

Desarrollo de líneas transgénicas de soya (*Glycine max*) con tolerancia a glufosinato de amonio

Daniela María Mónica Díaz Suárez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Agronomía
Bogotá, Colombia
2018

Desarrollo de líneas transgénicas de soya (*Glycine max*) con tolerancia a glufosinato de amonio

Daniela María Mónica Díaz Suárez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agrarias

Director
Ph.D. Alejandro Chaparro Giraldo

Línea de Investigación:
Genética y Fitomejoramiento
Grupo de Investigación:
Ingeniería Genética de Plantas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Agronomía
Bogotá, Colombia
2018

Abstract

This study presents the first transformation of Colombian soybean varieties to confer tolerance to glufosinate ammonium. The cassette used contains only the *bar* gene with modification of codonic use for soybean, so that the selection of the transformation is made with the same herbicide. The transformation is mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, strain EHA 105 is used. In the in vitro selection process, the active component of the herbicide, phosphinothricin, is used at a concentration of 1 mg / L. As a result, 31 potentially transgenic primary transformants were identified, evaluated and 26 gave positive PCR results for the *bar* gene.

Keywords: In vitro selection, transformation efficiency, regenerants, herbicide tolerance

Resumen

En este estudio se presenta la primera transformación de variedades de soya colombiana para conferirle tolerancia a glufosinato de amonio. El cassette empleado contiene únicamente el gen *bar* con modificación de uso codónico para soya, de modo que la selección de la transformación se realiza con el mismo herbicida. La transformación es mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, se emplea la cepa EHA 105. En el proceso de selección *in vitro* se usa el componente activo del herbicida, la fosfotricina, en una concentración de 1 mg/L. Como resultado se individualizaron 31 transformantes primarios potencialmente transgénicos, se evaluaron y 26 dieron resultados PCR positivos para el gen *Bar*.

Palabras claves: Selección *in vitro*, eficiencia de transformación, regenerantes, tolerancia a herbicida.

Contenido

Abstract	4
Resumen	5
Introducción	7
Materiales y Métodos	12
Material Vegetal	12
Vector de expresión	12
Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
Prueba de respuesta de regenerantes en fosfinotricina	13
Transformación vegetal	13
Resultados y discusión	16
Respuesta de las variedades colombianas de soya a la fosfinotricina	16
Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
Transformación de Soya	18
Análisis de PCR para confirmación de plántulas potencialmente transgénicas	23
Conclusiones	28
Bibliografía	29

Introducción

La soya tiene como centro de origen el norte y centro de china, es sensible a fotoperiodo por lo que requiere de días cortos de luz para entrar en floración y adaptada a latitudes templadas, para que la soya sea cultivada en el trópico, específicamente en la altillanura colombiana, se han desarrollado variedades de soya por métodos de fitomejoramiento convencional (Valencia & Ligarreto, 2010). Las variedades nacionales se desarrollaron teniendo en cuenta varios criterios: rendimiento, precocidad, resistencia a volcamiento, tolerancia a aluminio, eficiencia en la utilización de nutrientes y resistencia a patógenos (Valencia, 2006). El rendimiento máximo que se ha obtenido comercialmente es de 2,95 toneladas por hectárea (2016-A), a pesar de superar la proyección de rendimiento realizada en el 2012 para el 2016, fijada en 2,40 toneladas por hectárea (Fenalce, 2012), se produce menos del 10% de la demanda nacional.

En Colombia la producción de soya del 2015 fue de 62,073 toneladas y en el 2017 de 58,726 (Fenalce, 2017). La producción nacional se usa en su mayoría para la cadena de alimentos balanceados para animales (ABA) dirigido a aves, porcinos y vacunos (SIC, 2009). La producción nacional no es suficiente para esta industria, para abastecer el mercado restante se importan granos de soya principalmente de Estados Unidos. En el 2017 se importaron 538,077 toneladas de grano de soya y 1'322,651 toneladas de torta de soya, usadas para alimentación animal (Fenalce, 2012). Se siembra principalmente en los departamentos de Meta, Vichada y Valle del Cauca (Agronet, 2018), para lograr suplir la demanda nacional es necesario aumentar el área de siembra, incrementar el rendimiento del cultivo y/o aprovechar herramientas biotecnológicas como apoyo al mejoramiento de cultivos introduciendo nuevos rasgos (Vallejo & Estrada, 2002). Las variedades de soya desarrolladas para la altillanura colombiana pueden ser potenciadas con nuevos rasgos, como la tolerancia a herbicidas, rasgo que puede ser conferido por mejoramiento convencional o utilizando transformación genética (Jauhar, 2006).

Algunos investigadores afirman que el uso de soya tolerante a herbicidas ha permitido la adopción de la labranza cero en Argentina, reducir los ciclos de producción, disminuir los costos que representa el control de malezas, aumentar la densidad del cultivo por la disminución del espacio entre surcos, además se obtiene mayor rendimiento por hectárea (Brookes & Barfoot, 2015 y 2017; Carpenter &

Gianessi, 1999). El glifosato ha sido el herbicida más usado por ser el rasgo predominante en los cultivos genéticamente modificados (GM), con un uso estimado de más de 250 millones de toneladas solo en Estados Unidos en 2014 (Duke, 2018). Debido al apareamiento de biotipos de malezas resistentes a glifosato, el glufosinato de amonio se ha propuesto como una alternativa al control de malezas en cultivos GM (Aulakh & Jhala, 2015; Culpepper *et al.*, 2000; Kaur *et al.*, 2014).

El herbicida que hoy se conoce como glufosinato de amonio es un análogo sintético de fosfinitricina (PPT), derivada a su vez de Bialafos que es un proherbicida convertido en fosfinitricina (PPT) al interior de las células (Áy *et al.*, 2012; Sherman *et al.*, 1995), cuya acción herbicida se observó inicialmente en la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. Tachibana & Kaneko (1986) extrajeron y purificaron L-2-amino-4-[(hydroxy) (methyl)phosphinoyl] butyryl-L-alanyl-L-alanine y se examinaron sus efectos en malezas, evidenciando una fuerte actividad herbicida, encontraron que inhibía la biosíntesis de aminoácidos en particular la glutamina, importante para la biosíntesis de ácidos nucleicos y el metabolismo del nitrógeno, también proponen por primera vez que la acción herbicida del bialafos se debía a la inhibición de la Glutamina Sintasa (GS), implicada en el metabolismo del nitrógeno, necesaria para la producción de glutamina y para la detoxificación de amoníaco (Wallsgrove *et al.*, 1983). *S. hygroscopicus* produce el antibiótico bialafos como metabolito secundario, su biosíntesis requiere no menos de 13 pasos de productos intermedios del metabolismo primario en *S. hygroscopicus* y *S. viridochromogenes* (Schinko *et al.*, 2009), partiendo de fosfoenolpiruvato es isomerizado, deshidratado, condensado, acetilado, y adenilado antes de llegar al péptido precursor N-acetil-demetilfosfinitricina tripéptido que es metilado y desacetilado para generar el tripéptido fosfinitricina (Blodgett *et al.*, 2005; Blodgett *et al.*, 2007; Hara *et al.*, 1988; Imai *et al.*, 1985; Metcalf *et al.*, 2009; Murakami *et al.*, 1986; Seto, 1995), tripéptido análogo del ácido L-glutámico con dos residuos de L-alanina (Kondo *et al.*, 1973; Ogawa *et al.* 1973). Wild y Ziegler (1989) demostraron que bialafos tiene un efecto inhibitorio sobre la enzima GS en condiciones *in vivo*, pero no *in vitro*, mientras que la fosfinitricina (PPT) inhibe la enzima en ambos sistemas, concluyeron que el componente activo y con acción herbicida de bialafos es la PPT. El herbicida bialafos se activa al interior de las células, cuando peptidasas remueven los residuos de alanina y liberan la forma activa PPT que se comporta como un inhibidor competitivo de la enzima GS (Bayer *et al.*, 1972; Tachibana *et al.*, 1986; Wild & Ziegler, 1989; Kocher, 1989).

La enzima octomérica GS citoplasmática interviene en la síntesis de glutamina a partir de glutamato y

amonio, para la planta es de vital importancia para la asimilación primaria de nitrógeno inorgánico en las raíces y re-asimilación de amonio producto del recambio proteico (Bernard *et al.*, 2008; Edwards *et al.*, 1990; McNally *et al.*, 1983; Ortega *et al.*, 2001). La inhibición de la enzima GS por parte de la PPT impide la síntesis de los aminoácidos derivados de glutamato y genera que el amonio se acumule, hecho que desencadena inhibición de la biogénesis de clorofila y disminución de la fotosíntesis (Devine *et al.*, 1993; Sauer *et al.*, 1987; Wild & Manderscheid., 1984; Wild *et al.*, 1987). Puritch y Barker (1967) observaron que la toxicidad por amonio resulto en modificaciones morfológicas de los cloroplastos, hinchamiento y desaparición de las láminas de grana, efectos que se pueden revertir al administrar L-glutamina (Sinden & Durbin., 1968).

Según Sauer *et al.* (1987), la toxicidad por amoniaco no es el único factor responsable de la inhibición de la fotosíntesis, ya que proporcionar glutamina evita el deterioro de la fotosíntesis, por lo tanto, la causa debe estar relacionada con el agotamiento de la glutamina, los autores sugieren que la inhibición de la biosíntesis de proteínas, la acumulación tóxica de glioxilato en el ciclo de fotorrespiración y la deficiencia de intermediarios del ciclo de Calvin podrían estar implicados en la inhibición de la fotosíntesis. Todas estas reacciones dan como resultado la muerte de las células que entraron en contacto con el herbicida, que no se extiende a toda la planta por su bajo nivel de translocación (Dröge-Laser *et al.*, 1994).

La tolerancia a herbicidas se puede producir por tres vías: sobre expresión de una enzima nativa, modificación del sitio activo del herbicida o detoxificación del herbicida (Tsafaris, 1996), este último es el caso para PPT. En los cultivos GM se logra la tolerancia al herbicida incorporando los genes *bar* o *pat*. El gen *bar* caracterizado por Thompson *et al.* (1987), fue inicialmente clonado de *S. hygrosopicus* (Murakami *et al.*, 1986), el gen *bar* codifica para una fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) que acetila el grupo NH₂ libre de PPT y evita la autotoxicidad en la bacteria. De Block *et al.* (1987), lograron la expresión del gen *bar* en tabaco, tomate y patata y confirmaron la tolerancia de las plantas a altas dosis del herbicida, y la selección eficiente de la progenie que expresaba el gen. El gen *pat* de *S. viridochromogenes* también codifica para la proteína PAT (Strauch *et al.*, 1988; Wohlleben *et al.*, 1988), e igualmente ha sido usado en diferentes especies para conferirles tolerancia al glufosinato de amonio. Los genes *bar* y *pat* se han integrado al genoma de plantas usando transformación genética (Jauhar & Khush, 2003). Uno de los métodos más usados es el sistema basado en *Agrobacterium tumefaciens* (Díaz & Chaparro-Giraldo., 2012), por no requerir de equipos sofisticados, puede ser usado

en diferentes tipos de tejido, además se obtienen plantas transgénicas con un bajo número de insertos (Hansen & Wright, 1999), Veluthambi *et al.* (2003), indican que una de las ventajas de *Agrobacterium* es la integración precisa de una secuencia de ADN con extremos definidos y la capacidad de transferir segmentos largos de ADN, mayores a 150 kb.

En soya se han identificado algunos factores que afectan la transformación cuando se usa el nudo cotiledonar axilar como explante (Meurer *et al.*, 1998), se encontró variación en la respuesta a una misma cepa de *A. tumefaciens* (Owens & Cress, 1985), y a diferentes cepas (Byrne *et al.*, 1987), es decir que es una variación genotipo dependiente. Otras limitantes son la esterilidad y las aberraciones cromosómicas en transformantes primarios, que han sido asociado con el tiempo en que el explante ha permanecido en condiciones *in vitro*, particularmente al usar suspensión embriogénica de más de un año de cotiledones inmaduros (Singh *et al.*, 1998). Los regenerantes a partir de nudos axilares son menos susceptibles de presentar aberraciones, ya que la regeneración es por la vía de organogénesis directa y tienen menor probabilidad de presentar variación somaclonal (Larkin & Scowcroft, 1981).

El uso incorrecto de los herbicidas favorece la aparición de malezas resistentes, información recogida por el International Survey of Herbicide Resistant Weeds, donde se registraron 42 malezas resistentes especificando el herbicida, el cultivo al que están asociadas y la localidad (Heap, 2018). Para resolver este problema se deben rotar cultivos y herbicidas para evitar el apareamiento de biotipos de malezas resistentes, diseñar una estrategia integrada de control de malezas, acelerar el cierre de surcos y usar cultivos de cobertura para reducir el nacimiento de malezas (INTA, 2015). Una alternativa es ofrecer variedades con tolerancia a herbicidas con diferente modo de acción, como glifosato y glufosinato de amonio. Dentro de los primeros rasgos utilizados comercialmente en cultivos GM es la tolerancia a herbicidas, según ISAAA (2018) existen 32 eventos de soya transgénica con tolerancia a herbicidas, entre ellos glifosato, glufosinato de amonio e imidazolinona. Las patentes que protegen estas tecnologías están caducando (Brookes & Barfoot, 2017), lo que significa que pueden estar en el dominio público (García, 2011). Es por ello por lo que el Grupo de Ingeniería Genética de Plantas (IGP) de la Universidad Nacional de Colombia ha planteado un programa para desarrollar cultivos agrobiogénicos (Jefferson *et al.*, 2015) para la agricultura colombiana, usando tecnología propietaria que está en el dominio público, con resultados obtenidos en la generación de líneas tolerantes a glifosato derivadas de variedades nacionales de soya (Rojas, 2017). En el presente trabajo se busca generar líneas transgénicas tolerante a glufosinato de amonio derivadas de variedades colombianas de soya

mediante transformación genética con *Agrobacterium tumefaciens*, como una de las herramientas para solucionar el problema de malezas resistentes al herbicida glifosato, reportados en los cultivos GM de soya con tolerancia a este herbicida (Papa & Tuesca, 2013).

El objetivo general que se planteó para este trabajo es generar líneas transgénicas derivadas de variedades colombianas de soya tolerante a glufosinato de amonio mediante transformación genética, usando nudos cotiledonares como explantes y la cepa EHA 105. Inicialmente se identificó la concentración óptima del agente de selección fosfinotricina en condiciones *in vitro* para variedades de soya, luego se transformaron los nudos medianteda por *Agrobacterium tumefaciens* incorporando el casete *Bar-IGP*, al que previamente se le hizo un análisis de libertad de operación para evitar infringir derechos de terceros (Jiménez & Chaparro-Giraldo, 2016). En la última fase se confirmaron las potenciales plantas transgénicas mediante PCR, 26 plántulas mostrando el amplicón predicho para el transgén.

Materiales y Métodos

Material Vegetal

Se usaron semillas de variedades colombianas de soya, Panorama P29 (Semillas del Pacífico, Cartago Valle, Colombia) y Soy SK-7 (Semillas Kamerún, Cartago Valle, Colombia) de máximo seis meses de cosechadas. La desinfección de las semillas se realizó con gas cloro durante 16 horas (Di *et al.*,1996; Paz *et al.*, 2006) y se germinaron en agar-agua cinco días a 24 °C bajo un fotoperiodo de 16/8 horas de luz.

Vector de expresión

El vector pCAMBIA 1301 fue modificado para retirarle el gen *hyg R* que confiere resistencia a la higromicina y el gen reportero *GUS*. Al vector se le transfirió el casete de expresión *bar-IGP* de 1562 pb, derivado del gen *bar* de *S hygrosopicus*, con modificación de uso codónico para soya. El gen está gobernado por el promotor FMV (figwort mosaic virus) y tiene el terminador E9. Los primers utilizados para el ensayo de PCR del gen *bar-IGP* fueron FW: GCGTCCTGCCGATATTAGG y RV: TCTGTAACGGGCAATACGG. El amplicón resultante es de 531 pb (Jiménez & Chaparro-Giraldo, 2016).

Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Inicialmente se recuperó el vector pCAMBIA 1301 modificado realizando una extracción de las bacterias *Escherichia coli* DHA5a que contenían el plásmido, se sembraron 20µL de bacterias en 30 mL de medio con kanamicina (50 mg/L) y se incubaron a 37°C durante 12 horas. Posteriormente se llevó a cabo el protocolo de GeneJET Plasmid Miniprep Kit de Thermo Scientific. Para la transformación de las bacterias se sometieron a un proceso para hacerlas electrocompetentes, se partió de un cultivo fresco de la cepa EHA 105 (Hood *et al.*,1993), en un tubo falcón con 30 ml de medio líquido LB estéril, se incubó a 28°C con agitación de 200 rpm, hasta alcanzar una DO600 de 0,5 a 1,0. Después de retirar las bacterias del agitador se mantuvieron en hielo durante 30 minutos y se realizaron sucesivas centrifugaciones de 10 minutos a 400 rpm a 4 °C. En los dos primeros ciclos se retiró el

sobrenadante y reemplazó por 30 mL de agua estéril fría (-4 °C), en el tercer ciclo se resuspendió el pellet con 10 mL de glicerol frío (-4 °C) al 10% y después de la última centrifugación se resuspendió en 1 mL de glicerol frío estéril. Las bacterias se mantuvieron en hielo durante todo el procedimiento.

Finalmente, se transformaron bacterias electrocompetentes de *A. tumefaciens* cepa EHA105 con el vector bar-IGP modificado en el equipo MicroPulser™ (BioRad). En una celda de electroporación se adicionó 1µl del plásmido bar-IGP y 50 µl de bacterias, luego de la electroporación con el programa predeterminado de transformación para *Agrobacterium* (1 pulso de 2,20 kV) se agregó 1mL de caldo LB y se dejaron crecer a 2000 rpm durante tres horas. Pasadas las tres horas se sembraron en cajas Petri con medio LB y Kanamicina (50 mg/L), se incubaron durante tres días a 28 °C. La transformación de las colonias se confirmó por prueba de PCR, posteriormente se resuspendieron y criopreservaron las colonias transformadas.

Prueba de respuesta de regenerantes en fosfinotricina

Para evaluar la respuesta de las variedades de soya SK7 y P29 al herbicida, se realizó un ensayo evaluando tres concentraciones de PPT de 1, 2 y 3 mg/L, basada en las concentraciones reportada por Zhang *et al.* (1999). Para cada concentración se usaron inicialmente 50 semillas de cada variedad. Las semillas se desinfectaron y germinaron en las mismas condiciones que en el ensayo anterior. Los cotiledones se separaron del hipocótilo y radícula, se les realizaron cortes en la unión entre el hipocótilo y el cotiledón y se indujo la regeneración en medio B5 con vitaminas y suplementado con BAP (0,5 mg/L), MES (0,58 g/L), pH de 5,7 y agar (7 g/L) y cada una de las concentraciones de PPT (1, 2 y 3 mg/L). A las dos semanas se renovó el medio y a las 4 semanas se tomaron los resultados, los medios y estrategia de regeneración se adoptaron de Rojas (2017).

Transformación vegetal

Para la transformación de las plantas se siguieron los protocolos de la Universidad de Nebraska–Lincoln (Clemente *et al.*, 2000; Xing *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1999) con ajustes de Rojas (2017). Las semillas se desinfectaron y germinaron en las condiciones ya mencionadas. Se usó el método de meristemo cotiledonar, el cual consiste en usar los cotiledones de semillas de 5 días de germinadas, retirar la testa, cortar el hipocótilo transversalmente 5 mm debajo de los cotiledones, retirar el epicótilo o plúmula, finalmente se separaron los cotiledones longitudinalmente por la base. A los dos explantes se les

realizaron 7 a 12 cortes longitudinales en la cara adaxial entre la unión entre el hipocótilo y el cotiledón. Posteriormente los explantes se sumergieron durante 30 minutos en medio líquido con las bacterias previamente transformadas y se pasaron a medio de co-cultivo B5 con acetosiringona (200 μ M), en el que permanecieron tres días. Pasado este tiempo los explantes se lavaron con cefotaxima (200 mg/L) durante 40 minutos en agitación a 410 rpm (Rojas, 2017).

Los tratamientos se iniciaron con la germinación de 140 semillas, de cada semilla se obtenían dos explantes constituidos por el cotiledón con su meristemo o yema axilar, solo se usaron los cotiledones verdes que exhibían un buen desarrollo y por esto el total de explantes por tratamiento es menor a 280, a los explantes se les realizaron los cortes en la unión entre el hipocótilo y cotiledón, se co-cultivaron con *A. tumefaciens* y se expusieron al herbicida. Para los controles se usaron 70 semillas, a los que se les realizaron los cortes en la unión entre el hipocótilo y cotiledón, pero no fueron inoculados con *A. tumefaciens* y se expusieron al herbicida. Para la selección de los brotes transformados inicialmente se siguió la estrategia indicada por Zhang *et al.* (1999), la fosfinotricina se usó como agente de selección en la regeneración *in vitro* de los brotes. En la primera estrategia al medio de regeneración se adicionó 3 mg/L de fosfinotricina (PPT) para cultivo de tejidos de PhytoTechnology Laboratories®, transcurridas las primeras dos semanas de regeneración de los brotes se renovó el medio y la concentración del herbicida se disminuyó a 1 mg/L. En la segunda estrategia al medio de regeneración se agregó solo 1 mg/L de PPT para cultivo de tejidos de PhytoTechnology después de ser esterilizado con autoclave, se realizaron cuatro ensayos, dos para cada variedad.

Los medios se prepararon siguiendo las indicaciones de Rojas (2017). El medio para regenerar los brotes en ambas estrategias corresponde a medio B5 con vitaminas, BAP (0,5 mg/L), MES (0,58 g/L), pH de 5,7, agar PTC (7 g/L), antibiótico cefotaxime (250 mg/L) y timentina (100 mg/L), con renovación de medio a las dos semanas. Luego de cuatro semanas se inició la fase de elongación de los brotes, se usó medio B5 con vitaminas suplementado con AG3 (0,5 mg/L), AIA (0,1 mg/L), BAP (0,7 mg/L), MES (0,58 g/L), glutamina (50 mg/L), asparagina (50 mg/L), pH de 5,7 y agar PTC (7 g/L). Los regenerantes elongados que alcanzaban dos centímetros se individualizaron y pasaron a medio MS (Murashige & Skoog, 1962) sin reguladores de crecimiento, sin herbicida ni antibióticos, cada una de estas plántulas es potencialmente transformada.

Las plántulas se confirmaron por ensayo de PCR, para ello se realizó extracción de ADN con cloroformo y alcohol isoamílico. Los primers utilizados son los mencionados anteriormente que generan un amplicón de 531 (Jimenez & Chaparro-Giraldo, 2016). Como control del ensayo, se usó el gen de la ubiquitina, primer GmUBI-F 5'-GTGTAATGTTGGATGTGTTCCC-3' y primer GmUBI-R 5'-ACACAATTGAGTTCAACACAAACCG-3' que producen un amplicón de 108 pb (Lin *et al.*, 2016).

Resultados y discusión

Respuesta de las variedades colombianas de soya a la fosfinotricina

La evaluación de la respuesta de regeneración en presencia del herbicida permite identificar cuál es la mejor concentración para realizar la selección en los posteriores ensayos de transformación. Los resultados de regeneración tomados a las cuatro semanas se presentan en la Figura 1. El porcentaje de explantes de brotes disminuyó conforme se aumentó la concentración del herbicida, se presentó una diferencia notable al pasar de 1 mg/L a 2 mg/L. El porcentaje de regeneración en ambas variedades es similar, las respuestas de regeneración basal (0 mg/L de PPT) a partir de nudo cotiledonar de soya alcanzaron el 80%. La regeneración de la variedad SK7 en presencia de 1 mg/L de PPT redujo el porcentaje de regeneración a 63,6% respecto de la variedad P29, en presencia de 2 mg/L se disminuyó drásticamente a 5,8% para SK7 y 7,2% para P29. Al aumentar la concentración de PPT a 3 mg/L no se regeneró ningún explante para la variedad SK7 y P29 sólo presentó 1,4% de explantes con brote.

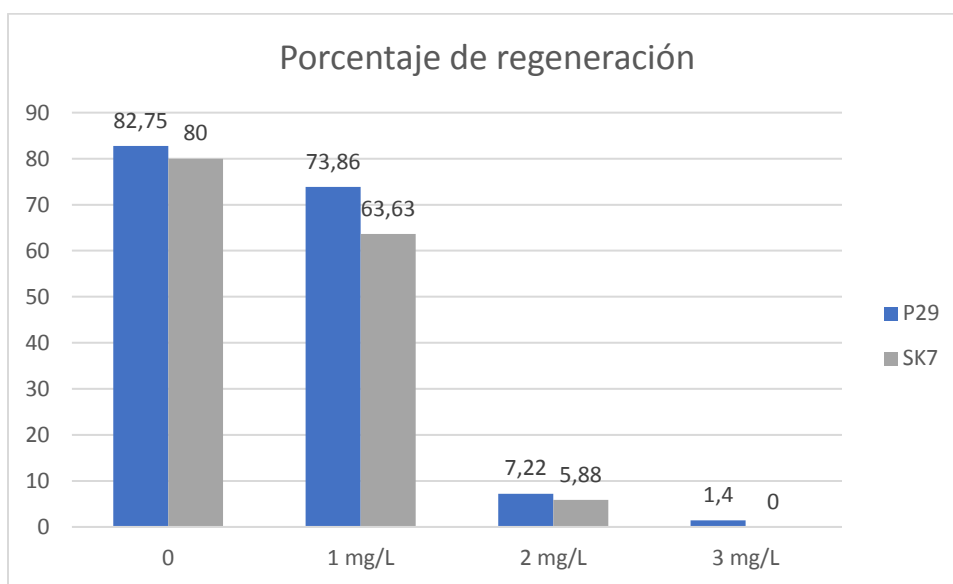


Figura 1. Porcentaje de regeneración in vitro. Explantes con brotes en cada una de las concentraciones evaluadas; 0, 1, 2, y 3 mg/L de PPT de dos variedades colombianas de soya.

Se expusieron los explantes de las variedades de soya a la fosfinotricina (PPT) para cultivo de tejidos de PhytoTechnology para garantizar que la forma activa del herbicida entrara en contacto con los

explantos. La respuesta de regeneración de las variedades estudiadas en presencia del herbicida dependerá de varios factores: la activación del herbicida al eliminar los residuos de alanina y la abundancia de GS al interior de las células, así como la absorción y la traslocación del herbicida, estos determinan la sensibilidad de cada especie al herbicida (Mersey *et al.*, 1990). Cuando todas las enzimas estén bloqueadas por el herbicida, entonces, se empezará a acumular el amoníaco y se desacoplará la fotosíntesis. La selección de los explantes de soya con el herbicida es posible por su translocación a través de la planta, en brotes jóvenes de soya el herbicida se transloca por vía xilema y floema, principalmente por la última vía, que proporciona de 7 a 11 veces más herbicida que la suministrada por vía xilema (Shelp *et al.*, 1992). El uso del herbicida como agente de selección en soya se empleó inicialmente en la universidad de Nebraska (Zhang *et al.*, 1999; Clemente *et al.*, 2000), debido al alto número de escapes en una selección con kanamicina (Hinchee *et al.*, 1988).

Al usar el componente activo del herbicida este actúa rápidamente al llegar a las células ya que no hay necesidad del paso previo para la activación del precursor no tóxico de la PPT, bialafos. La activación es realizada por peptidasas intracelulares que eliminan dos residuos de alanina y liberan la forma activa (Thompson *et al.*, 1987), al no depender de la activación esta podría ser la razón por la que la respuesta de regeneración arroja una concentración menor a la reportada por Zhang *et al.* (1999). Con base en respuesta al herbicida de las variedades estudiadas se seleccionó 3 mg/L de PPT como la mejor concentración para realizar la selección en los ensayos de transformación. Una concentración alta aseguraría una fuerte presión de selección y minimizaría los escapes.

Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

La extracción del plásmido de bacterias de *Escherichia coli* DHA5a realizada con el GeneJET Plasmid Miniprep Kit de Thermo Scientific se verificó mediante análisis por electroforesis en geles de agarosa, que mostró una banda de 11kb (Figura 2.A) correspondiente al tamaño predicho. El plásmido pCAMBIA 1301 modificado no tiene gen de selección vegetal ni gen reportero y contiene únicamente el casete *bar-IGP* en el T-DNA.

El plásmido extraído se usó para la transformación de *A. tumefaciens* cepa EHA 105, las bacterias electrocompetentes fueron electroporadas junto con el vector, se incubaron por 3 horas en medio sin selección con agitación a 2000 rpm, luego se transfirieron a medio sólido de selección con kanamicina

y se incubaron a 28°C, al cabo de tres días se observó el crecimiento de colonias (Figura 2.B). Se tomaron al azar 7 colonias y se realizó prueba de PCR (Figura 2.C), la amplificación se realizó con los primers específicos para el gen *bar* y como control positivo se usó el plásmido (P), resultando en amplicones del tamaño predicho de 531 pb.

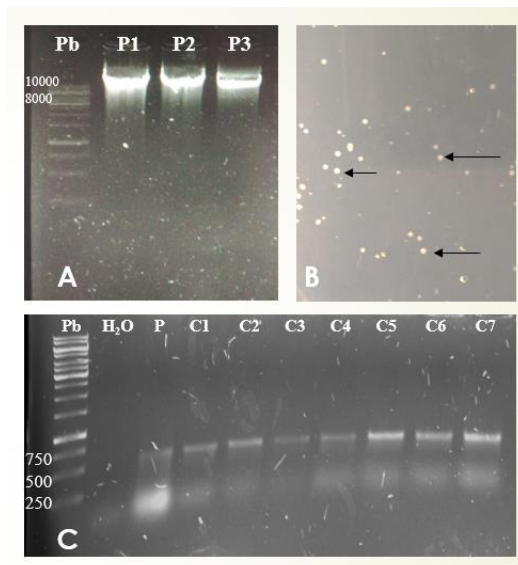


Figura 2. A Plásmido pCAMBIA 1301 de 11 kb B Colonias de *A. tumefaciens* en medio de selección con kanamicina. C Confirmación de siete colonias transformadas (C1 – C7), el control positivo corresponde al plásmido (P), amplicón de 531

La electroporación consiste en aplicar un pulso eléctrico en un pequeño volumen de medio de alta densidad para evitar que las células se revienten, el objetivo es desestabilizar la membrana con el pulso y generar poros por los que ingrese el plásmido (Weaver & Chizmadzhev 1996). Según parámetros del equipo Bio-rad la eficiencia de transformación es óptima cuando la longitud del pulso dura aproximadamente 5 milisegundos. La transformación de siete colonias indica que el proceso para hacer las células competentes las preparó adecuadamente para el pulso eléctrico, los primeros trabajos con electroporación hacían énfasis en los pasos previos (Mattanovich *et al.*, 1989; Shen & Forde, 1989) y aunque la eficiencia de transformación puede variar entre cepas (Nagel *et al.*, 1990) se puede lograr realizando variaciones para hacerlas competentes.

Transformación de Soya

El material vegetal se sometió al proceso de inoculación y co-cultivo después de cinco días de germinación en condiciones *in vitro*, las semillas tenían seis meses de cosechadas, de esta forma la germinación y respuesta de regeneración no se vería afectada por la pérdida de vigor, sino que su

comportamiento estaría relacionado con la presencia del herbicida. La probabilidad de variación somaclonal disminuye por dos factores, el nudo cotiledonar como explante favorece a que la regeneración sea por vía de organogénesis directa, y la semilla recientemente cosechada y con poco tiempo en condiciones *in vitro* (Larkin & Scowcroft, 1981). Con los primeros ensayos de transformación se siguió la estrategia de selección de Zhang *et al.* (1999) al igual que los medios y etapas para el desarrollo de los brotes (Figura 4). La regeneración se empezó con una alta concentración del herbicida en el medio y se disminuyó a las dos semanas. Tomando como precedente la respuesta de las variedades a la fosfotricina en condiciones *in vitro*, se inició la regeneración con 3 mg/L de PPT y se redujo a 1 mg/L en la segunda etapa de regeneración, se retiró completamente al iniciar la fase de elongación. El resultado del desarrollo con 3 mg/L de PPT en las primeras dos semanas de regeneración fue que el 30,38% de los explantes generaron brotes, en las semanas tercera y cuarta de regeneración con 1 mg/L de PPT el 35,76% de los explantes generaron brotes. Resultados similares obtuvo Zeng *et al.* (2004), quienes usaron en la selección concentraciones de hasta 10 mg/L de glufosinato y al culminar la primera fase de regeneración obtuvieron un porcentaje de regeneración del 27,9%. Zhang *et al.* (1999) reportan 85% de regeneración con una selección de 3,3 mg/L de glufosinato. Las concentraciones reportadas en este trabajo son menores debido a que se utilizó PPT, la forma activa del herbicida y esta podría ser la razón de que el porcentaje de regeneración sea mucho menor al reportado por otros autores a pesar de usar concentraciones bajas del herbicida.

Al llegar a la fase de elongación se retiraron los explantes que no habían generado brotes, ya fuera por oxidación, generación de callo vítreo o que evidenciaron que el meristemo no fue segmentado (Figura 3). Al culminar las primeras dos semanas de elongación se encontró con que sólo sobrevivió el 15,76 de los explantes con brote, la mitad se habían secado por acción residual del herbicida. Al terminar la elongación solo quedaron el 5% de los explantes que habían regenerado. Con varios ensayos se presentó el mismo fenómeno, una vez que los brotes llegaban a la etapa de elongación y se les retiraba por completo el herbicida, el brote se empezaban a secar y no culminaban con éxito su desarrollo. Este hecho causó la pérdida total de varios ensayos de transformación. Este resultado podría presentarse por una acción residual del herbicida, pero también hay otros factores que están interviniendo: la regeneración de explantes es genotipo dependiente, el tipo de explante, la edad del explante y los reguladores de crecimiento (Cheng *et al.*, 2011).

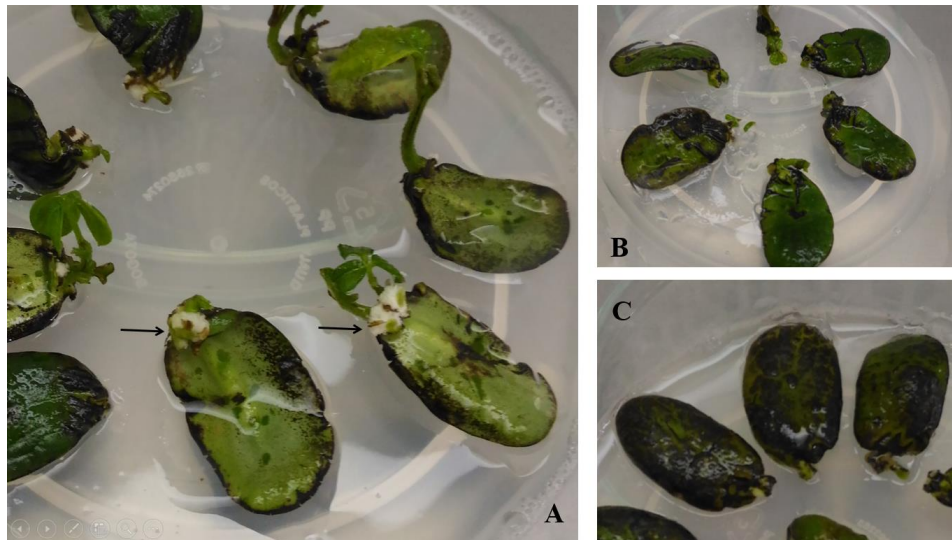


Figura 3. Explantes en medio de selección con 3 mg/L de PPT. **A** con las flechas se indica la presencia de callo vítreo. **B** ausencia de regeneración de brotes. **C** Oxidación de los explantes.

La oxidación de los explantes es un problema frecuente en la transformación de soya, se atribuye a la activación de ROS como respuesta al daño celular o la alteración de vías metabólicas (Dan *et al.*, 2009), esto explica la oxidación temprana de los explantes (Figura 3.C). Yang *et al.* (2016) señalan que la oxidación es efecto del cocultivo con *Agrobacterium* e indican que la adición de antioxidantes al medio alivia la necrosis de los explantes y mejora la eficiencia de transformación. Esto indicaría que la pérdida de los ensayos con 3 mg/L de PPT es producto del efecto combinado del cocultivo con *Agrobacterium* y un alto nivel de selección con el componente activo del herbicida.

Recientemente se encontró que la enzima PAT tiene una actividad inespecífica, acetila dos aminoácidos generando acetyl-aminoadipato y acetyl-triptofano, los autores hipotetizaron que la acumulación ectópica de estos metabolitos podría estar relacionada con la reducción de la aptitud biológica y niveles modificados de aminoácidos en líneas transgénicas con alta expresión de *Bar* (Christ *et al.*, 2017), en cebada ya se ha asociado una disminución de la aptitud biológica con la alta actividad de la PAT (Brown *et al.*, 2013). Es posible que la enzima PAT dirigiera su actividad a otros aminoácidos en ausencia de la PPT, podría explicar por qué los explantes se secaron al retirar el herbicida del medio.

Teniendo en cuenta la pérdida de tantos brotes, la estrategia de selección se modificó, en ensayos posteriores en regeneración solo se agregó al medio 1mg/L de PPT. Con este cambio la regeneración

aumento y se disminuyó los brotes que se secaban al eliminar el herbicida del medio. La modificación podría afectar la eficiencia de la selección, fundamental en un método de transformación óptimo (Olhoft *et al.*, 2003; Soybase, 2000). Además de la disminución de la concentración del herbicida en el medio de regeneración, hay que tener en cuenta que el glufosinato de amonio se caracteriza por tener acción por contacto y sistémica reducida, y dado que el herbicida se encuentra en el medio depende únicamente de la translocación, que se realiza por xilema y principalmente floema (Shelp *et al.*, 1992).

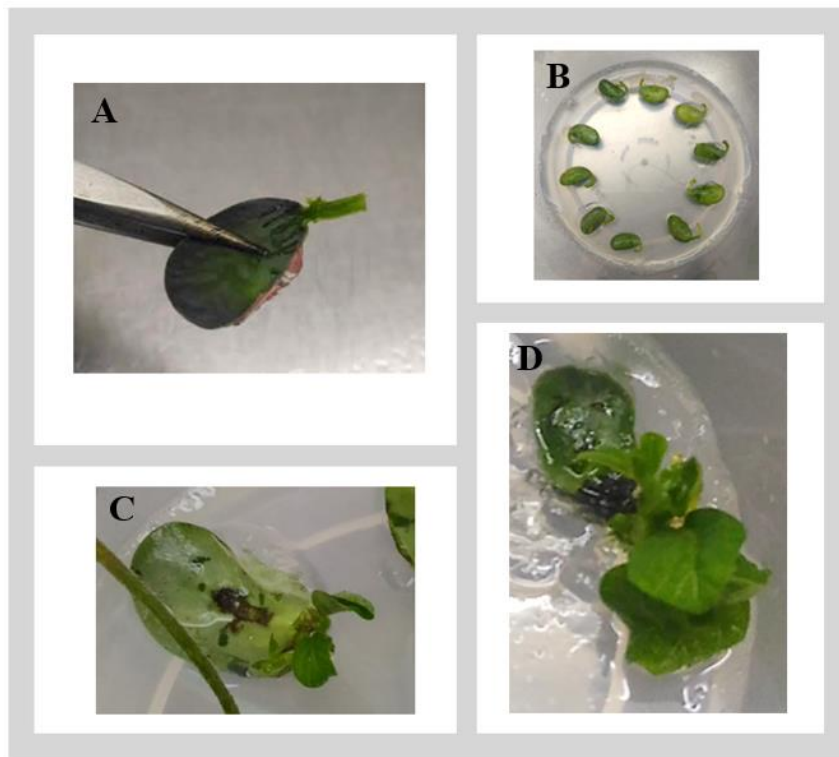


Figura 4. Etapas transformación y desarrollo de soja en condiciones *in vitro*. **A** Preparación del explante con cortes longitudinales previo a la inoculación con *Agrobacterium*. **B** Co-cultivo de tres días. **C** Primeras dos semanas de regeneración en medio con herbicida, los brotes empiezan a crecer desde el meristemo segmentado. **D** Explante con varios brotes iniciando la etapa de elongación en ausencia del herbicida.

Con la modificación en el sistema de selección se realizaron dos ensayos de transformación para cada variedad. Todos los ensayos se iniciaron con 140 semillas, lo que supondrían 280 explantes por ensayo, pero dado que no todas las semillas germinaron ni todos los explantes presentaron un óptimo desarrollo, debido a que el material viene de campo y por el manejo manual y cosecha las semillas pueden sufrir heridas que afectan su posterior desarrollo, el número inicial de explantes para cada ensayo varió. Los

medios y etapas de regeneración y elongación (Figura 4) se llevaron a cabo igual que en los primeros ensayos.

Tabla 1. Porcentaje de explantes con brote en cada fase de crecimiento

Semanas	Regeneración		Elongación	
	1 y 2	3 y 4	5 y 6	7 y 8
Fosfinotricina	1 mg/L	1 mg/L	-	-
SK7	27,23%	29,96%	24,90%	17,50%
	36,57%	78,21%	45,13%	30,35%
Control	57%	42,85%	8,57%	4,25%
P29	25%	31,86%	28,92%	17,15%
	64,18%	54,88%	15,34%	10,23%
Control	44,28%	38,57%	15,71%	7,14%

Se observó que el porcentaje de regeneración tenía un comportamiento similar a los ensayos con 3 mg/L. En la segunda fase de regeneración (semanas 3 y 4) los explantes con brote de SK7 aumentaron considerablemente, mientras que en la variedad P29 no sucedió (Tabla 1). Al finalizar la fase de elongación dos (semanas 7 y 8) la variedad SK7 terminó con un mayor porcentaje de brotes en uno de los ensayos, 30,35% la variedad P29 obtuvo 20% menos. El comportamiento de la variedad SK7 respecto de P29 es similar al reportado por Rojas (2017). Sin embargo, aunque los datos sugieran que la variedad P29 tuvo un desempeño ligeramente menor al de SK7, fenotípicamente los brotes de P29 tenían un mayor tamaño y un desarrollo más vigoroso, esto se refleja en que las primeras plántulas potencialmente transgénicas individualizadas fueron de P29.

Análisis de PCR para confirmación de plántulas potencialmente transgénicas

Como resultado de los cuatro ensayos de transformación con selección de 1 mg/L de PPT se individualizó un total de 31 plántulas, Para determinar la presencia o ausencia del transgén en las plántulas individualizadas se realizó extracción de ADN para analizar por PCR. Se tomaron hojas de plántulas con más de 2 nudos con hojas para no comprometer su desarrollo (Figura 5). Finalizada la fase de elongación se habían individualizado 31 plántulas correspondientes a cuatro ensayos de transformación: 16 plántulas de SK7 (Identificados en la Figura 7 como 6, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32,34 y 37) y 15 de Panorama P29 (Identificados en la Figura 6 como 1, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 33, 35 y 38)



Figura 5. Plántulas potencialmente transgénicas de soya, las plántulas son resultado de un proceso de co-cultivo, cuatro semanas de regeneración en presencia del herbicida (1mg/L) y hasta seis semanas de elongación.

Tras la extracción con cloroformo y cuantificación de ADN en nanodrop, se procedió a realizar las pruebas de PCR. Se confirmó que el ADN extraído correspondiera a una muestra vegetal en óptimas condiciones, se realizó una prueba de PCR para el gen de ubiquitina (Figura 6.A y 7.A) de esta forma se aseguró la integridad del ADN, se usó como marcador de peso GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder

(Thermo Scientific) y el amplicón es de 108 pb. Los resultados indican que las muestras si corresponden a ADN vegetal.

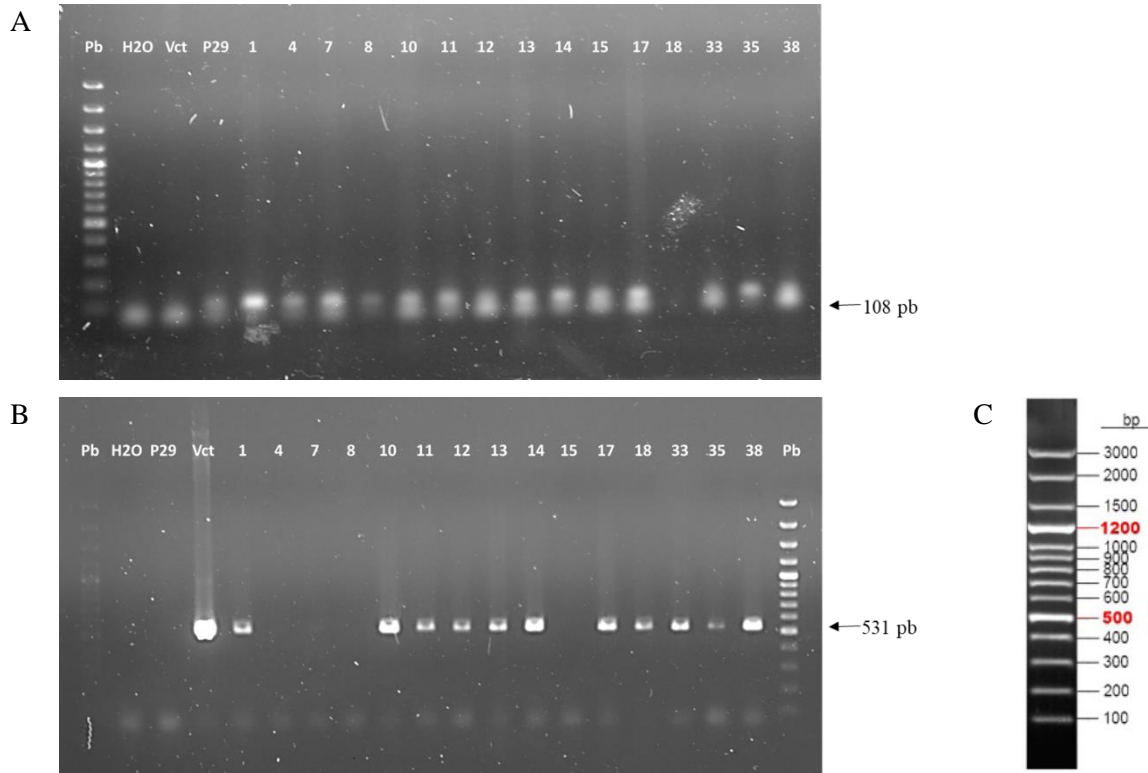


Figura 6 Detección de transgén bar en plántulas regeneradas de la variedad Panorama P29 de soya transformadas. **A** visualización de prueba de PCR para ubiquitina. **B** visualización de prueba de PCR para gen bar. **C** escala gen ruler 100pb **Pb** corresponde al marcador de peso molecular, **H₂O** control interno del ensayo de PCR, **Vct** el plásmido bar-IGP como control positivo para la amplificación del gen bar, **P29** corresponde a muestra de la variedad sin transformar y se utilizó como control positivo para ubiquitina. Las muestras de las plántulas se enumeran de acuerdo con el orden de individualización.

A continuación, se realizó el gel para observar los resultados de la prueba de PCR para el gen bar (Figuras 6.B y 7B) como control positivo se usó el plásmido pCAMBIA 1301 con el gen Bar-IGP y como control negativo ADN de plantas sin transformar, este control se realiza para identificar que las variedades no contengan el transgén, y la ausencia de cualquier otro amplicón indica que no hay una unión inespecífica de los primers. Las muestras de ADN vegetales dieron resultados PCR positivos para la ubiquitina (Figura 6.A y 7.A).

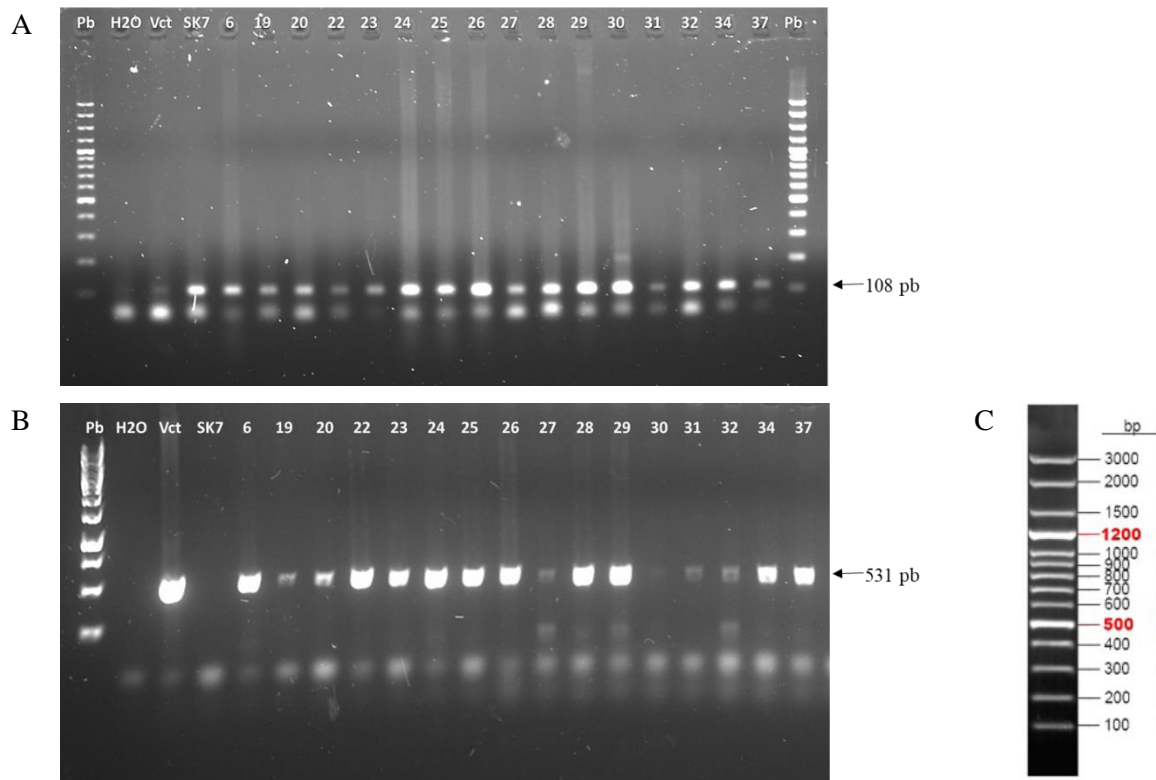


Figura 7 Detección de transgén *bar* en plántulas regeneradas de la variedad SF7 de soja transformadas. **A** visualización de prueba de PCR para ubiquitina. **B** visualización de prueba de PCR para gen *bar*. **C** escala gen ruler 100pb **Pb** corresponde al marcador de peso molecular, **H₂O** control interno del ensayo de PCR, **Vct** el plásmido *bar*-IGP como control positivo para la amplificación del gen *bar*, **SK7** corresponde a muestra de la variedad sin transformar y se utilizó como control positivo para ubiquitina. Las muestras de las plántulas se enumeran de acuerdo con el orden de individualización

En el análisis para el gen *bar* de las 16 plántulas de SK7 15 indicaron que contienen el transgén, en cuanto a Panorama P29 11 plántulas dieron resultados positivos y cuatro no presentan el transgén, una de ellas (muestra 4) tampoco amplificó en gen de la ubiquitina, esto indica que hay inhibidores de la PCR que no se retiraron por completo al realizar la extracción de ADN y es necesario repetir la extracción para determinar si la plántula tiene el gen. Otras bandas como las correspondientes a las muestras 13 y 17 son muy tenues en comparación con las otras, puede deberse a la concentración del ADN, y se consideran PCR positivas.

Los resultados positivos de estas plántulas transgénicas son consecuencia de tres procesos indispensables en la misma célula: el casete de expresión fue transferido al interior de la célula; el casete de expresión se integró al DNA celular y se regeneró una planta, a partir de la célula en la que han ocurrido los dos procesos anteriores (Díaz *et al.*, 2004). Las plántulas con resultados positivos habría que evaluarlas para identificar la expresión de la proteína PAT y ratificar la tolerancia al herbicida

mediante *leaf painting*. Es importante identificar el nivel de expresión porque se puede presentar una variación entre transformantes debido al número de copias y el efecto de posición (De Block *et al.*, 1987).

La transformación genética es una herramienta que ha permitido superar las barreras de la incompatibilidad sexual y la fertilidad entre diferentes especies, géneros e incluso reinos (Vasil, 2008), las plántulas de soya tolerantes a glufosinato de amonio generadas en este trabajo podrían ayudar a un mejor manejo de malezas en campo y facilitar el trabajo para los agricultores. De esta forma se cumpliría la misión de la ingeniería genética; técnicas complementarias con los procedimientos del mejoramiento genético convencional (Jauhar, 2006; Livermore, 2002).

Detrás del éxito en la transformación genética hay una serie de procesos rigurosos y en ocasiones complicados que involucra varias etapas: identificación y aislamiento del gen de interés, desarrollo del casete de expresión o construcción quimérica, vectores apropiados que permitan el clonaje o transferencia de la construcción quimérica, método para la introducción del DNA de manera estable en el genoma de la célula vegetal (protocolo de transformación), sistema de cultivo de tejidos que permita regenerar plantas completas, procedimiento para la distinción de los individuos transformados de aquellos no transgénicos (selección de transformantes) y métodos analíticos para detectar el gene foráneo y sus productos en la planta transformada (Díaz *et al.* 2004; Larik *et al.* 2004; Jauhar, 2006).

De los procesos anteriormente mencionados, la selección actúa como un fuerte tamiz para impedir el crecimiento de brotes que no contengan el transgén. Los resultados positivos indican que la modificación de concentración de la PPT de 3 mg/L a 1 mg/L no implicó una disminución en la selección, no se favoreció la regeneración de plantas sin transformar. Teniendo en cuenta las plantas PCR positivas, la eficiencia de transformación en la variedad P29 es de 2,62% y una frecuencia de transformación de 6,01% (Tabla 3), frecuencia mucho más alta que la reportada por Zhang *et al.* (1999) que corresponde a 3%. En comparación con Zeng *et al.* (2004) los resultados son similares, los autores reportaron 5,9% de frecuencia de transformación en una selección con glufosinato de 8 mg/L durante toda la fase de regeneración. En cuanto a la eficiencia de transformación Paz *et al.* (2004) reporta un rango similar de 2,0% a 6,3% usando 6 mg/L de glufosinato durante la regeneración de brotes, la eficiencia de

transformación presentados para las variedades colombianas SK7 y P29 usando 1 mg/L de PPT son de 2,91% y 2,62% respectivamente.

	Ecuación	SK7	P29
Eficiencia de transformación	$\frac{\# \text{ plantas PCR}^+}{\# \text{ explantes co - cultivados}} \times 100$	$\frac{15}{514} \times 100 = 2,91\%$	$\frac{11}{419} \times 100 = 2,62\%$
Frecuencia de transformación	$\frac{\# \text{ plantas PCR}^+}{\# \text{ Explantes con brote}} \times 100$	$\frac{15}{278} \times 100 = 5,39\%$	$\frac{11}{183} \times 100 = 6,01\%$

Tabla 3. Ecuaciones y cálculo para eficiencia y frecuencia de transformación de las variedades SK7 y P29

Otros autores que reportan haber usado PPT como agente de selección en la transformación de nudo cotiledonar indican haber utilizado concentraciones más bajas respecto de los reportes en los que se empleó glufosinato. Dang & Wei (2007) usaron una concentración máxima de 1 mg/L de PPT con una frecuencia de transformación de 4.29% a 16.67%. Olhoft & Somers (2001) indican haber usado 1.33, 3.33 ó 5.0 mg/L de PPT con una baja eficiencia de transformación de 0,9%. Xue *et al.* (2006) reportan una concentración de 3 ó 5 mg/L y una eficiencia de transformación de 12%. Los resultados finales en la eficiencia de transformación de estos reportes también están influenciados por variaciones en los protocolos como el uso de L-cisteína y transformación asistida por multi aguja. En cuanto a las concentraciones de PPT no superan los 5mg/L, que corresponde a la mitad de la máxima reportada usando glufosinato (Zeng *et al.*, 2004).

Conclusiones

El uso de PPT como agente de selección en la transformación de nudo cotiledonar de soja es eficiente para la obtención de plantas genéticamente modificadas tolerantes al herbicida glufosinato de amonio. La regeneración y selección en la transformación de las variedades colombianas SK7 y P29 a partir de nudo cotiledones con PPT es efectiva con una concentración de 1 mg/L. La metodología planteada fue efectiva, el tipo de explante usado y el gen de interés como marcador de selección permitieron obtener plántulas con el transgén para ambas variedades. Los medios y protocolos de transformación y regeneración reportados por Rojas (2017) se ratifican en este trabajo para la transformación de soja medida por *Agrobacterium* y en otro contexto biológico por tratarse de otro gen y marcador de selección. La pérdida de los ensayos con 3 mg/L de PPT es producto del efecto combinado del cocultivo con *Agrobacterium* y un alto nivel de selección con el componente activo del herbicida. Teniendo en cuenta los resultados de eficiencia y frecuencia de transformación y comparándolos con otros autores se puede determinar que los resultados son similares, y para obtenerlos se utilizó una concentración menor de la forma activa del herbicida. Si bien la respuesta a la transformación y al proceso de regeneración en condiciones in vitro son genotipo dependiente, en este trabajo se observó un comportamiento similar a las diferentes fases de desarrollo e igualmente arrojaron una eficiencia y frecuencia de transformación parecidas. Las plántulas que contiene el transgén deben ser caracterizadas en posteriores estudios para lograr que se entregue a los cultivadores una variedad esencialmente derivada y con biotecnología sin ninguna carga de patentes.

Bibliografía

Agronet, M. I. N. A. G. R. O. (2018). Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. República de Colombia. <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>

Aulakh, J. S., & Jhala, A. J. (2015). Comparison of glufosinate-based herbicide programs for broad-spectrum weed control in glufosinate-resistant soybean. *Weed Technology*, 29(3), 419-430

Áy, Z., Mihály, R., Cserhádi, M., Kótai, É., & Pauk, J. (2012). The effect of high concentrations of glufosinate ammonium on the yield components of transgenic spring wheat (*Triticum aestivum* L.) constitutively expressing the bar gene. *The Scientific World Journal*, 2012.

Bayer, V. E., Gugel, K. H., Hägele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S., König, W. A., & Zähler, H. (1972). Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 98. Mitteilung. Phosphinothricin und Phosphinothricyl- Alanyl- Alanin. *Helvetica Chimica Acta*, 55(1), 224-239.

Bernard, S. M., Møller, A. L. B., Dionisio, G., Kichey, T., Jahn, T. P., Dubois, F., ... & Parry, M. A. (2008). Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant molecular biology*, 67(1-2), 89-105.

Blodgett, J. A., Thomas, P. M., Li, G., Velasquez, J. E., Van Der Donk, W. A., Kelleher, N. L., & Metcalf, W. W. (2007). Unusual transformations in the biosynthesis of the antibiotic phosphinothricin tripeptide. *Nature chemical biology*, 3(8), 480-485.

Blodgett, J.A., Zhang, J., & Metcalf, W.W. (2005). Molecular cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the phosphinothricin tripeptide biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49 1, 230-40.

Brookes, G., & Barfoot, P. (2015). Global income and production impacts of using GM crops technology 1996 – 2013. *GM Crops & Food*. 6, 13-146.

Brookes, G., & Barfoot, P. (2017). Farm income and production impacts of using GM crop technology 1996–2015. *GM crops & food*, 8(3), 156-193

Brown, R. H., Raboy, V., & Bregitzer, P. (2013). Unintended consequences: high phosphinothricin acetyltransferase activity related to reduced fitness in barley. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(3), 240-247.

Byrne, M. C., McDonnell, R. E., Wright, M. S., & Carnes, M. G. (1987). Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium*-soybean interaction. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8(1), 3-15.

Carpenter, J., & Gianessi, L. (1999). Herbicide tolerant soybeans: Why growers are adopting Roundup Ready varieties.

Cera GM Crop Database. <http://www.cera-gmc.org/GM%20Crop%20Database>

Cheng, M., Chang, Y. F., Olhoft, P. M., Cardoza, V., Lai, F. M., Jones, T. J., & Wenck, A. R. (2011). Cells/tissues conditioning for facilitating T-DNA delivery. Dan. Y, Ow. DW, editors. Historical technology developments in plant transformation. Sharjah: Bentham Science Publishers Ltd, 77-107.

Cheng, T. Y., Saka, H., & Voqui-Dinh, T. H. (1980). Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. *Plant Science Letters*, 19(2), 91-99.

Christ, B., Hochstrasser, R., Guyer, L., Francisco, R., Aubry, S., Hörtensteiner, S., & Weng, J. K. (2017). Non-specific activities of the major herbicide-resistance gene BAR. *Nature plants*, 3(12), 937.

Clemente, T. E., LaVallee, B. J., Howe, A. R., Conner-Ward, D., Rozman, R. J., Hunter, P. E., ... & Hinchee, M. A. (2000). Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from Agrobacterium-mediated transformation. *Crop Science*, 40(3), 797-803

Culpepper, A. S., York, A. C., Batts, R. B., & Jennings, K. M. (2000). Weed management in glufosinate-and glyphosate-resistant soybean (*Glycine max*). *Weed Technology*, 14(1), 77-88.

Dan, Y., Armstrong, C. L., Dong, J., Feng, X., Fry, J. E., Keithly, G. E., ... & Duncan, D. R. (2009). Lipoic acid—an unique plant transformation enhancer. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(6), 630.

Dang, W., & Wei, Z. M. (2007). An optimized Agrobacterium-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes. *Plant Science*, 173(4), 381-389.

DasSarma, S., Tischer, E., & Goodman, H. M. (1986). Plant glutamine synthetase complements a glnA mutation in *Escherichia coli*. *Science*, 232(4755), 1242-1244.

Devine MS, Duke O, Fedtke C (1993) Inhibition of amino acid biosynthesis. Pages 252–263 in *Physiology of Herbicide Action*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

D'Halluin K, DeBlock M, Denecke J, Janssens J, Leemans J & Reynaerts A (1992) The bar gene as a selectable and screenable marker in plant engineering. *Methods Enzymol*. 216: 415–426

Díaz, M., Zappacosta, D., Franzone, P., & Ríos, R. (2004). Transformación genética, Parte III, Capítulo 3. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina.

Díaz Granados, C., & Chaparro-Giraldo, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 49-61.

Di R, Purcell V, Collins GB & Ghabrial SA (1996) Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle viruscoat protein precursor gene. *Plant Cell Rep.* 15: 746–750

De Block, M., Botterman, J., Vandewiele, M., Dockx, J., Thoen, C., Gossele, V., ... & Leemans, J. (1987). Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *The EMBO journal*, 6(9), 2513-2518.

Donn, G., Tischer, E., Smith, J. A., & Goodman, H. M. (1984). Herbicide-resistant alfalfa cells: an example of gene amplification in plants. *Journal of molecular and applied genetics*, 2(6), 621-635.

Dröge, W., Broer, I., & Pühler, A. (1992). Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta*, 187(1), 142-151

Dröge-Laser, W., Siemeling, U., Pühler, A., & Broer, I. (1994). The metabolites of the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate): identification, stability, and mobility in transgenic, herbicide-resistant, and untransformed plants. *Plant Physiology*, 159-166.

Duke, S. O. (2018). The history and current status of glyphosate. *Pest management science*, 74(5), 1027-1034.

Edwards, J. W., Walker, E. L., & Coruzzi, G. M. (1990). Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(9), 3459-3463.

Eisenberg, D., Gill, H. S., Pfluegl, G. M., & Rotstein, S. H. (2000). Structure–function relationships of glutamine synthetases1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477(1-2), 122-145

Fenalce. Expectativas de siembra para maíz y soya en 2022. 2012 (http://www.fenalce.org/nueva/plantillas/arch_down_load/PMaizySoya2022.pdf)

Fenalce, Departamento económico y apoyo a la comercialización. Indicadores Cerealistas. 2017 <http://www.fenalce.org/archivos/Indicadorcerealista2017.pdf>

García, E. R. (2011). Estudio sobre patentes y dominio público. *Rev. Prop. Inmaterial*, 15, 127.

Hansen, G., & Wright, M. S. (1999). Recent advances in the transformation of plants. *Trends in plant science*, 4(6), 226-231.

Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Monday, May 28, 2018. Available <http://weedsociety.org/Summary/MOA.aspx?MOAID=12>

Hinchee, M. A., Connor-Ward, D. V., Newell, C. A., McDonnell, R. E., Sato, S. J., Gasser, C. S., ... & Horsch, R. B. (1988). Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Nature Biotechnology*, 6(8), 915.

Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S., & Hoekema, A. (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic research*, 2(4), 208-218.

Imai, S., Seto, H., Sasaki, T., Tsuruoka, T., Ogawa, H., Satoh, A., ... & Otake, N. (1985). Studies on the biosynthesis of bialaphos (SF-1293). 6. Production of N-acetyldemethylphosphinothricin and N-acetylbialaphos by blocked mutants of *Streptomyces hygroscopicus* SF-1293 and their roles in the biosynthesis of bialaphos. *The Journal of antibiotics*, 38(5), 687-690.

INTA, (2015). Claves para controlar las malezas resistentes. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=26308#comments>

ISAAA, G. (2018). Approval Database. Int. Serv. Acquis. Agri-biotech Appl. <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/advsearch/default.asp?CropID=19&TraitTypeID=1&DeveloperID=Any&CountryID=Any&ApprovalTypeID=Any>

Jauhar, P. P. (2006). Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: the prospects and challenges. *Crop science*, 46(4), 1841-1859.

Jauhar, P. P., & Khush, G. S. (2003). Importance of biotechnology in global food security. *Food security and environmental quality in the developing world*, 107-128.

Jefferson, D. J., Graff, G. D., Chi-Ham, C. L., & Bennett, A. B. (2015). The emergence of agbiogenics. *Nature biotechnology*, 33(8), 819.

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

Kaur, S., Sandell, L. D., Lindquist, J. L., & Jhala, A. J. (2014). Glyphosate-resistant giant ragweed (*Ambrosia trifida*) control in glufosinate-resistant soybean. *Weed technology*, 28(4), 569-577

Kocher, H. (1989). Inhibitors of glutamine synthetase and their effects in plants. Monograph British Crop Protection Council.

Komoča, D., & Sandermann Jr, H. (1992). Plant metabolism of herbicides with C • P bonds: Phosphinothricin. *Pesticide biochemistry and physiology*, 43(2), 95-102.

Kondo Y, Shomura T, Ogawa Y, Tsuruoka T, Watanabe H, Totukawa K, Suzuki T, Moriyama C, Yoshida J, Inouye S, Niida T (1973) Studies on a new antibiotic SF-1293. 1. Isolation and physico-chemical and biological characterization of SF-1293 substances. *Sci Rep Meiji Seika* 13:34–41

Larkin, P. J., & Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and applied Genetics*, 60(4), 197-214.

Lin, J., Mazarei, M., Zhao, N., Hatcher, C. N., Wuddineh, W. A., Rudis, M., ... & Chen, F. (2016). Transgenic soybean overexpressing GmSAMT1 exhibits resistance to multiple- HG types of soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Plant biotechnology journal*, 14(11), 2100-2109.

Livermore, M. (2002). The role of modern biotechnology in developing country agriculture. *Nutrition Bulletin*, 27(1), 47-50

Mattanovich, D., Rüker, F., Machado, A. D. C., Laimer, M., Regner, F., Steinkellner, H., ... & Katinger, H. (1989). Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by electroporation. *Nucleic Acids Research*, 17(16), 6747.

McNally, S. F., Hirel, B., Gadal, P., Mann, A. F., & Stewart, G. R. (1983). Glutamine synthetases of higher plants: evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. *Plant Physiology*, 72(1), 22-25.

Mersey, B. G., Hall, J. C., Anderson, D. M., & Swanton, C. J. (1990). Factors affecting the herbicidal activity of glufosinate-ammonium: absorption, translocation, and metabolism in barley and green foxtail. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 37(1), 90-98.

Metcalf, W. W., & Van Der Donk, W. A. (2009). Biosynthesis of phosphonic and phosphinic acid natural products. *Annual review of biochemistry*, 78, 65-94.

Meurer, C. A., Dinkins, R. D., & Collins, G. B. (1998). Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. *Plant Cell Reports*, 18(3-4), 180-186.

- Murakami, T., Anzai, H., Imai, S., Satoh, A., Nagaoka, K., & Thompson, C. J. (1986). The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: Molecular cloning and characterization of the gene cluster. *Molecular and General Genetics MGG*, 205(1), 42-53.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nagel, R., Elliott, A., Masel, A., Birch, R. G., & Manners, J. M. (1990). Electroporation of binary Ti plasmid vector into *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *FEMS Microbiology Letters*, 67(3), 325-328.
- Ogawa Y, Tsuruoka T, Inouye S, Niida T (1973) Studies on a new antibiotic SF-1293. *Sci Rep Meiji Seika* 13:42-48
- Olhoft, P. M., Flagel, L. E., Donovan, C. M., & Somers, D. A. (2003). Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta*, 216(5), 723-735.
- Olhoft, P., & Somers, D. (2001). L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Reports*, 20(8), 706-711
- Ortega, J. L., Temple, S. J., & Sengupta-Gopalan, C. (2001). Constitutive overexpression of cytosolic glutamine synthetase (GS1) gene in transgenic alfalfa demonstrates that GS1 may be regulated at the level of RNA stability and protein turnover. *Plant Physiology*, 126(1), 109-121.
- Owens, L. D., & Cress, D. E. (1985). Genotypic variability of soybean response to *Agrobacterium* strains harboring the Ti or Ri plasmids. *Plant Physiology*, 77(1), 87-94.
- Padgett, S. R., Kolacz, K. H., Delannay, X., Re, D. B., LaVallee, B. J., Tinius, C. N., ... & Peschke, V. M. (1995). Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop science*, 35(5), 1451-1461.
- Papa, J. C., & Tuesca, D. (2013). Los problemas actuales de malezas en la región sojera nucleo argentina. origen y alternativas de manejo. Viabilidad del glifosato en sistemas productivos sustentables.
- Paz, M. M., Shou, H., Guo, Z., Zhang, Z., Banerjee, A. K., & Wang, K. (2004). Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica*, 136(2), 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.

Petersen, J., & Hurle, K. (2001). Influence of climatic conditions and plant physiology on glufosinate-ammonium efficacy. *Weed Research*, 41(1), 31-39.

Puritch, G. S., & Barker, A. V. (1967). Structure and function of tomato leaf chloroplasts during ammonium toxicity. *Plant Physiology*, 42(9), 1229-1238.

Rajasekaran, K., Majumdar, R., Sickler, C., Wei, Q., Cary, J., & Bhatnagar, D. (2017). Fidelity of a simple liberty leaf-painting assay to validate transgenic maize plants expressing the selectable marker gene, bar. *Journal of Crop Improvement*, 31(4), 628-636.

Rojas, A. C. (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 (Tesis doctoral) Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Sauer, H., Wild, A., & Rühle, W. (1987). The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis II. The causes of inhibition of photosynthesis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 42(3), 270-278.

Schinko, E., Schad, K., Eys, S., Keller, U., & Wohlleben, W. (2009). Phosphinothricin-tripeptide biosynthesis: an original version of bacterial secondary metabolism?. *Phytochemistry*, 70(15-16), 1787-1800.

Sellers, B. A., Smeda, R. J., & Johnson, W. G. (2003). Diurnal fluctuations and leaf angle reduce glufosinate efficacy. *Weed Technology*, 17(2), 302-306.

Sellers, B. A., Smeda, R. J., & Li, J. (2004). Glutamine synthetase activity and ammonium accumulation is influenced by time of glufosinate application. *Pesticide biochemistry and physiology*, 78(1), 9-20.

Seto, H. (1995). Biosynthesis of a Natural CP Compound, Bialaphos Produced by *Streptomyces hygrosopicus*. *Actinomycetologica*, 9(2), 193-205.

Shelp, B. J., Swanton, C. J., & Hall, J. C. (1992). Glufosinate (phosphinothricin) mobility in young soybean shoots. *Journal of Plant Physiology*, 139(5), 626-628.

Shen, W. J., & Forde, B. G. (1989). Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation. *Nucleic acids research*, 17(20), 8385.

Sherman, T. D., Vaughn, K. C., & Duke, S. O. (1995). MECHANISMS OF ACTION AND RESISTANCE TO HERBICIDES. *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Economic, Environmental, Regulatory, and Technological Aspects*, 13.

Sinden, S. L., & Durbin, R. D. (1968). Glutamine synthetase inhibition: possible mode of action of wildfire toxin from *Pseudomonas tabaci*. *Nature*, 219(5152), 379.

Singh, R. J., Klein, T. M., Mauvais, C. J., Knowlton, S., Hymowitz, T., & Kostow, C. M. (1998). Cytological characterization of transgenic soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(2), 319-324.

Soybase. Soybean genomics white paper. 2000
https://soybase.org/Genomics/Soybean_Genomics.html#transform

Strauch, E., Wohlleben, W., & Pühler, A. (1988). Cloning of a phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Gene*, 63(1), 65-74.

Superintendencia de Industria y Comercio. Estudios de Mercadeo. 2009

(<http://www.sic.gov.co/drupal/masive/datos/estudios%20economicos/Documentos%20%20elaborados%20por%20la%20Delegatura%20de%20Protecci%C3%B3n%20de%20la%20Competencia/2011/ABA2012.pdf>)

Tachibana, K., & Kaneko, K. (1986). Development of a new herbicide, bialaphos. *Journal of Pesticide Science (Japan)*.

Tachibana, K., Watanabe, T., Sekizawa, Y., & Takematsu, T. (1986). Inhibition of glutamine synthetase and quantitative changes of free amino acids in shoots of bialaphos-treated Japanese barnyard millet. *Journal of Pesticide Science (Japan)*.

Thompson, C. J., Movva, N. R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J. E., Lauwereys, M., & Botterman, J. (1987). Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO journal*, 6(9), 2519-2523.

Tsaftaris, A. (1996). The development of herbicide-tolerant transgenic crops. *Field Crops Research*, 45(1), 115-123.

Valencia, R., & Ligarreto, G. A. (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.

- Vallejo Cabrera, F. A., & Estrada Salazar, E. I. (2002). Mejoramiento genético de plantas (No. Doc. 21583) CO-BAC, Bogotá).
- Vasil, I. K. (2008). A short history of plant biotechnology. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 387-394.
- Veluthambi, K., Gupta, A. K., & Sharma, A. (2003). The current status of plant transformation technologies. *Current Science*, 84(3), 368-380.
- Wallsgrave, R. M., Keys, A. J., Lea, P. J., & Mifflin, B. J. (1983). Photosynthesis, photorespiration and nitrogen metabolism. *Plant, Cell & Environment*, 6(4), 301-309.
- Wild, A., & Manderscheid, R. (1984). The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 39(5), 500-504.
- Wild, A., Sauer, H., & Rühle, W. (1987). The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis I. Inhibition of photosynthesis and accumulation of ammonia. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 42(3), 263-269.
- Wild, A., & Ziegler, C. (1989). The Effect of Bialaphos on Ammonium-Assimilation and Photosynthesis I. Effect on the Enzymes of Ammonium-Assimilation. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 44(1-2), 97-102.
- Xing, A., Zhang, Z., Sato, S., Staswick, P., & Clemente, T. O. M. (2000). The use of the two T-DNA binary system to derive marker-free transgenic soybeans. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36(6), 456-463.
- Xue, R. G., Xie, H. F., & Zhang, B. (2006). A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells. *Biotechnology letters*, 28(19), 1551-1557.
- Zeng, P., Vadnais, D. A., Zhang, Z., & Polacco, J. C. (2004). Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant cell reports*, 22(7), 478-482.
- Zhang, Z., Xing, A., Staswick, P., & Clemente, T. E. (1999). The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56(1), 37-46.
- Ziegler, C., & Wild, A. (1989). The effect of bialaphos on ammonium-assimilation and photosynthesis II. Effect on photosynthesis and photorespiration. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 44(1-2), 103-108.