; Diazgranados *et al.*, 2016; Hincapié y Chaparro-Giraldo, 2014)

han mostrado algunos problemas en los procesos de investigación, que llevan a poner en riesgo la potencial liberación comercial del producto. Estos resultados se han tenido durante el desarrollo del presente trabajo. Para disminuir la carga de acuerdos de transferencia de materiales, típica de estos procesos, se implementó la estrategia de diseñar *in silico* los casetes de expresión y contratar la síntesis *de novo* con empresas privadas. De esta manera también se evita las limitaciones de uso, solo para investigación, que hacen parte del intercambio de materiales entre laboratorios académicos. Para evitar este mismo efecto, se solicitó a la empresa china contratada para la síntesis del casete, que se eliminará la cláusula “only for research” del contrato de prestación de servicio. El diseño de los experimentos de transformación se hizo a partir de información pública contenida en artículos científicos, de protocolos que no fueron protegidos previamente por patentes.

Se tuvieron en cuenta las estrategias propuestas por Chi-Ham y Carreño (2013) quienes recomiendan para aumentar la libertad de operación en cultivos transgénicos, favorecer el uso de tecnologías de dominio público y limitar la propiedad tangible, entre otras. Con ese propósito se buscó siempre que tanto los elementos biológicos, como los protocolos usados, fueran libres de patentes, que el periodo de protección haya terminado, o que no se hayan concedido o solicitado patentes en el territorio nacional. También se limitó al máximo el uso de vectores (transformación, clonación, expresión), y cuando hubo que utilizarlos, se seleccionó un vector pCAMBIA que está en el dominio público.

Se siguió la línea de trabajo propuesta por el grupo de Ingeniería Genética de Plantas de la Universidad Nacional de Colombia, de desarrollar estudios de libertad de operación propios, posteriormente confirmada por Zanga *et al.* (2016). Esta es una herramienta que debe ser desarrollada por los mismos grupos de investigación en biotecnología, independientemente de si cuentan con apoyo legal, incluso como criterio para definir la viabilidad de los proyectos de investigación (Hincapié y Chaparro-Giraldo, 2013). Desde luego para ser válidos estos estudios deben ser actualizados y confirmados antes de la comercialización del producto final, por profesionales del derecho especialistas en el área. Debe realizarse un estudio exhaustivo que considere tanto la existencia de patentes sumergidas, como el impacto de decisiones del Consejo de Estado que aún no han sido tomadas, sobre demandas de corporaciones multinacionales, en particular Monsanto, sobre decisiones de la SIC en relación con negaciones de patentes sobre tecnologías

básicas aplicadas a la transgénesis en cultivos agrícolas. La decisión de liberación comercial en el escenario de los agrobiogénicos, debe ser tomada con exceso de cautela, para evitar infringir derechos de terceros, y poner en riesgo a empresas y/o instituciones públicas que los desarrollen.

## 4.2. Explantes, técnica de desinfección y regeneración

La eficiencia de transformación en soya mediante *A. tumefaciens*, en términos generales, es baja, presentando dificultades en la eficiencia de transferencia del T-DNA. En el sistema de regeneración para obtener plantas transformadas, es necesario usar cepas hipervirulentas de *Agrobacterium*, entre otras consideraciones propias de la especie (Atif *et al.*, 2013). En el presente estudio se emplearon tres variedades de soya adaptadas al cultivo en territorio colombiano, y considerando que es el primer trabajo que se hace en el país de transformación genética de soya, era absolutamente necesario establecer la plataforma de transformación en el grupo de investigación, evaluando diversos factores que pudieran afectar el proceso y la predisposición de variedades locales a ser transformadas genéticamente.

Se ha reportado transformación de diferentes tejidos de soya, incluyendo semilla madura (Meurer *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Paz *et al.*, 2004; Paz *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017), cotiledones inmaduros (Ko *et al.*, 2003; Ko y Korban, 2004; Mariashibu *et al.*, 2013), raíces (Kuma *et al.*, 2015), ovarios (Liu *et al.*, 2009) y vainas (Zia *et al.*, 2011). Utilizando semilla madura se ha descrito transformación sobre nudo cotiledonar (Zhang *et al.*, 1999; Paz *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2013; Arun *et al.*, 2015), yema embrionaria (Liu *et al.*, 2004), media semilla (Paz *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2006; Arun *et al.*, 2016), segmentos de hipocótilo (Liu *et al.*, 2004), entre otros. Se escogió nudo cotiledonar porque se ha reportado como un explante con excelente capacidad de regeneración, lo que ha llevado a ser el explante más común y exitoso para desarrollar transgénesis en plantas de soya.

En reportes previos de transformación genética de soya mediada por *A. tumefaciens*, se han descrito metodologías de desinfección utilizando gas cloro (Meurer *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2004; Paz *et al.*, 2004; Paz *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017) y por lavados con desinfectantes líquidos (Xue *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 2013;

Soto *et al.* 2016). Se ha descrito que la desinfección con gas cloro reduce la germinación de semillas de soya tratadas respecto a semillas sin ningún tratamiento, y que al aumentar el tiempo de exposición de las semillas al gas se ve mayor afectación sobre la fisiología de la planta (Paz *et al.*, 2004). Según los ensayos de desinfección desarrollados en el presente trabajo, comparando las metodologías de desinfección con gas o con sustancias líquidas, se encontró que la metodología de gas cloro resultó más eficiente, eliminando efectivamente los contaminantes de la semilla sin afectar dramáticamente la capacidad de regeneración, con efectos contrarios en las semillas desinfectadas por lavados, las que se vieron muy afectada su capacidad germinativa y, en algunos casos, presentaron contaminación. Esto explica la mayor cantidad de reportes de desinfección con gas cloro, respecto a la desinfección con sustancias líquidas.

Es importante que la fuente de la semilla tenga estandarizados sus procesos productivos, ya que esto asegura que entre cosecha y cosecha las características de las semillas no presentarán variaciones significativas que alteren las pruebas. Si el material trae demasiada contaminación del campo se hace más dispendioso el proceso de desinfección y adecuación a un sistema *in vitro*. Las semillas de este trabajo provinieron de empresas productoras de semillas de gran experiencia, quienes proveyeron semillas homogéneas de alta calidad, lo que contribuyó con el éxito del estudio.

La eficiencia de transformación en soya es altamente genotipo-dependiente (Atif *et al.*, 2013), lo que puede estar ligado a su capacidad de regeneración, entre otros factores. Paz *et al.* (2004) reportaron que la variedad Williams presentaba una mayor tasa de regeneración dentro de un set de 10 diferentes variedades de soya, con 100% de regeneración. Dentro de este set la que más baja tasa de regeneración tuvo fue la variedad Harosoy, con 68%. En este estudio se encontró similar respuesta con los genotipos vegetales seleccionados, que tuvieron diferente desempeño en cada una de las pruebas desarrolladas. En la prueba de evaluación de la capacidad de regeneración se observó que la variedad P29 tuvo el mayor porcentaje de regeneración (96,2%), mientras que SK7 tuvo el porcentaje más bajo (75,4%). Sin embargo, SK7 compensa su bajo porcentaje de regeneración con un alto índice de producción de brotes por explante, con 17,7 brotes en promedio, siendo este el valor más alto entre los genotipos evaluados. En general, la regeneración de las tres variedades vegetales fue buena con el sistema ensayado, considerando que los valores de porcentaje de explantes con brote y número



de brotes por explante resultan adecuados para tomar como base en un proceso de transformación genética.

Las diferencias en regeneración observadas entre los genotipos vegetales pueden tener relación con el balance de factores reguladores de crecimiento presentes en el medio de regeneración y su interacción con los tejidos y factores endógenos de cada variedad. Se ha demostrado que, en tejidos de soya, el balance de fitohormonas es esencial para la adecuada regeneración de los explantes, y por tanto para la eficiencia de la transformación (Paz *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017). Al evaluarse concentraciones de BAP en el proceso de regeneración, en un rango entre 0 a 22,5 mg/L con la variedad Thorne, se encontró que, para esta variedad la concentración óptima fue de 1,12 mg/L de la hormona, siendo esta la concentración en la que se logró el más alto porcentaje de regeneración en esta variedad (80%) (Paz *et al.*, 2006). En las variedades Tianlong 1 y Jack Purple, en la fase de elongación, la concentración de GA e IAA influyen drásticamente en la elongación de explantes, siendo las concentraciones de 1 mg/L para GA y 0,1 mg/L para IAA, las que producen una mayor tasa de elongación de brotes en estas variedades (Li *et al.*, 2017). Por otra parte, en la variedad Heinong 35 el balance óptimo de fitohormonas en fase de elongación se logra con la adición de 0,5 mg/L de GA sin IAA (Li *et al.*, 2008), y en la variedad Jiyu47 se obtiene una mayor elongación adicionando 1 mg/L de GA y 0,5 mg/L de IAA en el medio de elongación (Sun, 2013). En este estudio se empleó una concentración de 1,67 mg/L de BAP en la fase de regeneración para todas las variedades, obteniendo buenos resultados para transformación genética.

### **4.3. Selección *in vitro* con glifosato**

Es importante incluir un agente selector en el medio de regeneración para evitar la generación de quimerismos, o escapes del sistema de transformación. La mayoría de ensayos de transformación de soya hacen selección *in vitro* y a nivel de invernadero empleando glufosinato de amonio (Zhang *et al.*, 1999; Paz *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2004; Paz *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). Se ha reportado también el uso de kanamicina (Liu *et al.*, 2004) o higromicina (Olhoft *et al.*, 2003; Arun *et al.*, 2015; Kuma *et al.*, 2015) como agentes seleccionadores. Los ensayos que emplean glifosato como agente de selección *in vitro*

son más escasos y relativamente recientes, además de considerar que no todos usan el mismo tipo de explante ni condiciones similares de transformación y regeneración (US 8592212 B2, US20140173780A1, Soto *et al.*, 2016). Esta situación hizo necesario diseñar un esquema propio en este trabajo.

Es crucial identificar la concentración mínima del agente de selección que elimine todas (o la mayor cantidad posible de) las células no transformadas y permita únicamente la supervivencia de las células transformadas, de tal forma que regeneren en una planta completa transformada (Anami *et al.*, 2013). Por esta razón inicialmente se planteó un esquema de selección de corto plazo, que se asemeja al esquema utilizado con glufosinato de amonio.

Según Soto *et al.* (2016), la sensibilidad al glifosato *in vitro* es evidente con concentraciones de herbicida entre 15 mg/L a 25 mg/L en la variedad Incasoy-36, en un sistema de transformación genética por biobalística. En el presente estudio resultó interesante observar que en el sistema evaluado de transformación por *Agrobacterium*, con nudos cotiledonares como explante, la sensibilidad al glifosato después de la cuarta semana de regeneración solo es evidente por encima de 100 mg/L del herbicida, más del doble reportado en otros ensayos, pero con el problema de generar en el explante deterioro fisiológico irreversible evidente hasta la octava semana post-inoculación. Este resultado se asocia al modelo sistémico de acción del herbicida, que afecta una vía metabólica esencial en la fisiología de la planta, como lo es la síntesis de aminoácidos aromáticos (ruta del shikimato).

En reportes anteriores se ha evidenciado que en condiciones de invernadero, plantas de algodón modificadas genéticamente conteniendo el gen *cp4 epsps* ven severamente afectado su desarrollo fisiológico cuando se aplica glifosato sobre ellas, dependiendo del sitio de la planta donde se hace la aplicación, fase del crecimiento vegetativo o reproductivo y técnica de aplicación del herbicida, indicando seguir estrictamente las pautas de aplicación de herbicida sugeridas por los desarrolladores de la tecnología transgénica para prevenir pérdidas en este cultivo por acumulación exacerbada del herbicida en los tejidos de la planta (Pline *et al.*, 2001). En el caso del presente trabajo, la alteración fisiológica irreversible presentada en la selección de corto plazo está asociada a la prematura fase de crecimiento en la que se encuentra el explante en las primeras

semanas de regeneración y a la alta concentración de herbicida utilizada, que posiblemente genera acumulación de glifosato en los tejidos de la planta, con efectos apreciables semanas después del retiro del agente seleccionador. Esto sugiere que cuando se emplea glifosato como agente de selección en el sistema de transformación descrito en el presente trabajo, necesariamente la selección debe ser de largo plazo con concentraciones más bajas de glifosato, que no lesionen irreversiblemente al explante como se observó con concentraciones altas.

Respecto a las estrategias planteadas de selección de largo plazo, las cuales diferían en la concentración y tiempo de uso del glifosato en el periodo de regeneración, la estrategia 1 en la cual se permitía un período de regeneración de dos semanas sin glifosato, seguido de un periodo de dos semanas con glifosato resultó ser más eficiente que la estrategia 2, en la cual el glifosato estaba presente desde el inicio de la regeneración. En la estrategia 1 se observó que se regeneraban brotes que elongaban en diversas longitudes, siendo seleccionados para enraizamiento únicamente aquellos que superaban los 3 cm. Esto sugiere que en la selección *in vitro* con glifosato no se emplea el criterio categórico de vivo o muerto, cuando se selecciona a los posibles transformantes primarios, si no que la selección se hace siguiendo un criterio fenotípico de altura del brote, dado que todos los brotes regenerados permanecen relativamente sanos durante el proceso, pero difieren en su capacidad de elongación.

En la estrategia 2 se observó que solo la variedad SK7 produjo brotes de apariencia relativamente sana en el periodo de regeneración, pero ninguno alcanzó la longitud necesaria para ser individualizado. Por otra parte, en las variedades Soyica P34 y P29 se presentó el efecto de producción de callos en lugar de brotes, lo que sugirió una desviación de la organogénesis asociada al esquema de selección. Se han reportado generaciones de tejido similar a callo en explantes de soya cuando el explante tiene más de 7 días de germinación, cuando el medio de regeneración es demasiado denso debido al exceso de gelificante, o cuando las concentraciones de BAP superan los 3 mg/L en la variedad Incasoy-36 (Soto *et al.*, 2013). También se ha reportado que el glifosato actúa tanto como un agente de selección como una hormona inductora de brotación en explantes de soya sometidos a transformación por *Agrobacterium* (Patentes US7002058 y US8592212). Esto sugiere que el glifosato incluido en el medio de regeneración desde el inicio del proceso puede constituir un exceso de factores inductores de brotación para el

explante recién cocultivado, considerando que el medio de regeneración ya incluía BAP para generar este efecto.

#### 4.4. Hallazgos asociados al genotipo vegetal

En el presente estudio se presentaron diferencias en la frecuencia de transformación entre las variedades vegetales evaluadas ligadas al genotipo vegetal, cepa bacteriana y casete de expresión empleado. En estudios anteriores se han encontrado diferencias en los porcentajes de eficiencia de transformación entre variedades de soya, utilizando como explante semilla madura (Tabla 4-1)

**Tabla 4-1:** Máximas frecuencias de transformación logradas sobre variedades de soya con transformación mediada por *Agrobacterium* sobre explantes de semilla madura

Variedad	Máxima frecuencia de transformación lograda	Referencia
Bert	12,7%	Olhoft <i>et al.</i> , 2003
Hefeng 35	11,7%,	Liu <i>et al.</i> , 2004
Dongnong42	8,0%,	Liu <i>et al.</i> , 2004
Hefeng 39	15,8%	Liu <i>et al.</i> , 2004
Williams79	8,3%	Paz <i>et al.</i> , 2004
Williams	4,0%	Paz <i>et al.</i> , 2004
Williams 82	5,9%	Zeng <i>et al.</i> , 2004
Thorne	8,7%	Paz <i>et al.</i> , 2006
Peking	10,9%	Yukawa <i>et al.</i> , 2008
Fayette	5,3%	Yukawa <i>et al.</i> , 2008
Suzuyutaka	4,8%	Yukawa <i>et al.</i> , 2008
Williams 82	6,7%	Jia <i>et al.</i> , 2015
Shennong 9	5,3%	Jia <i>et al.</i> , 2015
Bert	5,1%	Jia <i>et al.</i> , 2015
YC-2	14,7%	Yang <i>et al.</i> , 2016
Jack Purple	7,3%	Li <i>et al.</i> , 2017
Tianlong 1	10,0%	Li <i>et al.</i> , 2017
SK7	10,8%	El presente estudio
P29	6,1%	El presente estudio

Las máximas frecuencias de transformación logradas en el presente estudio fueron de 10,8% para la variedad SK7 y 6,1% para la variedad P29. Estas frecuencias coinciden con el rango entre 4 a 15,8% reportados en la mayoría de estudios de transformación de soya mediada por *Agrobacterium* (Tabla 4-1). De hecho, un 10,8% (SK7) está por encima del promedio general (8,5%), lo que indica que el sistema y condiciones con las que se obtuvo esta frecuencia resultan prometedoras en la variedad SK7.

Hay una importante asociación entre el genotipo vegetal y la capacidad de *Agrobacterium* para transformar genéticamente una planta. En 2017, Li y colaboradores evaluaron la eficiencia de infección de una cepa de *A. tumefaciens* (EHA101) sobre las variedades de soya Tianlong 1, Jack Purple, DLH, NN419, Williams 82, HZM, NN34, y NN88-1, encontrando un importante efecto del genotipo vegetal sobre la capacidad infectiva de la cepa bacteriana, siendo en este caso las variedades Tianlong 1 y Jack Purple sobre las que la cepa de *A. tumefaciens* pudo desarrollar una mayor capacidad infectiva. Utilizando esta misma cepa (EHA101), entre las variedades Heihe 19, Heihe 25, Heinong 37, Ha 03-3, YC-1, YC-2 y Zhonghuang 39, las que mejor permiten la infección son la YC-1 y YC-2, y la que más rechaza esta infección es la Ha 03-3, evidenciado por la expresión transitoria de un gen reportero (Yang *et al.*, 2016). Con la cepa EHA105, Jia *et al.* (2015) encontraron que dentro de un set de 10 variedades de soya podían presentarse variedades con alta capacidad de ser transformada, como la Williams 82, y variedades con gran resistencia a la transformación, como la Liaodou16. Estudios similares han reportado que las variedades Williams, Cutler y Dawson son más proclives a ser infectadas por la cepa KYRT1 dentro de un set de 25 variedades diferentes de soya (Meurer *et al.*, 1998).

Los resultados del presente estudio muestran una marcada diferencia entre las tres variedades evaluadas a la transformación genéticamente. La variedad más eficiente para ser empleada en transformación resultó ser la SK7, de la que se obtuvieron 53 líneas potencialmente transformadas con el casete E-IGP y se logró una máxima frecuencia de transformación de 10,8% con el casete E-IGP y la cepa AGL0. En segundo lugar, está la variedad P29, de la que se obtuvieron 37 líneas potencialmente transformadas con el casete E-IGP y se logró una máxima frecuencia de transformación de 6,1% con el casete E-IGP y la cepa EHA105. La variedad más recalcitrante a la transformación es Soyica P34, de la que solo fue posible obtener una línea potencialmente transformada, y esta resultó ser un escape.

Las causas por las cuales una variedad vegetal presenta resistencia a la infección por *Agrobacterium* pueden ser muy variadas. En 2015, Jia *et al.* describieron que, durante el primer día de cocultivo, variedades de mayor eficiencia como Williams 82, Shennong 9 y Bert tienen un aumento en la producción de GA y una disminución en la producción de ácido abscísico (ABA), mientras que en variedades de baja eficiencia, como General, Liaodou16 y Kottman, no hay variación significativa en la producción de estas hormonas, lo que indica que en variedades de alta eficiencia la germinación y crecimiento ocurren más rápidamente en las etapas tempranas del cocultivo.

En el mismo estudio (Jia *et al.*, 2015), respecto a las citoquininas (zeatin ribósido), en las variedades de mayor eficiencia se incrementó drásticamente su producción tras la infección con *Agrobacterium*, y se mantuvo relativamente alta durante el cocultivo, mientras que en variedades de baja eficiencia su producción aumentó ligeramente, o se disminuyó, lo que indica que los genotipos de alta eficiencia tienen un mayor potencial de división celular que los genotipos de baja eficiencia. Este potencial de división celular se verificó igualmente haciendo mediciones de la expresión de genes de ciclo celular y la cantidad de ADN en las variedades evaluadas, encontrando la misma tendencia.

Con relación a los factores activados como respuesta defensiva en las plantas, entre los que se incluyen el metil jasmonato y las enzimas polifenol oxidasa y peroxidasa, se reportó que las variedades de baja eficiencia los producen en una cantidad significativamente mayor que las variedades de alta eficiencia durante el periodo de cocultivo, lo que constituiría una barrera importante para la transferencia del T-DNA por parte de *Agrobacterium* (Jia *et al.*, 2015). La oxidación y el oscurecimiento de explantes es uno de los factores reportados como limitante para el cultivo de tejidos de soya, y por tanto para su transformación, debido a que las plantas generan especies reactivas de oxígeno tras la infección con *Agrobacterium* (Li *et al.*, 2017). En el presente estudio, todas las variedades vegetales presentaron un escaso grado de oscurecimiento de explantes, principalmente en la porción que se encontraba en contacto con el medio de cultivo. Este oscurecimiento no era limitante para la producción de brotes óptimos en las variedades P29 y SK7, pero podría constituir uno de los factores que limitaron el desempeño de la variedad Soyica P34.

Soyica P34 evidenció ser una variedad de baja eficiencia para ser usada en procesos de transformación genética mediada por *Agrobacterium*. Esto puede deberse a alta producción de especies reactivas de oxígeno, o a diferencias en la producción de fitohormonas con respecto a las variedades P29 y SK7, de mayor eficiencia, entre otras razones.

## 4.5. Hallazgos asociados a la cepa bacteriana

Se han usado diversas cepas de *A. tumefaciens* para transformar soya (Tabla 4-2).

**Tabla 4-2:** Cepas de *A. tumefaciens* usadas en transformación genética de soya

Cepa	Referencia
EHA101	Zhang <i>et al.</i> , 1999; Paz <i>et al.</i> , 2004; Zeng <i>et al.</i> , 2004; Paz <i>et al.</i> , 2006; Song <i>et al.</i> , 2013; Yang <i>et al.</i> , 2016; Li <i>et al.</i> , 2017
EHA105	Meurer <i>et al.</i> 1998; Zhang <i>et al.</i> , 1999; Olhoft <i>et al.</i> , 2003; Liu <i>et al.</i> , 2004; Arun <i>et al.</i> , 2015; Jia <i>et al.</i> , 2015; Arun <i>et al.</i> , 2016
KYRT1	Meurer <i>et al.</i> 1998
AGL1	Paz <i>et al.</i> , 2004
LBA4404	Olhoft <i>et al.</i> , 2003; Xue <i>et al.</i> , 2006
Soy2	Yukawa <i>et al.</i> , 2008

Entre las diversas cepas de *Agrobacterium* empleadas se han encontrado diferencias importantes respecto a su capacidad de transformar genéticamente variedades de soya. En un estudio comparando la efectividad de transformación de soya entre las cepas KYRT1, EHA105 y LBA4404 se encontró que la cepa KYRT1 presentaba el mayor porcentaje de explantes transformados expresando un gen reportero (26,1%), mientras que la cepa LBA4404 presentó el desempeño más pobre en esta misma prueba (2,8%) (Meurer *et al.*, 1998). Al infectar la variedad PK 416 con las cepas LBA4404, EHA101 y EHA105 se obtuvieron eficiencias de transformación de 1,3%, 3% y 4,6% respectivamente, lo que afirma la alta capacidad infectiva de la cepa EHA105 y la baja capacidad de la LBA4404 sobre esta especie vegetal (Arun *et al.*, 2015). En otro estudio desarrollado sobre las variedades Peking, Fayette y Suzuyutaka, en las cuales se comparaba la capacidad infectiva de las cepas de *Agrobacterium* EHA105 y Soy2, se

encontró que la cepa Soy2 tuvo una capacidad infectiva significativamente mayor que la cepa EHA105 sobre todas las variedades, y que la variedad Peking resultó ser la más proclive a ser infectada, en contraposición a la variedad Suzuyutaka, la cual presentó mayor resistencia a la infección por las dos cepas (Yukawa *et al.*, 2008)

Las cepas más utilizadas para transformación de soya son la EHA101 y EHA105 (Tabla 4-2). EHA101 fue una de las primeras cepas de *A. tumefaciens* modificada para su uso en ingeniería genética de plantas. Es derivada de la cepa hipervirulenta A281, con un background cromosómico C58 (una cepa tipo nopalina). Tiene un vector vir helper de tipo L,L-succinamopina (derivado de pTiBo542) en lugar de su plásmido Ti original, con un gen de resistencia a kanamicina ubicado en la región que originalmente correspondía al T-DNA del plásmido Ti (región que fue eliminada), conservando porciones de los bordes derecho e izquierdo (Hood *et al.*, 1986). La cepa EHA105 es derivada de la EHA101, en la cual, por conjugación plasmídica, se eliminó el marcador de resistencia a kanamicina, conservando las demás características de la cepa (Hood *et al.*, 1993). La cepa AGL0 también es derivada de la EHA101. A esta se le eliminó el gen de aminoglicosido fosfotransferasa (*aph*) y uno de los bordes del vector helper mediante escisión por recombinación del plásmido (Lazo *et al.*, 1991).

En el presente trabajo se obtuvieron posibles transformantes primarios de las variedades SK7 y P29, con las cepas AGL0 y EHA105. En la variedad SK7 se obtuvo una mayor frecuencia de transformación con la cepa AGL0 (10,8%) comparado con la cepa EHA105 (4,6%), aunque la frecuencia de transformantes funcionales es similar entre ambas cepas (3,8% y 2,3% respectivamente), siendo ligeramente mayor con la cepa AGL0. En la variedad P29 se obtuvo una frecuencia de transformación ligeramente mayor con la cepa EHA105 (6,1%) respecto a la cepa AGL0 (5,4%), pero en este caso fue mayor la frecuencia de transformantes funcionales con la cepa AGL0 (2,3%), que con la cepa EHA105 (0,8%). Debido a que ambas cepas provienen del mismo genotipo (EHA101), resulta comprensible la similitud en los resultados obtenidos entre ellas, ya que conservan los factores de virulencia de su cepa original. Se ha reportado que la virulencia de la cepa originaria EHA101 está asociada a región vir del plásmido helper en su mayor parte, aunque el cromosoma C58 tiene dos operones de virulencia, pero el efecto cromosómico depende de la especie vegetal que se está transformando, por ejemplo, es más acentuado en tabaco que en tomate (Hood *et al.*, 1986). La selección de la cepa EHA105



para generar las plantas con casetes contrastantes se hizo siguiendo tanto los resultados obtenidos en los ensayos de transformación previos, como un criterio propiedad intelectual, ya que la cepa AGL0 se adquirió con un contrato de compra-venta que estipula que su uso debe ser exclusivo para investigación, y el interés del grupo de investigación es que las variedades generadas en el estudio alcancen nivel comercial.

## 4.6. Hallazgos asociados al casete de expresión

Este trabajo planteó averiguar si existía evidencia que apoyara la existencia de algún efecto potencial en el proceso de transformación debido al uso de secuencias propias de la soya en el T-DNA y/o genotipos locales. En este contexto, se describen los experimentos para la transformación de soya colombiana para tolerancia al glifosato usando una construcción sintética que contiene un promotor Gmubi (Chiera *et al.*, 2007) y un gen *epsps* ajustado para el uso codónico de soya. En el presente trabajo, la transformación de soya tiene 10,8% de eficiencia en la más efectiva de las combinaciones, lo que es similar a la eficiencia de transformación observada en trabajos previos usando *Agrobacterium* (Tabla 4-1).

Los promotores para genes ubiquitina de plantas se han identificado de diferentes especies como *Arabidopsis* o *Nicotiana tabacum*. Los promotores de genes ubiquitina mostraron un alto nivel de expresión constitutiva en plantas GM (Rooke *et al.*, 2000). El promotor de poliubiquitina de *G. max* (Gmubi) (número de acceso en la base de datos de nucleótidos del Centro Nacional de Información para Biotecnología NCBI: D28123.1) está basado en toda la región 5'UTR del gen SUBI - 3 para la ubiquitina de soya. El promotor Gmubi puede tener un efecto transcripcional debido a que es potenciador de la expresión. Se observó que los niveles de expresión eran cinco veces mayores con el promotor Gmubi que los niveles alcanzados con el promotor CaMV35S en cotiledones de *Phaseolus lunatus* (Chiera *et al.*, 2007). Posteriormente, se desarrolló soya transgénica que contenía el promotor Gmubi, lo que resultó en altos niveles de expresión del gen reportero en hojas, pecíolos, tejidos vasculares, xilema, floema, flor, polen, vaina y semillas entre otros (Hernández-García *et al.*, 2009). En un estudio se encontró que la transformación de soya con un promotor Gmubi, unido al gen codificante de la proteína fluorescente verde (*gfp*) presentaba una expresión significativa en las raíces, los cotiledones, las plúmulas, las venas de las hojas, los pecíolos, los pétalos, el polen, las

vainas y las semillas. Ese proceso se realizó con el método de bombardeo con micropartículas. El reporte no mostró ningún resultado de eficiencia de transformación (Hernández-García *et al.*, 2009).

En 2004, Paz *et al.* reportaron diferencias en la eficiencia de transformación de variedades de soya ligadas al casete insertado en la planta usando la misma cepa bacteriana. En este estudio, la variedad Thorne presentó una eficiencia de transformación del 0,6% con el casete ST17, 0,9% con los casetes ST18 y ST19 y de 2,9% con el casete pTF102, bajo las mismas condiciones de cultivo, demostrando que hay variaciones en la eficiencia de transformación ligadas al casete.

Cabe destacar el hecho de que la expresión de transgenes es un proceso aleatorio influenciado por el uso de codones o la regulación de RNA. Una forma de contrarrestar este problema es la optimización de codones para equilibrar el sesgo de uso codónico y el contenido de GC, eliminar las señales de poliadenilación y los sitios de empalme crípticos, y además eliminar cualquier estructura secundaria de RNA potencial adyacente al codón de inicio de la traducción (Jackson *et al.*, 2014). Se ha descubierto que la optimización del uso codónico es eficaz para mejorar la expresión de un transgén con la subsiguiente obtención del rasgo fenotípico (Ban *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se pudo apreciar diferencias entre los casetes de expresión utilizados respecto a su frecuencia de transformación sobre la variedad SK7. Si se toman los datos de transformación con la cepa EHA105, con el casete E-IGP se alcanzó una frecuencia de transformación de 4,6%, con un 2,3% de transformantes funcionales, mientras que con el casete E-2 se alcanzó un 3,6% de frecuencia de transformación, con un 0,3% de transformantes funcionales. La menor presentación de transformantes funcionales en el casete E-2 se justifica por la no optimización de uso codónico en este casete, sumado al hecho de que su promotor, aunque ampliamente descrito en la producción de plantas transgénicas, es de origen viral. Por otra parte, el casete E-IGP, además de tener el uso codónico optimizado para su expresión en soya, también tiene un promotor constitutivo de la misma especie vegetal, que presenta ventajas en la expresión del transgén.

Respecto al casete pMON546 no se detectó la expresión proteica del transgen, debido a que la EPSPS que confería tolerancia al glifosato no correspondía a la CP4 EPSPS, y por tanto las pruebas de ELISA empleadas no pueden detectarla. Además, la patente que contiene los datos del casete (US4971908) no da información respecto a la secuencia codificante de la proteína. La inclusión de esta cepa y casete de expresión dentro del presente estudio pretendía hacer una comparación más cercana entre el uso de una cepa y vector producida directamente por una multinacional biotecnológica, quienes depositaron este material biológico en el banco de cepas ATCC, y que fue usado en nuestro laboratorio sin modificación alguna, contra casetes diseñados dentro del grupo de investigación, los cuales tienen modificaciones respecto al uso codónico y algunas secuencias espaciadoras (Jiménez, 2014), usan el vector de clonación pCAMBIA1301 que incrementa la libertad de operación del sistema por la figura de protección de derechos de propiedad intelectual sobre él, y usando cepas de *A. tumefaciens* a las que se tenía acceso.

El casete pMON546, en conjunto con su cepa ATCC53213 produjeron una alta frecuencia de transformación en la variedad SK7 (10,3%), sumado a una adecuada vitalidad en las plantas individualizadas y con asignación de nomenclatura de línea, en contraposición del casete E-2, el cual produjo plantas que, una vez individualizadas, perdían en poco tiempo su vitalidad y no toleraron la propagación por más de 3 generaciones. Estas observaciones sugieren que el casete pMON546 posiblemente confiere tolerancia efectiva de las plantas al glifosato, al no observarse efectos deletéreos a largo plazo en plantas *in vitro*. Pero, a diferencia de las plantas obtenidas con el casete E-IGP, en ninguna de las plantas que contenían el casete pMON546 se logró el endurecimiento. Por esta razón no fue posible realizar pruebas fenotípicas sobre plantas conteniendo este casete.

La combinación que resultó más exitosa en el presente estudio fue de la variedad SK7, con la cepa AGL0 y casete E-IGP, la cual generó los resultados más altos en frecuencia de transformación (10,8%) y transformantes funcionales (3,8%). Esto demuestra que bajo el esquema empleado por el grupo de investigación de diseño de casetes de expresión con optimización de uso codónico, sumado a vectores y cepas de *Agrobacterium* con libertad de operación en territorio colombiano, es posible generar plantas transgénicas genéricas de variedades de soya locales, con niveles de efectividad comparables a los obtenidos con el esquema empleado por las multinacionales biotecnológicas.

## 4.7. Posibilidades de optimización del proceso

Para incrementar la probabilidad de transformación en genotipos recalcitrantes, como Soyica P34, se pueden evaluar técnicas que incrementen la eficiencia de infección de *Agrobacterium*. Arun *et al.* (2015) reportaron que al aplicar sonicación sobre el explante de nudo cotiledonar durante 20 seg seguido de infiltración por vacío a 250 mmHg por 2 min del *Agrobacterium* produce una eficiencia de transformación tan alta como 18,6% en la variedad PK 416, que se incrementa aún más si se adiciona poliaminas como la espermidina, espermina y putrescina, al medio de cultivo, demostrado en la variedad DS 97-12 en la que lograron una transformación del 29,3% (Arun *et al.*, 2016). También se ha reportado la laceración del explante previo al cocultivo con un sistema de multiagujas para incrementar la eficiencia de la transformación, lo que se demostró logrando un 12% de eficiencia en la variedad Jungery (Xue *et al.*, 2006). La adición de surfactantes, como el Silwet L-77 durante el periodo de cocultivo también ha demostrado incrementar la eficiencia de transformación mediada por *Agrobacterium* en soya, así como disminuir la temperatura de cocultivo (Liu *et al.*, 2008).

En 2017, Li *et al.* encontraron que había diferentes reacciones entre las variedades Tianlong 1 y Jack Purple frente a la adición de antioxidantes al medio de cultivo, como el nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), llegando a la conclusión que los medios de cultivo deben ser optimizados específicamente para diferentes variedades de soya. En el mismo sentido Paz *et al.* (2004) reportaron que la regeneración de diferentes variedades de soya se veía positivamente afectada por la adición de cisteína al medio de regeneración, lo que los autores atribuyen a la acción protectora que ejerce este compuesto ante las oxidasas en el tejido vegetal. Sobre la variedad YC-2, Yang *et al.* (2016) reportaron que la expresión transitoria de un gen reportero se aumenta cuando en el medio de regeneración está presente algún antioxidante como el ácido lipoico, cisteína, ditiotreitól, nitrato de plata, o combinaciones de los mismos, presentando la mayor expresión del transgén el ácido lipoico solo, mientras que en 2003, Olhoft *et al.* reportaron un aumento significativo en la frecuencia de transformación sobre la variedad Bert cuando se adicionaba al medio una combinación de ditiotreitól con cisteína, en comparación a la adición de cada antioxidante solo, o la no adición de antioxidantes.

El endurecimiento de plantas de soya propagadas *in vitro* presentó enormes dificultades dentro del proceso seguido en el presente trabajo. Preliminarmente se ensayaron variables dentro de este proceso que incluyeron diferentes periodos y técnicas de aclimatación, adición de hongos formadores de micorrizas arbusculares, diferentes regímenes de riego, entre otras, sin obtener resultados satisfactorios al lograr el endurecimiento únicamente de una pequeña fracción de las plantas producidas. Esto sugiere que el proceso de endurecimiento resulta crítico en este tipo de evaluaciones, y para el caso particular de nuestro grupo de investigación requiere ser estandarizado, proceso que ya ha sido puesto en marcha a la fecha de escritura de este documento asociado a posteriores estudios del grupo de investigación. Se ha reportado que el proceso de endurecimiento de plantas de soya producidas *in vitro* se puede favorecer haciendo un proceso de aclimatación en condiciones hidropónicas antes de transferir a un sustrato tipo suelo (Kuma *et al.*, 2015), lo cual puede aportar en la adecuada transferencia de plantas de un sistema a otro.

#### **4.8. Aportes del trabajo al desarrollo tecnológico local**

Considerando que Colombia es un país tropical, las variedades de soya con características transgénicas desarrolladas para los principales países productores, que se encuentran en regiones templadas, no tienen necesariamente buenas expectativas de crecimiento en el territorio nacional, debido a las diferencias de fotoperiodo y características fisicoquímicas de los suelos tropicales. Por esta razón resulta de gran valor que, usando variedades adaptadas a las condiciones locales del cultivo de soya, se generen líneas transgénicas con características que aumenten la competitividad del cultivo local frente al producto importado. Al satisfacer localmente la demanda de soya se podría disminuir los costos asociados a los aranceles de importación de mercancía, y se disminuyen los trayectos de transporte del material, disminuyendo así la huella de carbono asociada a la importación.

A la fecha en Colombia no se ha liberado comercialmente ninguna variedad transgénica producida localmente. Todas las plantas con características transgénicas que se cultivan comercialmente en el país provienen de semillas importadas. Se reportan en Colombia trabajos en el desarrollo de líneas transgénicas de arroz, yuca, algodón, papa, caña de azúcar, café, maíz, soya, estevia y crisantemo, por cinco centros de investigación (CIAT,

CENICAÑA, CENICAFE, CIB, CORPOICA) y tres universidades (Universidad Nacional de Colombia, Universidad Javeriana, Universidad de Antioquia) (Chaparro-Giraldo, 2015), siendo el presente el primer trabajo en el país en transgénesis de soya. Es importante, por lo tanto, seguir fortaleciendo el sistema biotecnológico colombiano, desarrollando trabajos que tengan un enfoque de largo plazo para la utilización tangible por parte de los agricultores de los resultados obtenidos. Dentro de las metas de este trabajo se encontraba el establecimiento de una plataforma de transformación de soya en el grupo de Ingeniería Genética de Plantas, lo cual se logró al obtener plantas con el fenotipo esperado de tolerancia al herbicida glifosato, pero que aún es susceptible a mejoramiento. Una vez establecida la plataforma de transformación de soya en el grupo de investigación será posible hacer cambios puntuales para optimizar la metodología, de manera más rápida, de tal forma que se aumente paulatinamente la eficiencia de transformación de variedades locales de soya. El presente trabajo sienta las bases para continuar el programa de fitomejoramiento por transgénesis en cultivos como la soya en Colombia, que a futuro puede incluir una mayor diversidad de cultivos y características de interés, fortaleciendo las capacidades técnico-científicas del país en este campo.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1. Conclusiones

- Existen diferencias en la capacidad de regeneración *in vitro* asociadas al genotipo vegetal en las variedades analizadas en el presente trabajo, siendo la variedad SK7 la de mejor comportamiento. Estas diferencias se correlacionan con la producción de transformantes primarios en cada variedad, observando que variedades con menor cantidad de brotes por explante tienden a producir una menor cantidad de eventos transgénicos
- La presencia de antibióticos en el medio de cultivo, durante el proceso de transformación genética vegetal, es determinante en la eficiencia de regeneración de los explantes vegetales, y debe ser optimizado de acuerdo con la cepa de *A. tumefaciens* empleada y a la variedad vegetal a transformar. Para el caso del presente estudio con variedades de soya colombianas, la combinación de timentina con cefotaxima fue la más exitosa.
- Existen diferencias en la capacidad infectiva de diferentes cepas de *A. tumefaciens* hacia explantes de diferentes variedades de soya, siendo la AGL0 la de mayor capacidad infectiva en el presente estudio
- Las variedades de soya adaptadas al cultivo en territorio colombiano presentan importantes diferencias fisiológicas que afectan su capacidad de ser transformadas genéticamente
- El proceso diseñado dentro de este trabajo para la transformación de soya resultó exitoso, al obtenerse plantas completas que contenían el gen y expresaban la proteína de interés. Es el primer estudio enfocado a evaluar el efecto del genotipo de soya, cepa de *Agrobacterium* y casete de expresión, en la transformación de plantas, como experiencia pionera en Colombia.

- La selección *in vitro* de eventos transgénicos con el herbicida glifosato se basa mayormente en criterios fenotípicos (altura del brote regenerado, vigor), más que en el criterio absoluto de vivo/muerto que se observa en la selección con otro tipo de herbicidas, incluyendo un proceso de selección a largo plazo y bajas concentraciones del herbicida en la selección y regeneración.

## 5.2. Recomendaciones y perspectivas

Dadas las conclusiones del presente trabajo se recomienda desarrollar estudios posteriores para lograr la transformación genética de las demás variedades de soya adaptadas al cultivo en territorio colombiano, incrementando su nivel de competitividad ante el producto importado. Se recomienda igualmente optimizar el proceso de endurecimiento de plantas de soya propagadas *in vitro*, para que en posteriores estudios sea posible hacer ensayos de invernadero con una mayor cantidad de individuos.



# A. Anexo: Publicación internacional

World Patent Information 48 (2017) 47–51



Contents lists available at ScienceDirect

World Patent Information

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/worpatin](http://www.elsevier.com/locate/worpatin)



## Patents and genetically modified soybean for glyphosate resistance



Adriana Carolina Rojas Arias<sup>a</sup>, Jessica Liliana Palacio<sup>a</sup>, Alejandro Chaparro-Giraldo<sup>a</sup>,  
Silvio Alejandro López-Pazos<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Genetic Engineering of Plants Group, Biology Department & Genetics Institute, Universidad Nacional de Colombia AA 14-490, Santafé de Bogotá DC, Colombia

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad Antonio Nariño, Carrera 3 este 47A-15, Bogotá DC, Colombia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 July 2016  
Received in revised form  
30 December 2016  
Accepted 10 January 2017

#### Keywords:

*Glycine max*  
Transgenic crop  
5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate  
synthase  
Intellectual property rights  
CRISPR-Cas9 system

### ABSTRACT

The last patents protecting glyphosate herbicide tolerant soybean (Roundup Ready) expired in 2015 (US4940835, US5188642, US5804425, US5312910, US5352605, US5530196, US5627061, US5633435, US5717084, US5728925). This opens up a very big market for generic soybean. In this paper an overview of patent status will be developed which will offer records of claims, dates and owners in different world regions, including our own experience in transgenic soybean development and implementation of an open operating system will be an opportunity for applications developers from the perspective of the emerging generic transgenic crops agenda.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Soybean (*Glycine max*) is a legume plant (Fabaceae) and it has been used in food and feed products [1]. Soybean is one of the most important world commodities produced and consumed around the world after rice and wheat. Most soybean production occurs in United States (~89483000 ton/y), Brazil (~81699787 ton/y) and Argentina (~49306201 ton/y) [2]. In the recent years the soybeans are being analyzed, studied, developed and enhanced by many research works, promoting an incessant increase of desirable phenotypes: higher production, stress tolerance, nitrogen fixation or seed quality. This genetic improvement is led by the increase in production, up 31.4 kg/ha on an annualized basis. This substantial progress in recent years was explained by the increase in the number and varieties of genetically modified (GM) soybean, principally glyphosate/glufosinate tolerance, oleic/stearidonic acids production, and pest insect resistance traits among others [3–6]. Herbicide tolerance is the most important trait in planted GM soybean, giving the farmers an opportunity to take part in a different approach for better, improved growing of GM soybean's

performance in a certain environment with greater profits (e.g. Latin America produces 33 percent of the world total of herbicide-tolerant soybean) [6,7].

A gene codifying for a 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase derived from CP4 strain of *Agrobacterium*, (named *cp4 epsps*) was used into soybean, so crops expressing this enzyme have glyphosate tolerance [8]. That GM soybean technology is protected by patents that include elements such as DNA sequences, vectors, bacterial strains, plant varieties, plant transformation protocols, etc. There are two types of patents applied to GM soybean production: utility (invention or novel discovery) and plant breeder rights. The GM plant patents evaluation provides a framework that generates knowledge, promotes learning and guides action as an important means of competitive advantage and sustainability of results. Fortunately regulations on GM plant patents and their requirements are very similar among countries, for example United States, Latin America or China have promoted plant patenting, plant breeder rights, assessment of possible risks to the environment and human health (laboratory and field tests, and biosafety documentation) before the marketing of the GM plant is authorised [for review see: 9,10,11].

When the GM plant patent expires, the biotechnological invention ceases to be covered by intellectual property law and then falls into the public domain and any person can use the GM

\* Corresponding author.

E-mail address: [alejandrolopezpazos@uan.edu.co](mailto:alejandrolopezpazos@uan.edu.co) (S.A. López-Pazos).

product, without the prerequisite of obtaining authorization from its owner. In terms of lawmaking, the first step involves interpreting claims on intellectual property in a way that is favourable to the society determining whether the patent is valid or whether the patent has been infringed. A Bolar exemption will offer the opportunity to test and develop the technology and meet the regulatory requirements to avoid delaying the access of GM generics to the market after the expiration of the patent. In the field of GM plants, upon expiration of a patent, a grower can produce a generic GM crop as long as the GM product meets regulatory requirements [12]. In 2014, the first patents on GM plants were reported to have expired. The glyphosate tolerance trait (Roundup Ready soybean) patent expired in 2015 [13]. When a patent expires, the price of the GM product falls depending on the number of generics that enter the market, for example, a generic drug is normally substantially cheaper than an analog patented product. Regulatory schemes governing patent expiration are essential to generic manufacturers [14,15]. Despite what has been patented about GM soybean, there is only a small body of literature that attempts to devise means of measuring the topic and its perspectives. A paper was presented that analyzed the Canadian regulatory framework related with risk assessment for canola, corn and soybean [16], a strategic document shows the terminator technology discussion involving soybean among others GM plants [17], a paper [15] raises the uncertain prospect that any GM generic crop could be included into Generic Event Marketability and Access Agreement (GEMAA) as an agreement on access to the biosafety results for commerce concerns, a fourth article deals with the implications, from a legal perspective, of GM soybean with glyphosate tolerance in Brazil [18], finally a publication shows the Monsanto legal suit against Cargill for importation of soybean meal, derived from GM soybean containing a *epsps* gene to United Kingdom [19]. Our group seeks to contribute to such a discussion, and this paper accordingly examines the state and claims of patents protecting GM soybean for glyphosate tolerance including our technical expertise.

## 2. Methods

Data were recovered from The Lens suite (<https://www.lens.org/lens/>). The Lens is an integrated initiative comprising the European Patent Office DOCDB bibliographic data (1907–2016) and grants (1980–2016), United States Patent office database (USPTO) applications (2001–2016), grants (1976–2016) and assignments, World Intellectual Property Organization (WIPO-PCT) applications (1978–2016), and Australian patents (during the past 100 years). Indian Patent Database (IPO) was included in this project. The data framework has been decided for the 1996–2016 period covering granted patents, this point is the correct one because it includes the introduction of glyphosate tolerant soybean in the USA (at 1996) to the present day. The search was performed for combination of keywords related to GM soybean and related to the herbicide tolerance: GM, soybean, genetically engineered, genetically modified, transgenic, glyphosate tolerance, glyphosate resistance, Roundup, Monsanto. The search was completed in March 2016.

## 3. Results and discussion

The granted patent data was checked with respect to (a) claims (b) year of application, and (c) owners. A manual analysis of preliminary results revealed that some of them are not related to this research and were not considered. Patents related to Roundup Ready soybean (US4940835, US5188642, US5804425, US5312910, US5352605, US5530196, US5627061, US5633435, US5717084, US5728925) are not covered by this framework because they have been already explained with success [13]. 63 patents were selected

which met the requirements. The results are presented as tables: Table 1 to the report presents key outcome claims, Table 2 shows the progress over the years, and Table 3 gives owners for the patents.

A freedom-to-operate strategy involves complete deconstruction of GM product development, with techniques and process, including transfer material and confidentiality agreements (Fig. 1). In our experience, we have succeeded in carving out a new set of strategies to attain a possible generic GM soybean for glyphosate tolerance on intellectual property and freedom-to-operate concerns. First of all, tissue culture procedures are an important part for a successful GM plant development. Soybean is a dicot plant considered as reproducible for being propagated in tissue culture. Patents in soybean focused on protecting appropriate methods for transformation and regeneration like *A. tumefaciens* inoculation of the cot node (or *A. rhizogenes* on stem node), and bombardment of the shoot tip to allow integration of the microconstructs into the soybean cells. Our GM soybean methodology is focused on the selection of locally important cultivars for tissue culture and transformation experiments (based on the cot node and somatic embryogenesis, which are used in the state sector), these varieties are more often adapted to specific regions of a country, are passed down through generations of growers and often have a plant breeder's right. Simultaneously, a specific synthetic expression cassette design (promoter, transit peptide, gene, and terminator) adapted to the needs of each evaluation of whether there is infringement of a patent, design or trademark rights of another entity in a definite country is developed. Genes, promoters and terminators are identified and characterized (using public databases: National Center for Biotechnology Information, European Molecular Biology Laboratory or DNA databank of Japan) by bioinformatics software such as Visual Gene Developer [20], Gene Design [21], GeMS [22], or Optimizer [23] for further analyses including codon optimization, GC content adjustment, adequate use of restriction sites, or avoidance of mRNA secondary structures, potential polyadenylation sites, cryptic splice sites and repetitive elements among others. A *cp4 epsps* gene is a good option because it is biologically characterized, and has long studies about allergenicity and environmental impacts [24] if a commercial transgenic line is planned. Several patents obtained separately provided protection to *cp4 epsps* gene such as US5627061, US5633435, US5804425, USRE39247 (E1), and US6248876. Another group of patents are protecting the soybean events that were transformed with *cp4 epsps* gene: US7632985, US7608761, or US8053184 (B2). The recombinant vectors containing *cp4 epsps* gene employ a cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter because it is constitutive and is not influenced by environment or tissues. The 35S promoter is protected by numerous patents: US5352605, US5530196, US5858742, or US6255560. We used the N-terminal petunia chloroplast transit peptide (e.g. patents US5633435 and USRE39247 (E1)) and Nos terminator (e.g. patents US5362865 and US5659122) as elements of synthetic expression cassettes. When contracting with companies for the provision of cassette synthesis service, we shall demand that they safeguard the confidentiality of the information and the opportunity to negotiate an agreement for commercial use.

We use pCambia vectors to synthetic expression cassette insertion and plant modification. pCambia vectors are improved version of pPZP vectors for GM crops, they are improved to have high copy number in *Escherichia coli* and high stability in *Agrobacterium*. This vector family are small size, with adequate cloning site for inserting a *cp4 epsps* gene, has the 35S promoter and different markers (kanamycin, hygromycin and *gusA* or GFP reporters). Importantly, pCambia vectors are an open source, build on free-to-operate, available without fees for academic or non-profit research organizations. In our laboratory pCambia vectors were useful with *A. tumefaciens* strains such as LBA4404 (Ach5 pTiAch5),

**Table 1**  
Glyphosate-resistant soybean patents classified using claims.

Claims	Patent
Plant or to one of its components	EP0536330 (B1); WO1992/000377 (A1); US8324457 (B2); EP1261695 (B1); US7951995 (B2); US20110224082 (A1); AU2005/208712 (A1); EP0218571 (B1); US6673989 (B2); US2012/0157308 (A1); AU1991/084085 (A); AU655197 (B2); US09056073; US08736772; CN103826443; US20140041083; US20130338006; US20120110688; US20110239321; JP2015006192; US2003200560; IPO245892.
Seed	EP0536330 (B1); WO1992/000377 (A1); US8324457 (B2); EP1261695 (B1); US7951995 (B2); US20110224082 (A1); AU2005/208712 (A1); US6673989 (B2); US2012/0157308 (A1); AU655197 (B2); US09056073; US08736772; CN103826443; US20140041083; US20130338006; US20110224082; US20120110688; US20110239321; JP2015006192; US2003200560.
Bacterial strain	EP0536330 (B1); WO1992/000377 (A1); EP0218571 (B1); AU655197 (B2); AU1991/084085; US09056073; US08736772; US20140041083; IPO245892.
Promoter sequence	EP0536330 (B1); EP1068341 (B1); WO1992/000377 (A1); EP1261695 (B1); AU1999/032095 (A); US5914451 (A); WO1999/051759 (A1); EP0218571 (B1); AU655197 (B2); US09056073; CN103826443; US7951995 (B2); US20120110688; US2014100110; US2003200560.
Expression cassette	EP1728871 (B1); EP1068341 (B1); AU1999/032095 (A); US5914451 (A); WO1999/051759 (A1); US09056073; WO2013010094; WO2012075429.
Protein	EP0536330 (B1); EP1068341 (B1); WO1999/051759 (A1); US2012/0157308 (A1); AU1991/084085 (A); AU655197 (B2); US8324457 (B2); US7951995 (B2); WO1992/000377 (A1); EP1261695 (B1); US20110224082 (A1); US2003200560.
DNA sequence	EP0536330 (B1); EP1068341 (B1); WO1992/000377 (A1); EP1261695 (B1); AU1999/032095 (A); US7951995 (B2); US20110224082 (A1); WO1999/051759 (A1); EP0218571 (B1); US2012/0157308 (A1); AU1991/084085 (A); AU655197 (B2); US09056073; CN103826443; US20140041083; US20130338006; US8324457 (B2); US20110224082; US20120110688; US20110239321; JP2015006192; US2014100110; US2003200560; EP1728871 (B1); AU2005/208712 (A1); US5914451 (A).
RNA sequence	WO1992/000377 (A1); EP1261695 (B1); CN103826443.
In vivo methods (Field tests)	WO1992/000377 (A1); US7951995 (B2); US6673989 (B2); US2012/0157308 (A1); AU1991/084085 (A); US20140041083; US20130338006; CN103826443; US20120110688; US20110239321; US2014100110 (A1); US2003200560 (A1).
In vitro methods	EP1728871 (B1); EP0536330 (B1); EP1068341 (B1); WO1992/000377 (A1); US8324457 (B2); EP1261695 (B1); AU1999/032095 (A); US7951995 (B2); US5914451 (A); WO1999/051759 (A1); EP0218571 (B1); AU1991/084085 (A); AU655197 (B2); US09056073; US08736772; CN103826443; US20130338006; US20140041083; US20110224082; US20120110688; US20110239321; US2014100110 (A1); IPO245892.
Particledcarrying DNA	EP1068341 (B1); AU1999/032095 (A); US5914451 (A); WO1999/051759 (A1).
Selectionmethods	EP1068341 (B1); AU1999/032095 (A); US5914451 (A); WO1999/051759 (A1); US09056073.
Vector	EP0218571 (B1); US08736772.
Modified genome	CN103826443; US20140041083; US20130338006
Transgenic detection methods	US20140041083; US7951995 (B2); US2014100110; US2003200560
Food product or oil	CN103826443; US20130338006; US20140041083; US20110239321

**Table 2**  
Glyphosate-resistant soybean patents classified using priority year.

Year	Patent
1986–1991	EP0536330 (B1); WO1992/000377 (A1); EP0218571 (B1); AU1991/084085 (A); AU655197 (B2)
1992–1996	US08736772.
1997–2001	EP1728871 (B1); EP1068341 (B1); AU1999/032095 (A); US5914451 (A); WO1999/051759 (A1); US6673989 (B2); US09056073.
2002–2006	AU2005/208712 (A1); US2003200560 (A1).
2007–2011	US8324457 (B); US7951995 (B2); US20110224082 (A1); US2012/0157308 (A1); US20140041083; US20130338006; US20110224082; US20120110688; US20110239321; IPO245892.
2012–2015	CN103826443; JP2015006192; US2014100110.

**Table 3**  
Glyphosate-resistant soybean patents classified using owner subject.

Owner	Patent
MONSANTO TECHNOLOGY LLC.	EP1728871 (B1); EP0536330 (B1); EP1068341 (B1); WO1992/000377 (A1); EP1261695 B1; AU1999/032095 A; US5914451 (A); WO1999/051759 (A1); EP0218571 (B1); AU1991/084085 (A); AU655197 (B2); US09056073; US08736772; JP2015006192.
PIONEER HI BRED INT	US2012/0157308 (A1)
MS TECHNOLOGIES LLC.	CN103826443; US20140041083; US20130338006; US20110239321.
DOW AGROSCIENCES LLC	US20120110688; CN103826443; US20140041083; US20130338006.
BAYER BIOSCIENCE NV	US20110239321
DU PONT	US2014100110 (A1); US2012/0157308 A1.
SYNGENTA LIMITED	US2003200560 (A1)
BASF PLANT SCIENCE GMBH	IPO245892

EHA101 (C58 pTiBo542) and EHA105 (a derivative of EHA101). We occasionally removed the reporter gene (e.g. *gus* gene from pCambia1301 using restriction enzymes: NruI, MfeI, BsrGI and PvuI) to reduce the regulatory burden. *Agrobacterium* use is constrained by numerous patents (Table 1), some patents have lapsed and others entered into legal force. There is bacterial species

outside the group *Agrobacterium* such as *Sinorhizobium meliloti*, and are a possibility to patent restrictions to GM plants development (to details see [cambia.org](http://cambia.org)). In our case, we find that *A. tumefaciens* is more efficient than *S. meliloti* infecting plants. Soybean regeneration is possible through the use of cot nodes that are wounded simultaneously with the *A. tumefaciens* inoculation which then gives a

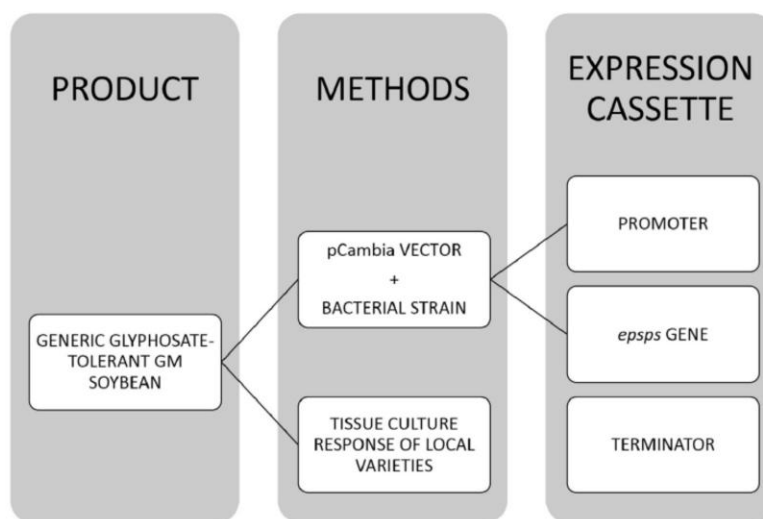


Fig. 1. An essential strategy to achieve a generic glyphosate-tolerant soybean.

shoot proliferation. These multiple shoots are subjected to moderate selection with glyphosate. This method has been widely used and has real successful, although soybean transformation and regeneration could be influenced by genotype effects of local cultivars. Several patents claimed tissue culture methods in soybean including plant part production, transformation methods or specific GM traits (Table 1). There are two approaches for possible transgenic plant selection regarding protection of patents (US20140173780 A1 and US8592212 B2). These are long-term solutions where the visible effects can be seen in 6–8 weeks and it takes 0–25 mg/L glyphosate doses, this involves slowly reducing the dosage of herbicide over time.

The implementation of glyphosate tolerant soybeans offers a huge saving in time and money. A study assessed the impact of a possible ban of GM soybean on food trade and other socio-economic aspects. This possible limitation implies that soybean production falls in 1.4% and their supply value rise 4.05%. Other consequences include change of forest and grassland to arable land, and polluting emissions increase (~0.9 billion ton of carbon dioxide) [25]. Many patents concerning with GM soybean for glyphosate tolerance have reached the end of their terms (e.g. several patents for CAMV 35S promoters) confirming the possibility to develop “generic GM crop” projects in aid of developing countries and/or disadvantaged populations.

#### 4. Perspective

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR-Cas9 system) is a prokaryotic defense system which can be used to target specific stretches of DNA and to edit regions at particular positions. During this years over 1000 patent applications have been submitted (available for consultation on The Lens). More recently, its potential has also been recognized for raising crop improvement including knock-outs of disadvantageous genes, introduction of mutations into a gene of interest, or regulatory elements study [26]. With respect to CRISPR-Cas9 system that is being used for soybean improvement, mention might be made of the fact that specific implementations have been adopted for the design of genomic modifications (patent US 2016/0208272 A1), conditions for an increase in the quantity of protein and stress

resistance (patent WO2016/134081 A1), identification of optimal genomic loci for insertion of exogenous sequences (patent WO2015/066634 A2). It is important to note that the patent WO2016/007347 A1 (Du Pont and Pioneer Hi Bred Int) is related with genomic edition for glyphosate resistant soybean by CRISPR-Cas9 technology. Zetsche et al. [27] established positive result of a different CRISPR system based on Cpf1 enzyme from *Francisella* bacterium, and they found 16 Cpf1-like enzymes from diverse bacteria that has the potential to eukaryote genome engineering. According to the evidence, it can be stated that each research laboratory may certainly design and patent your own CRISPR-Cas9-like system.

#### References

- [1] E.R. Cober, S.R. Cianzio, V.R. Pantalone, I. Rajcan, Soybean, in: J. Vollmann, I. Rajcan (Eds.), Handbook of Plant Breeding Volume 4: Oil Crops, Springer, New York, 2009, pp. 57–90.
- [2] FAOSTAT, The Statistics Division of FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, Production statistics, 2014. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Accessed 20 March 2016).
- [3] Z. Zhang, A. Xing, P. Staswick, T.E. Clemente, The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 56 (1999) 37–46.
- [4] E. Ridner, D. Gaón, M.C. Gamberale, R. Salinas, Soja, propiedades nutricionales y su impacto en la salud, Sociedad Argentina de Nutrición, Buenos Aires, 2006.
- [5] L.J. Qiu, R.Z. Chang, The origin and history of soybean, in: G. Singh (Ed.), *The Soybean: Botany, Production and Uses*, CAB International Oxford, United Kingdom, 2010, pp. 1–23.
- [6] J. Clive, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops, ISAAA Brief, ISAAA, Ithaca, New York, 2014, 2014, No. 49.
- [7] M.D.K. Owen, P. Pedersen, J.L.D. Bruin, J. Stuart, J. Lux, D. Franzenburg, D. Grossnickle, Comparisons of genetically modified and non-genetically modified soybean cultivars and weed management systems, *Crop Sci.* 50 (2010) 2597–2604.
- [8] T. Funke, H. Han, M.L. Healy-Fried, M. Fischer, E. Schonbrunn, Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 13010–13015.
- [9] M.J. Carroll, The importance of regulatory data protection or exclusive use and other forms of intellectual property rights in the crop protection industry, *Pest Manag. Sci.* 72 (2016) 1631–1637.
- [10] C.L. Chi-Ham, S. Boettiger, R. Figueroa-Balderas, S. Bird, J.N. Geoola, P. Zamora, M. Alandete-Saez, A.B. Bennett, An intellectual property sharing initiative in agricultural biotechnology: development of broadly accessible technologies for plant transformation, *Plant Biotechnol. J.* 10 (2012) 501–510.
- [11] A. Chaparro-Giraldo, Cultivos transgénicos: entre los riesgos biológicos y los beneficios ambientales y económicos, *Acta Biol. Colomb.* 16 (2011) 231–252.

- [12] H.R. Jaenichen, J. Pitz, Research exemption/experimental use in the European Union: patents do not block the progress of science, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5 (2014) a020941.
- [13] D. Jefferson, C. Chi-Ham, A. Bennett, The emergence of agbiogenetics, *Nat. Biotechnol.* 33 (2015) 819–823.
- [14] G. Brookes, P. Barfoot, *GM Crops: Global Socio-economic and Environmental Impacts 1996-2014*, PG Economics Ltd, 2016, p. 198.
- [15] D. Gruskin, *Agbiotech 2.0*, *Nat. Biotechnol.* 30 (2012) 211–214.
- [16] S.J. Smyth, The state of genetically modified crop regulation in Canada, *GM Crops Food* 5 (2014) 195–203.
- [17] H. Ledford, Seed-patent case in supreme court, *Nature* 494 (2013) 289–290.
- [18] R.L. Rodrigues, C.L. Lage, A.G. Vasconcelos, Intellectual property rights related to the genetically modified glyphosate tolerant soybeans in Brazil, *An. Acad. Bras. Cienc* 83 (2011) 719–730.
- [19] S. Cohen, G. Morgan, *Monsanto Technology LLC v. Cargill: a matter of construction*, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 289–291.
- [20] S.-K. Jung, K. McDonald, *Visual gene developer: a fully programmable bioinformatics software for synthetic gene optimization*, *BMC Bioinforma.* 12 (2011) 1–13.
- [21] S.M.N. Richardson, P. Yarrington, R. Boeke, J. Bader, S. Joel, *Gene Design 3.0 is an updated synthetic biology toolkit*, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 2603–2606.
- [22] S. Jayaraj, R. Reid, D.V. Santi, *GeMS: an advanced software package for designing synthetic genes*, *Nucleic Acids Res.* 23 (2005) 3011–3016.
- [23] P. Puigbo, E. Guzman, A. Romeu, S. Garcia-Vallve, *OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences*, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 126–131.
- [24] CERA Center for Environmental Risk Assessment, *GM Crop Database*, 2014. [http://cera-gmc.org/index.php?action=gm\\_crop\\_database](http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database) (Accessed 10 January 2014).
- [25] H. Mahaffey, F. Taheripour, W. Tyner, Evaluating the economic and environmental impacts of a global GMO Ban, *JEP* 7 (2016) 1522–1546.
- [26] R. Rani, P. Yadav, K.M. Barbadikar, N. Baliyan, E.V. Malhotra, B.K. Singh, A. Kumar, D. Singh, *CRISPR/Cas9: a promising way to exploit genetic variation in plants*, *Biotechnol. Lett.* 38 (2016) 1991–2006.
- [27] B. Zetsche, J.S. Gootenberg, O.O. Abudayyeh, I.M. Slaymaker, K.S. Makarova, P. Essletzbichler, S.E. Volz, J.J. Joung, van der Oost, A. Regev, E.V. Koonin, F. Zhang, *Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system*, *Cell* 163 (2015) 759–771.

**Adriana Carolina Rojas Arias** is a researcher in Genetic Engineering of Plants Group, Biology Department & Genetics Institute, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá DC, Colombia. She has many years of experience in the plant defense research including plant transformation, antimicrobial peptides identification, plant pathogen isolation, and primer design.

**Jessica Liliana Palacio** is a young researcher in Genetic Engineering of Plants Group, Biology Department & Genetics Institute, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá DC, Colombia.

**Alejandro Chaparro-Giraldo** is a Ph. D., leader of Genetic Engineering of Plants Group, from Biology Department & Genetics Institute, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá DC, Colombia. He is a tenured professor with many years of experience in genetically modified plant and intellectual property rights.

**Silvio Alejandro López-Pazos** is a Ph.D., from Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad Antonio Nariño, Bogotá DC, Colombia. He is an assistant professor with many years of experience in microbiology, biotechnology and molecular biology research.



## B. Anexo: Pruebas estadísticas suplementarias

**Anexo B-1:** Resultado del ajuste del modelo con función de enlace de identidad para estrategias de selección de largo plazo. *estra*: estrategia; *cep*: cepa; cepa 1: AGL0; cepa 2: EHA105; variedad 0: SK7; variedad 1: P29; variedad 2: Soyica P34;  $Pr(<|t|)$ : valor  $p$ ; la presencia o no de asteriscos o puntos frente al valor  $p$ , y el número de los mismos indican el nivel de confianza según se expresa frente a la leyenda “Signif. codes.”

```
Call:
glm(formula = n_exitos ~ estra + variedad + sep, family = gaussian())

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-18.625  -10.979   2.083   8.052  20.958

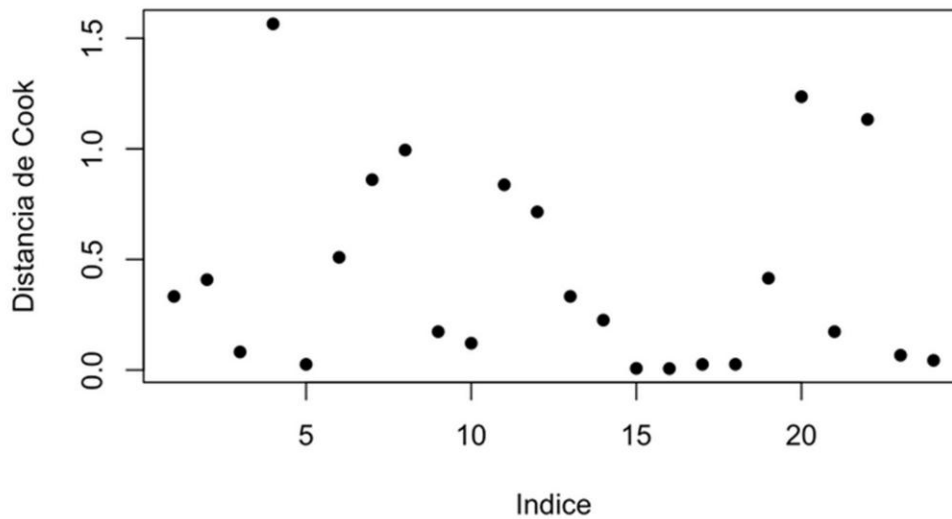
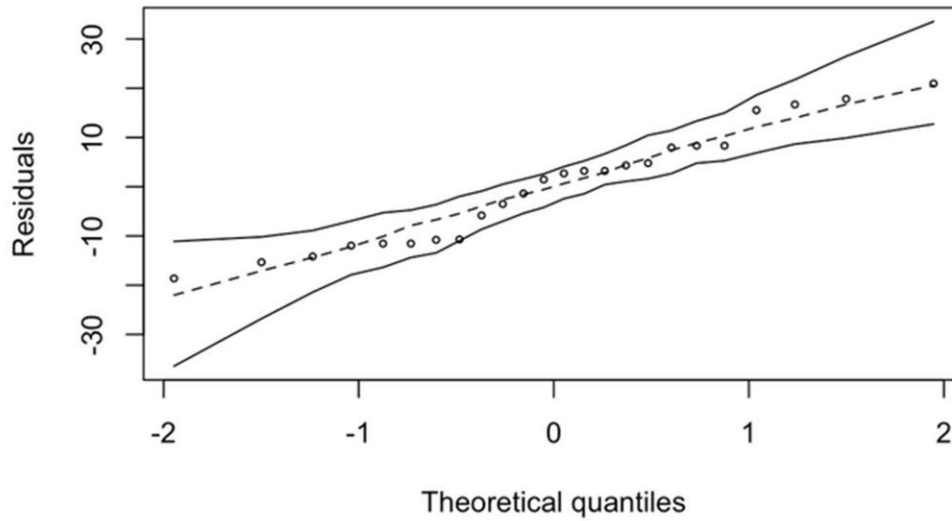
Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  104.542     6.668  15.678 1.53e-11 ***
estra1      -71.833     8.316  -8.638 1.27e-07 ***
estra2     -103.500     8.316 -12.445 5.75e-10 ***
variedad1    -3.750     6.668  -0.562  0.5812
variedad2   -18.875     6.668  -2.831  0.0115 *
cep1         13.500     7.700   1.753  0.0976 .
cep2         21.333     7.700   2.771  0.0131 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for gaussian family taken to be 177.848)

Null deviance: 36561.0 on 23 degrees of freedom
Residual deviance: 3023.4 on 17 degrees of freedom
AIC: 200.18

Number of Fisher Scoring iterations: 2
```

**Anexo B2:** Verificación del supuesto de normalidad en el modelo lineal generalizado. Se grafican los datos en distribución dentro de barras de confianza (arriba) y como distribución en distancia de Cook (abajo).



**Anexo B3:** Pruebas estadísticas para la confirmación de independencia y normalidad de residuos

Estadístico	Valor $p$	Método
1,29997	0,0218	Durbin-Watson test
0,95147	0,29153	Shapiro-Wilk normality test



# Bibliografía

Agrobio (Asociación de Biotecnología Vegetal Agrícola). Biotecnología. [en línea]. <http://www.agrobio.org/cultivos-geneticamente-modificados/> (Consulta: Mayo 2017)

AGRONET. Red de Información y Comunicación del Sector Agropecuario Colombiano. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia. [En línea]. [www.agronet.gov.co](http://www.agronet.gov.co) (Consulta: Abril, 2017).

Anami S, Njuguna E, Coussens G, Aesaert S, Van Lijsebettens M. (2013). Higher plant transformation: principles and molecular tools. *International Journal of Developmental Biology*, 57, 483-494

Arun M, Chinnathambi A, Subramanyam K, Karthik S, Sivanandhan G, Theboral J, Alharbi SA, Kim CK, Ganapathi A. (2016). Involvement of exogenous polyamines enhances regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in half-seeds of soybean. *3 Biotech*, 6: 148

Arun M, Subramanyam K, Mariashibu TS, Theboral J, Shivanandhan G, Manickavasagam M, Ganapathi A. (2015). Application of Sonication in Combination with Vacuum Infiltration Enhances the *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation in Indian Soybean Cultivars. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(4): 2266-2287

Atif RM, Patat-Ochatt EM, Svabova L, Ondrej V, Klenoticova H, Jacas L, Griga M, Ochatt SJ. (2013). Gene Transfer in Legumes. En: U. Lüttge, W. Beyschlag, D. Francis y J. Cushman (eds.), *Progress in Botany 74*, (Ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 37 – 100.

Ban H, Chai X, Lin Y, Zhou Y, Peng D, Zhou Y, Zou Y, Yu Z, Sun M. (2009). Transgenic *Amorphophallus konjac* expressing synthesized acyl-homoserine lactonase (*ahiiA*) gene exhibit enhanced resistance to soft rot disease. *Plant Cell Reports*, 28 (12): 1847-1855.

Bernal JH. (2006). Manejo de malezas en el cultivo de la soya. En: C.A. Jaramillo, N. Cubillos (Ed.). *Soya (Glycine max (L.) Merrill), alternativa para los sistemas de producción de la Orinoquia colombiana*. (pp. 173-180). Villavicencio (Meta), Colombia: Corpoica C.I La Libertad.

BIOS. (2009). What does “Freedom to Operate” mean?. [en línea]. <http://www.bios.net/daisy/patentlens/2768.html> (Consulta: agosto de 2017)

Bonny S. (2016). Genetically Modified Herbicide-Tolerant Crops, Weeds, and Herbicides: Overview and Impact. *Environmental Management*, 57: 31–48

Bradley KW, Johnson B, Smeda R, Boerboom C. (2009). *Practical weed science for the field scout: corn and soybean*. Columbia (Missouri), Estados Unidos de América: University of Missouri

Brookes G, Barfoot P. (2013). Key environment impact of global genetically modified (GM) crop use 1996 – 2011. *GM crops and food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain*, 4, 109-119.

Brookes G, Barfoot P. (2017). Farm income and production impacts of using GM crop technology 1996–2015. *GM Crops & Food*, 0: 1–38.

Bruening G, Lyons JM. (2000). The case of the FLAVR SAVR tomato. *California Agriculture*, 54(4), 6-7.

Castaño A. (2013). Regulación para la liberación comercial de cultivos genéticamente modificados (GM) para la alimentación humana. En: A. Chaparro-Giraldo (Ed.). *Propiedad intelectual y regulación en biotecnología vegetal: el caso de los cultivos genéticamente modificados (GM)*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá, Facultad de Ciencias.

Chaparro-Giraldo A. (2011). Cultivos transgénicos: entre los riesgos biológicos y los beneficios ambientales y económicos. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), 231-252.

Chaparro-Giraldo A. (2013). Regulación para el uso de agrícola de cultivos genéticamente modificados (GM). En: A. Chaparro-Giraldo (Ed.). *Propiedad intelectual y regulación en biotecnología vegetal: el caso de los cultivos genéticamente modificados (GM)*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá, Facultad de Ciencias.

Chaparro-Giraldo A. (2015). La ingeniería genética de plantas en Colombia: un camino en construcción. *Acta biológica Colombiana*, 20(2): 13-22.

Chaparro-Giraldo A, Ávila K. (2013). El problema de la propiedad intelectual y la regulación en la liberación comercial de cultivos genéticamente modificados (GM) en Colombia. En: A. Chaparro-Giraldo (Ed.). *Propiedad intelectual y regulación en biotecnología vegetal: el caso de los cultivos genéticamente modificados (GM)*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá, Facultad de Ciencias.

Chen FX, Zhou CR, Li GP. (2012). Study on thermal decomposition and the non-isothermal decomposition kinetics of glyphosate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 109 (3): 1457–1462

Chi-Ham C, Carreño A. (2013). La redirección de la investigación pública en el sector agrícola frente al desarrollo de los cultivos GM: el papel de la propiedad intelectual y las políticas de regulación. En: A. Chaparro-Giraldo (Ed.). *Propiedad intelectual y regulación en biotecnología vegetal: el caso de los cultivos genéticamente modificados (GM)*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá, Facultad de Ciencias.

Chiera J, Bouchard R, Dorsey S, Park E, Buenrostro-Nava M, Ling P, Finer J. (2007). Isolation of two highly active soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) promoters and their characterization using a new automated image collection and analysis system. *Plant Cell Reports*. 26(9):1501–1509.

Clemente TE, LaVallee BJ, Howe AR, Conner-Ward D, Rozman RJ, Hunter PE, Broyles DL, Kasten DS, Hinchee MA. (2000). Progeny Analysis of Glyphosate Selected Transgenic Soybeans Derived from *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Crop Science*, 40: 797-803

Cober ER, Cianzio SR, Pantalone VR, Rajcan I. (2009). Soybean. En: J. Vollmann, I. Rajcan (Ed). *Handbook of plant breeding Volume 4: Oil Crops*. (pp. 57-90). New York, Estados Unidos de América: Springer.

Colbach N, Fernier A, Le Corre V, Messéan A, Darmency H. (2017). Simulating changes in cropping practices in conventional and glyphosate-tolerant maize. I. Effects on weeds. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 11582–11600

Deeba F, Hyder MZ, Shah SH, Naqvi SM. (2014). Multiplex PCR assay for identification of commonly used disarmed *Agrobacterium tumefaciens* strains. *Springerplus*. 15 (3): 358.

Diazgranados C, Hincapie V, Chaparro-Giraldo A. (2016). Aproximación al estudio de libertad de operación para una línea transgénica de arroz en Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1): 165-172

Doyle, J. (1991) DNA protocols for plants. En *Molecular techniques in taxonomy*. Springer Berlin Heidelberg, p. 283-293.

Duke SO, Cerdeira AL. (2010). Transgenic Crops for Herbicide Resistance. En: C. Kole, C.H. Michler, A.G. Abbott, T.C. Hall (Eds). *Transgenic Crop Plants Volume 2: Utilization and Biosafety* (pp 133-166). Heidelberg, Alemania: Springer (2010)

Duke SO, Powles SB. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64, 319-325

Eisel, D., Seth, O., Grünwald-Janho, S., Kruchen, B., Rüger, B. (Eds) (2008). *DIG Application Manual for Filter Hybridization*. Editorial Roche Diagnostics GmbH. 204 pp

FAOSTAT (Base de datos estadísticos sustantivos de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Estadísticas de Producción de Productos Alimentarios y Agrícolas [en línea]. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. (Consulta: Marzo, 2017)

Farmer D. (2001). Inhibitors of Aromatic Acid Biosynthesis. En: R. Krieger (Ed). *Handbook of Pesticide Toxicology*. (pp. 1667-1672). San Diego (California), Estados Unidos de América: Academic Press.

Gómez DC. (2013). Regeneración *in vitro* a partir de semillas madura en la variedad de soya (*Glycine max* L. Merrill) Soyica P34. Tesis de Maestría en Ciencias – Biología. Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá (82 pp). Bogotá, Colombia.

Green JM. (2012). The benefits of herbicide-resistant crops. *Pest Management Science*, 68, 1323–1331

Grushkin,D. (2012). Agbiotech 2.0. *Nature Biotechnology*, 30(3), 211-214

Hernández-García CM, Martinelli AP, Bouchard RA, Finer JJ. (2009). A soybean (*Glycine max*) polyubiquitin promoter gives strong constitutive expression in transgenic soybean. *Plant Cell Reports*, 28(5): 837-849.

Hincapié VP, Chaparro-Giraldo A. (2013). Metodología para analizar la libertad de operación en cultivos genéticamente modificados (GM). En: A. Chaparro-Giraldo (Ed.). *Propiedad intelectual y regulación en biotecnología vegetal: el caso de los cultivos genéticamente modificados (GM)*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá, Facultad de Ciencias.

Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A. (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*, 2: 208-218

Hood EE, Helmer GL, Fraley RT, Chilton MD. (1986). The Hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 Is Encoded in a Region of pTiBo542 Outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology*, 168(3): 1291-1301

Hollander M, Wolfe DA, Chicken E. (2014). *Nonparametric Statistical Methods*. Tercera edición. Hoboken (New Jersey), Estados Unidos de América: John Wiley & Sons.

ILSI Research Foundation. (2017). GM Crop Database. ILSI Research Foundation, Washington D.C. <http://cera-gmc.org/gmcropdatabase>

ISAAA. (2016). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA Brief No. 52. ISAAA: Ithaca, NY.

Jackson MA, Sternes PR, Mudge SR, Graham MW, Birch RG. (2014). Design rules for efficient transgene expression in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 12: 925-933.

Jefferson DJ, Graff GD, Chi-Ham CL, Bennett AB. (2015) The emergence of agbiogenerics. *Nature Biotechnology*, 33, 819-823

Jia Y, Yao X, Zhao M, Zhao Q, Du Y, Yu C, Xie F. (2015). Comparison of Soybean Transformation Efficiency and Plant Factors Affecting Transformation during the *Agrobacterium* Infection Process. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 18522-18543

Jiménez JP. (2014) Diseño de genes semi-sintéticos que confieran tolerancia a herbicidas en soya. Tesis de Maestría en Ciencias – Biología. Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá (150 pp). Bogotá, Colombia.

Jiménez J, Chaparro-Giraldo A. (2016). Diseño *in silico* y evaluación funcional de genes semisintéticos que confieran tolerancia a fosfinotricina. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2): 90-96

Kay R, Chan A, Daly M, McPherson J. (1987). Duplication of CaMV 35S Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes. *Science*, 236(4806):1299-1302.

Kelton JA, Price AJ. (2009). Weed science and management in soil sciences, land cover and land use. En: W.H. Verheye (Ed). *Soils, Plant Growth and Crop Production*. Oxford, Reino Unido: UNESCO-EOLSS (Encyclopedia of Life Support Systems)

Klümper W, Qaim M. (2014). A Meta-Analysis of the Impacts of Genetically Modified Crops. *PLoS ONE* 9(11): e111629

Ko TS, Korban SS. (2004). Enhancing the frequency of somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 40(6): 552-558

Ko TS, Lee S, Krasnyanski S, Korban SS. (2003). Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. *Theoretical and Applied Genetics*, 107 (3): 439-447

Kowalski S, Ehora B, Kryder D, Potter R. (2002). Transgenic crops, biotechnology and ownership rights: what scientists need to know?. *The Plant Journal*, 31(4): 407-421.

Kuma KM, Lopes-Caitar VS, Romero CCT, Silva SMH, Kuwahara MK, Carvalho MCCG, Abdelnoor RV, Dias, WP, Marcelino-Guimarães FC. (2015). A high efficient protocol for soybean root transformation by *Agrobacterium rhizogenes* and most stable reference genes for RT-qPCR analysis. *Plant Cell Reports*, 34:1987–2000

Kryder R, Kowalski S, Krattiger A. (2000). The Intellectual and Technical Property Components of pro-Vitamin A Rice (GoldenRice™): A Preliminary Freedom-To-Operate Review. *ISAAA Briefs No. 20*. ISAAA: Ithaca, NY. p 56

Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA. (1991). A DNA Transformation-Competent *Arabidopsis* Genomic Library in *Agrobacterium*. *Nature Biotechnology*, 9: 963-967

Lamprea N, Salazar JL. (2013). Patentes y biotecnología vegetal en Colombia. En: A. Chaparro-Giraldo (Ed.). *Propiedad intelectual y regulación en biotecnología vegetal: el caso de los cultivos genéticamente modificados (GM)*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá, Facultad de Ciencias.

Li,W., Li,W., Lv,W., and Ning, H. (2008). Break through of two questions on the *Agrobacterium*-mediated soybean cotyledonary node systems. *Soybean Science*, 27, 173–175.

Li S, Cong Y, Liu Y, Wang T, Shuai Q, Chen N, Gai J and Li Y (2017). Optimization of *Agrobacterium*-Mediated Transformation in Soybean. *Frontiers in Plant Science*, 8:246. 1-15

Liu D. (2009). Design of gene constructs for transgenic maize. *Methods in Molecular Biology*, 526, 3-20.

Liu HK, Yang C, Wei ZM. (2004). Efficient *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. *Planta*, 219: 1042–1049

Liu M, Yang J, Cheng Y, An L. (2009) Optimization of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) in planta ovary transformation using a linear minimal *gus* gene cassette. *Journal of Zhejiang University Science B*, 10(12):870-876.

Liu SJ, Wei ZM, Huang JQ. (2008). The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties. *Plant Cell Reports*, 27: 489–498

Manna M, Achary VMM, Islam T, Agrawal PK, Reddy MK. (2016). The development of a phosphite-mediated fertilization and weed control system for rice. *Scientific Reports*, 6, 24941

Mariashibu TS, Subramanyam K, Arun M, Mayavan s, Rajesh M, Theboral J, Manickavasagam M, Ganapathi A. (2013). Vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(1): 41-54



Melo OO, López LA, Melo SE. (2007). *Diseño de Experimentos: Métodos y Aplicaciones*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Ciencias.

Meurer CA, Dinkins RD, Collins GB. (1998). Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. *Plant Cell Reports*, 18, 180–186

McCullagh P, Nelder JA. (1989). *Generalized Linear Models*. Segunda Edición. Londres, Inglaterra: Chapman and Hall

McCullen CA, Binns AN. (2006). *Agrobacterium tumefaciens* and Plant Cell Interactions and Activities Required for Interkingdom Macromolecular Transfer. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22, 101–27

McDougall P. (2011). The cost and time involved in the discovery, development and authorization of a new plant biotechnology derived trait. A Consultancy Study for Crop Life International. 24 p. [en línea]. <http://croplife.org/wp-content/uploads/2014/04/Getting-a-Biotech-Crop-to-Market-Phillips-McDougall-Study.pdf> (Consulta: agosto de 2017)

Olhoft PM, Flagel LE, Donovan CM, Somers DA. (2003). Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta*, 216, 723–735.

Owen, M.D.K. (2010). Herbicide Resistance. En: F. Kempken, C. Jung (Eds). *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Volume 64: Genetic Modification of Plants: Agriculture, Horticulture and Forestry* (pp 159-176). Berlin, Alemania: Springer (2010)

Paz MM, Shou H, Guo Z, Zhang Z, Banerjee AK, Wang K. (2004). Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica*, 136, 167–179

Paz MM, Martinez JC, Kalvig AB, Fonger TM, Wang K. (2006). Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep*, 25, 206–213.

Perlak FJ, Stone TB, Muskopf YM, Petersen LJ, Parker GB, McPherson SA, Wyman J, Love S, Reed G, Biever D, *et al.*. (1993). Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Molecular Biology*, 22(2): 313-321.

Pisano GP. (2006). Can Science Be a Business? Lessons from Biotech. *Harvard Business Review*, 84 (10): 1-12.

Pline WA, Price AJ, Wilcut JW, Edmisten KL, Wells R. (2001). Absorption and translocation of glyphosate in glyphosate-resistant cotton as influenced by application method and growth stage. *Weed Science*, 49: 460–467

Qiu LJ, Chang RZ. (2010). The Origin and History of Soybean. En: G. Singh (Ed). *The Soybean: botany, production and uses* (pp. 1-23). Oxford, Reino Unido: CAB International.

Qiu LJ, Xing LL, Guo Y, Wang J, Jackson SA, Chang RZ. (2013). A platform for soybean molecular breeding: the utilization of core collections for food security. *Plant Molecular Biology*. 83 (1-2): 41-50.

Ridner E, Gaón D, Gamberale MC, Salinas R. (2006). *Soja, propiedades nutricionales y su impacto en la salud* (98pp). Buenos Aires, Argentina: Sociedad Argentina de Nutrición

Rojas Arias AC, Palacio, J, Chaparro-Giraldo A, Lopez-Pazos SA. 2017. Patents and genetically modified soybean for glyphosate resistance. *World Patent Information*. 48: 47-51.

Rooke L, Byrne D, Salgueiro S (2000) Marker gene expression driven by the maize ubiquitin promoter in transgenic wheat. *Annals of Applied Biology*, 136: 167–172.

Schiek B, Hareau G, Baguma Y, Medakker A, Douches D, Shotkoski F, Ghislain M. (2016). Demystification of GM crop costs: releasing late blight resistant potato varieties as public goods in developing countries. *International Journal of Biotechnology*, 14(2): 113 – 131.

SIC - Superintendencia de Industria y Comercio. [en línea]. <http://www.sic.gov.co/patentes>. (Consulta: mayo, 2017)

Sinebo W, Maredia K. (2016). Innovative farmers and regulatory gatekeepers: Genetically modified crops regulation and adoption in developing countries. *GM Crops Food*. 7(1): 1-11.

Song Z, Tian J, Fu W, Li L, Lu L, Zhou L, Shan Z, Tang G, Shou H. (2013). Screening Chinese soybean genotypes for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation suitability. *Journal of Zhejiang University*, 14(4), 289-298.

Soto, N., Delgado, C., Hernández, Y., Rosabal Y., Ferreira A., Pujol M., Aragão F., Enríquez G.A. (2016). Efficient particle bombardment-mediated transformation of Cuban soybean (INCASoy-36) using glyphosate as a selective agent. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 128: 187-196.

Soto N, Ferreira A, Delgado C, Enríquez GA. (2013). In vitro regeneration of soybean plants of the Cuban Incasoy-36 variety. *Biotecnología Aplicada*, 30: 34-38

Strizhov N, Keller M, Mathur J, Koncz-Kálmán Z, Bosch D, Prudovsky E, Schell J, Sneh B, Koncz C, Zilberstein A. (1996). A synthetic *cryIC* gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin, confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco. *Proceedures National Academy of Sciences U S A*, 93(26):15012-15017.

Sun, X. (2013). Establishment and Optimization of Soybean Cotyledonary-Node Genetic Transformation System of Jiyu47. Thesis, *Jilin University Press*.

Sylvester I. (2009). *La soja*. Buenos Aires, Argentina: El Cid Editores

Thomas Z. (2006). Agricultural Biotechnology and proprietary rights, challenges and policy options. *The Journal of world intellectual property*, 8: 711-734

USPTO - The United States Patent and Trademark Office. (2015). Manual of Patent Examining Procedure (MPEP), Eighth Edition. Chapter 2700, Section 2701: Patent Term. [en línea]. <http://www.uspto.gov/web/offices/pac/mpep/s2701.html>. (Consulta: Abril, 2017)

Valencia RA, Carmen H, Salamanca CR, Caicedo S, Almanza E, Arrieta G, Guevara J, Cubillos N. (2008). *Cartilla 500 preguntas y respuestas del cultivo de soya*. Villavicencio, Colombia: Corpoica, Centro de Investigación La Libertad

Valencia RA, Ligarreto GA. (2010). Mejoramiento genético de la soya (*Glycine max* [L.] Merrill) para su cultivo en la altillanura colombiana: una visión conceptual prospectiva. *Agronomía Colombiana*, 28(2), 155-163

Villarroel DA, Oliveros MA, Millán AJ. (1996). Una alternativa a la floración prematura de la soya en el trópico. *FONAIAP Divulga*, 54.

Webster GR, Teh AY, Ma JK. (2017). Synthetic gene design - The rationale for codon optimization and implications for molecular pharming in plants. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(3): 492-502.

Wright D, Pardey P. (2006). The evolving rights to intellectual property protection in the agricultural biosciences. *International Journal of Technology and Globalisation*, 2(1/2): 12-29.

Xue RG, Xie HF, Zhang B. (2006). A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells. *Biotechnology Letters*, 28: 1551-1557

Yang XF, Yu XQ, Zhou Z, Ma WJ, Tang GX. (2016). A high-efficiency *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation system using cotyledonary node as explants in soybean (*Glycine max* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 38:60

Yaya-Lancheros ML, Chaparro-Giraldo A. (2007). Derechos de propiedad intelectual y agro-biotecnología: limitaciones y alternativas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(1), 49-58.

Yukawa K, Kaku H, Tanaka H, Koga-Ban Y, Fukuda M. (2008). Enhanced Soybean Infection by the Legume “Super-Virulent” *Agrobacterium tumefaciens* Strain KAT23. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72 (7), 1809–1816

Zanga D, Capell T, Zhu C, Christou P, Thangaraj H. (2016). Freedom-to-operate analysis of a transgenic multivitamin corn variety. *Plant Biotechnology Journal*, 14: 1225–1240

Zeng P, Vadnais DA, Zhang Z, Polacco JC. (2004). Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Reports*, 22: 478–482

Zhang Z, Xing A, Staswick P, Clemente TE. (1999). The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56, 37–46

Zia M, Arshad W, Bibi Y, Nisa S, Chaudhary MF. (2011). Does Agro-injection to soybean pods transform embryos?. *Plant Omics Journal*, 4(7): 384-390

Zimdahl RL. (2013). *Fundamentals of Weed Science*. Cuarta edición. Oxford, Reino Unido: Academic Press.