

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Inserción del gen *RB* en las variedades Revolución y
Désirée de *Solanum tuberosum* para conferir resistencia a
*Phytophthora infestans***

Tesis para optar el título profesional de licenciado en bióloga

Manuel Fernando Serna Chumbes

LIMA- PERÚ

2011

AGRADECIMIENTO

A mi abuelito Manuel Chumbes, quien ahora descansa en la gracia de Dios.

Al Dr. Marc Ghislain por confiarme la responsabilidad de realizar este trabajo de investigación y por sus consejos siempre acertados.

A Jessica Yactayo y Giovanna Perazo, mis primeras maestras en Biotecnología, quienes me dieron la oportunidad de ingresar al CIP.

A Sandra Manrique por ayudarme y tener bastante paciencia en revisar y corregir mi tesis.

A Cristina Rivera, Giuliana Medrano, José Condori quienes estuvieron apoyándome en la realización de mi tesis.

Al Doctor Tomas Agurto decano de la facultad de Ciencias Biológicas quien me abrió las puertas del laboratorio de microbiología prácticamente desde que inicie mis estudios en la universidad.

Al Profesor Mauro Quiñones mi asesor de tesis que tuvo el tiempo y la paciencia para revisar mi tesis.

Al Dr. Hugo Gonzáles, Dr. David Talledo y Dra. Lidia Cruz miembros del jurado por realizar las correcciones del presente trabajo.

A todos mis amigos asistentes, estudiantes y técnicos del CIP, con quienes compartí gratos momentos y fueron como una familia para mí en el tiempo que estuve en el CIP.

A mi familia por brindarme su apoyo y acompañarme en todos los momentos de mi vida.

DICATORIA

Dedico la presente tesis a mi madre Blanca Chumbes, quien fue la persona que me formo, me educo y me inculco los valores morales que son parte de mi vida. Mis éxitos en esta vida son gracias a ti.

A mi padre Fernando Serna quien me apoya con sus sabios consejos.

RESUMEN

Con el fin de introducir el gen *RB* que confiere resistencia al tizón tardío se desarrollaron dos construcciones genéticas, la primera sólo con el gen de interés (*RB*) y la segunda con el gen de interés y un gen de resistencia a kanamicina, que sirvió como marcador de selección. Ambas construcciones fueron usadas para transformar mediante *Agrobacterium tumefaciens*, explantes de *Solanum tuberosum* de las variedades Revolución y Désirée

Se desarrollaron medios para propagación y regeneración de las plántulas de Revolución, y se determinó la concentración de antibiótico necesaria para la selección de los explantes transformados y la eliminación de *Agrobacterium*.

Se realizaron los eventos de transformación con la primera construcción carente del gen marcador de selección; por lo cual, la mayoría de los explantes regeneraron.

Los regenerantes fueron analizados por PCR y se obtuvieron 7 líneas posiblemente transgénicas, pero en los resultados con Southern blot resultaron negativas. De la transformación con la segunda construcción, en la variedad Désirée se obtuvieron 12 plantas putativamente transgénicas que fueron luego analizadas por Southern blot confirmando que 10 de ellas eran transgénicas y contenían el gen de interés.

ABSTRACT

In order to insert the *RB* gene conferring resistance to late blight, two genetic constructs were developed. The first construct only contains the gene of interest (*RB*) and the second construct, the gene of interest plus a kanamycin resistance gene, which served as a selection marker. Both constructs were used to transform explants of *Solanum tuberosum*, Désirée and Revolution varieties, by *Agrobacterium tumefaciens*.

Culture medium were developed for propagation and regeneration of Revolution's seedling. Concentration of required antibiotic to select transformed explants and eliminate *Agrobacterium* were also determined.

Transformation events were conducted with the first construct lacking the selection marker gene. As a result, most of the explants were regenerated.

PCR was used to analyzed the regenerants and 7 lines were candidates to be transgenics. However, Southern blot analysis ruled out this possibility. Transformation events with the second construct, in the Désirée variety, resulted in 12 putative transgenic plants. PCR and Southern blot analysis confirmed that 10 of them were transgenic and contained the gene of interest.

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
ÍNDICE	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
I. INTRODUCCIÓN	12
I. ANTECEDENTES.....	15
2.1 CULTIVO DE PAPA.....	15
2.2 VARIEDAD DÉSIRÉE.....	17
2.3 VARIEDAD REVOLUCIÓN.....	17
2.4 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN PLANTAS	19
2.5 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA LIBRE DE MARCADOR DE SELECCIÓN.....	22
2.6 PHYTOPHTHORA INFESTANS	23
2.7 RESISTENCIA A PHYTOPHTHORA INFESTANS.....	25
2.8 SOLANUM BULBOCASTANUM Y EL GEN RB.....	26
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 MATERIALES	31
3.1.1 <i>Material Biológico.</i>	31
3.1.2 <i>Material vegetal.</i>	31
3.1.2.1 Cepas bacterianas y plásmidos.....	31
3.2 MÉTODOS.....	32
3.2.1 <i>Propagación in vitro del material vegetal.</i>	32
3.2.2 <i>Estandarización de la concentración de antibiótico</i>	33
3.2.3 <i>Construcción del plásmido quimérico</i>	34
3.2.3.1 Extracción del ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	34
3.2.3.2 Electroforesis.....	35
3.2.3.3 Digestión del ADN plasmídico con enzimas de restricción	36
3.2.3.4 Purificación de las bandas de interés	38
3.2.3.5 Ligación de los fragmentos.....	38
3.2.4 <i>Transformación y clonamiento de los fragmentos de interés</i>	40

3.2.4.1	Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico	40
3.2.4.2	Extracción de ADN plasmídico de <i>Agrobacterium</i>	41
3.2.4.3	Electroporación	42
3.2.4.4	Análisis con enzimas de restricción	43
3.2.4.5	Conservación de las cepas bacterianas	43
3.2.5	<i>Cultivo de bacterias</i>	44
3.2.5.1	Lectura de la curva de crecimiento	44
3.2.6	<i>Transformación genética</i>	45
3.2.6.1	Transformación genética vía infección indirecta	45
3.2.6.2	Transformación vía infección directa	45
3.2.6.3	Regeneración	46
3.2.7	<i>Análisis molecular</i>	46
3.2.7.1	Extracción de ADN vegetal a pequeña escala	46
3.2.7.1	Diseño de cebadores	48
3.2.7.2	Análisis por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	49
3.2.7.3	Extracción de ADN vegetal a mediana escala	49
3.2.8	<i>Hibridación por "Southern blot"</i>	51
3.2.8.1	Digestión con enzimas de restricción	51
3.2.8.2	Electroforesis	51
3.2.8.3	Transferencia	52
3.2.8.4	Preparación de la sonda	53
3.2.8.5	Marcaje de la sonda	54
3.2.8.5.1	Pre- hibridación	54
3.2.8.5.2	Hibridación	55
3.2.8.5.3	Autoradiografía	55
III.	RESULTADOS	57
4.1	PROPAGACIÓN DEL MATERIAL <i>IN VITRO</i>	57
4.1.1	<i>Estandarización de la concentración de los antibióticos</i>	58
4.2	CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO QUIMÉRICO	59
4.2.1	<i>Digestión del ADN plasmídico</i>	59
4.2.2	<i>Transformación y clonamiento de los fragmentos</i>	60
4.3	TRANSFORMACIÓN GENÉTICA	61
4.3.1	<i>Regeneración</i>	61
4.4	ANÁLISIS MOLECULAR	61
4.4.1	<i>Extracción de ADN vegetal a pequeña escala</i>	61
4.4.2	<i>Diseño de cebadores</i>	62
4.4.3	<i>Caracterización molecular por PCR</i>	63
4.4.4	<i>Caracterización molecular por Southern blot</i>	65

IV. DISCUSIÓN.....	67
V. CONCLUSIONES.....	73
VI. RECOMENDACIONES.....	75
VII. BIBLIOGRAFÍA	76
VIII. ANEXO	86
9.1 FIGURAS.....	86
9.1 TABLAS	103
IX. APENDICE	118
10.1 PREPARACIÓN DE HORMONAS Y ANTIBIÓTICOS	118
10.2 ESQUEMAS.....	119

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1. COMPONENTES DEL MEDIO M43	103
TABLA N° 2. MEDIO DE PROPAGACIÓN MSA MEDIO DE CO-CULTIVO	103
TABLA N° 3. MEDIO DE REGENERACIÓN WILLMITZER	104
TABLA N° 4. BROMURO DE ETIDIO	105
TABLA N° 5. TBE 10 X.....	105
TABLA N° 6. SALB 10X	106
TABLA N° 7. FAGO LAMBDA DIGERIDO CON <i>PstI</i>	106
TABLA N° 8. SOLUCIÓN DE LAVADO I SOLUCIÓN I	107
TABLA N° 9. SOLUCIÓN DE LAVADO	107
TABLA N° 10. SOLUCIÓN DE LAVADO III.....	108
TABLA N° 11. TAMPÓN DE EXTRACCIÓN CTAB	108
TABLA N° 12. CEBADORES UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS MOLECULAR	109
TABLA N° 13. CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN POR PCR	111
TABLA N° 14. CONDICIONES DEL PROGRAMA PARA LA AMPLIFICACIÓN POR PCR	112
TABLA N° 15. PREHIBRIDACIÓN	114
TABLA N° 16. SOLUCIÓN DE LAVADO II.....	115
TABLA N° 17. SOLUCIÓN DE DENATURACIÓN	115
TABLA N° 18. TAMPÓN DE NEUTRALIZACIÓN	116
TABLA N° 19. SOLUCIÓN DE LAVADO	117
TABLA N° 20. SEGUNDO LAVADO	117

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MAPA DEL PLÁSMIDO PSPUD6 TENIENDO LA REGIÓN RB, (PROPORCIONADO POR LA UNIVERSIDAD DE WISCONSIN).	86
FIGURA 2. ESQUEJES DE REVOLUCIÓN.	87
FIGURA 3. ESQUEJES SUMERGIDOS EN EL MEDIO LÍQUIDO.	87
FIGURA 4. DISEÑO DEL CONSTRUCTOR PCIP56 CON LOS SITIOS DE CORTE ENZIMÁTICOS XMAI Y SACL	87
FIGURA 5. DISEÑO DEL CONSTRUCTOR PBIN20 MOSTRANDO EL SITIO DE CLONAMIENTO MÚLTIPLE.	88
FIGURA 6. DISEÑO DEL NUEVO CONSTRUCTO (PCIP68), CONTENIENDO EL GEN <i>RB</i> INTRODUCIDO DENTRO DEL VECTOR PBIN20. .	88
FIGURA 7. HOJAS DE REVOLUCIÓN INFECTADAS.	89
FIGURA 8. HOJAS DE REVOLUCIÓN CON EL PECÍOLO INFECTADO.	89
FIGURA 9. CEBADOR LB (AMPLICÓN 300PB) PARA S. BLOT -NUMERO DE COPIAS- DIGERIDO CON ECORI (TAMAÑO ESPERADO 756PB).	90
FIGURA 10. VARIEDAD REVOLUCIÓN DESPUÉS DE 3 SEMANAS DE PROPAGADO	90
FIGURA 11. MEDIO MSA + 0.04 AG3	91
FIGURA 12. MEDIO MSA + 0.02 AG3	91
FIGURA 13. MEDIO CONTROL MSA	91
FIGURA 14. MEDIO LIQUIDO MS	91
FIGURA 15. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE ANTIBIÓTICOS (CARBENICILINA Y CEFOTAXIMA) EN LA VARIEDAD REVOLUCIÓN.	93
FIGURA 16. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1%, CON MUESTRAS DE ADN PLASMÍDICO DE LOS VECTORES PCIP56 Y PBIN20.	93
FIGURA 17. COMPARACIÓN DE LOS FRAGMENTOS OBSERVADOS ENTRE EL PROGRAMA VECTOR Y LOS GELES DE AGAROSA. A) DIGESTIÓN VIRTUAL DE LOS PLÁSMIDOS PCIP56 Y PBIN20 CON LAS ENZIMAS XMAI Y SACL B) DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO PCIP56 c) DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO PBIN20.	94
FIGURA 18. ADN PLASMÍDICO DE MUESTRAS DE <i>E. COLI</i> DESPUÉS DE LA TTRANSFORMACIÓN.	95
FIGURA 19. DIGESTIÓN DE LOS PLÁSMIDOS: A) SIMULACIÓN DE LA DIGESTIÓN OBTENIDA EN EL VECTOR NTI 10. B) MUESTRAS DE ADN DIGERIDAS Y CORRIDAS EN GEL DE AGAROSA AL 1%.	95
FIGURA 20. DIGESTIÓN DEL ADN PLASMÍDICO DE <i>A. TUMEFACIENS</i> DESPUÉS DE LA TRANSFORMACIÓN EN GEL DE AGAROSA AL 1%, 1.LAMBDA CON PSTI, 2,3,4,5,6 Y 7 MUESTRAS DE <i>A. TUMEFACIENS</i> , TRANSFORMADAS, 8. <i>E. COLI</i> TRANSFORMADO COMO CONTROL.	96
FIGURA 21. REGENERANTES A PARTIR DE ENTRENUDOS DESPUÉS DE LA TERCERA SEMANA DE MANTENERLOS EN MEDIO DE REGENERACIÓN.	96
FIGURA 22. MUESTRAS DE PLANTAS PARA EXTRACCIÓN DE ADN A PEQUEÑA ESCALA.	97
FIGURA 23. CORRIDA ELECTROFORÉTICA DE MUESTRAS DE ADN VEGETAL EN GEL DE AGAROSA AL 1 %.	97

FIGURA 24. GEL DE AGAROSA CON MUESTRAS DE ADN DEL PRIMER EVENTO DE TRANSFORMACIÓN EN REVOLUCIÓN NINGÚN AMPLIFICADO POSITIVO, SOLO SE OBSERVA LA AMPLIFICACIÓN DEL CONTROL POSITIVO(C+) PLÁSMIDO CON LA CONSTRUCCIÓN PCIP56.	97
FIGURA 25. MUESTRAS DEL EVENTO DE TRANSFORMACIÓN CON LA CEPA EHA 105 MOSTRANDO AMPLIFICADOS (FALSOS POSITIVOS), C- CONTROL NEGATIVO, C+ CONTROL POSITIVO.....	98
FIGURA 26. AMPLIFICACIÓN DE 8 MUESTRAS DE DÉsirÉE DE LAS 11 AMPLIFICADAS CON EL CEBADOR KM1 PARA CONFIRMAR LOS POSITIVOS.....	98
FIGURA 27. MUESTRAS AMPLIFICADAS CON EL CEBADOR NPTII. EN TOTAL AMPLIFICARON 3 MUESTRAS DE LAS 11 ANALIZADAS.	99
FIGURA 28. AMPLIFICACIÓN POSITIVA PARA LAS MUESTRAS 1, 3, 12, 13 Y 23 CON EL CEBADOR LB BORDE.	99
FIGURA 29. MUESTRAS 30, 32, 41, 42 Y 43, CON AMPLIFICACIÓN POSITIVA PARA EL CEBADOR LB BORDE.	99
FIGURA 30. MUESTRAS 52 Y 56 CON AMPLIFICACIÓN POSITIVA PARA EL PAR DE CEBADORES LB BORDE. CARRIL 59 CORRESPONDE EL CONTROL POSITIVO (PLÁSMIDO QUE CONTIENE EL GEN DE INTERÉS).....	100
FIGURA 31. LÍNEAS DE DÉsirÉE TRANSGÉNICAS, PROPAGADAS PARA LAS PRUEBAS DE SOUTHERN BLOT.	100
FIGURA 32. ADN DE DÉsirÉE TRANSGÉNICOS Y CONTROL NEGATIVO DIGERIDOS CON EcoRI. LA TABLA DE LA	101
FIGURA 33. SONDA PARA SOUTHERN BLOT, A. GEL CON MUESTRAS DEL PRODUCTO DEL PCR; B. CALIDAD DE LA MUESTRA RECUPERADA DEL GEL MEDIANTE EL KIT DE PURIFICACIÓN DE BANDAS.	101
FIGURA 34. HIBRIDACIÓN POR SOUTHERN BLOT DE LÍNEAS PUTATIVAMENTE TRANSFORMADAS DE DÉsirÉE.	102

I. INTRODUCCIÓN

Se ha estimado que para el 2030 la población mundial será de 8,000 millones de personas, por lo que la demanda de alimentos se incrementará y su distribución se verá afectada gravemente. Es por esta razón que nos vemos en la necesidad de explotar cultivos de fácil producción y de alto valor nutricional, como es el caso de la papa.

El cultivo de la papa es atacado por distintas enfermedades que disminuyen su producción agrícola; como sucedió en Irlanda a mediados del siglo diecinueve donde más de un millón de personas murieron de inanición, al verse sus cultivos de papa atacados por una enfermedad conocida como tizón tardío.

El tizón tardío es una enfermedad causada por el oomiceto *Phytophthora infestans* el cual ataca a todos los cultivares de papa a nivel mundial. El problema del tizón tardío es más agudo en los países donde las altas temperaturas, la elevada humedad y la pobreza limitan la capacidad de los agricultores para enfrentar a la enfermedad. La diseminación rápida de formas agresivas del patógeno y resistentes a los fungicidas (chlorothalonil y mancozeb) ha hecho de esta enfermedad el factor biótico limitante más costoso de la producción alimentaria. Por ello, se viene buscando una efectiva vía para el control de esta enfermedad, que permita evitar el uso dramático de fungicidas ya que estos tipos de compuestos representan consecuencias importantes para el ambiente, la salud y el costo de la producción.

Actualmente se busca incorporar una resistencia natural a los cultivares de papa, mediante genes que confieran resistencia al tizón tardío.

Un grupo prometedor de genes capaces de conferir resistencia al tizón tardío han sido aislados de una variedad de papa silvestre llamada *Solanum bulbocastanum*, que ha demostrado tener un amplio espectro de resistencia a todas las razas conocidas de *P. infestans*.

El descubrimiento de este grupo de genes *RB* en la variedad de papa silvestre *Solanum bulbocastanum*, proporciona la información necesaria para la obtención de plantas de papa con resistencia a la enfermedad producida por *P. infestans*.

Solanum bulbocastanum es una variedad sexualmente incompatible con otras variedades de solanáceas, por lo que transferir el gen *RB* a otras variedades de papa es imposible por métodos de mejoramiento convencional y más bien la transformación genética resulta ser la opción más factible para insertar el gen de resistencia *RB*, a otras variedades de papa.

Este trabajo consistió en insertar el gen *RB* mediante la transformación genética por medio del vector *Agrobacterium tumefaciens* en plantas de papa de las variedades Revolución y Désirée, ambas susceptibles a

esta enfermedad, con la finalidad de obtener papas resistentes al tizón tardío, para mejorar la productividad.

I. ANTECEDENTES

2.1 Cultivo de papa

Según restos arqueológicos encontrados al sureste de Perú y noreste de Bolivia la papa es un tubérculo que el hombre ha cultivado desde hace aproximadamente 10,000 años atrás (Estrada, 2000). El origen de la papa estuvo en discusión por muchos años, sin embargo gracias a las investigaciones del ingeniero Carlos Ochoa alrededor del lago Titicaca, se comprobó que el Perú es el lugar de origen y domesticación de la papa cultivada (Ochoa, 1999) y esto fue reafirmado con los últimos experimentos realizados por la Universidad de Wisconsin, a través del análisis con marcadores genéticos de unas 350 especies de *Solanum*, demostrando que todas las variedades cultivadas actualmente se originaron a partir de la domesticación de *S. bukasovii* en el sur del Perú (Spooner, 2005), descartando otras hipótesis del origen de la papa como la de orígenes múltiples (Hawkes, 1990).

Clasificación taxonómica (Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI, 2008):

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Subdivisión: Angiosperma
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Asteridae

- Orden: Solanale.
- Familia: Solanaceae
- Género: Solanum
- Sección: Petota
durmortier
- Especie: *Solanum
tuberosum L.*

La papa es un cultivo alimenticio de importancia mundial (FAO 2008), pero su producción se ve reducida debido a enfermedades que atacan a la planta ocasionando lesiones o en algunos casos matándola, echando a perder toda la producción.

Entre las enfermedades más importantes que atacan a la papa se encuentra el tizón tardío ocasionado por el oomiceto *Phytophthora infestans*. Esta enfermedad fue descrita por Anthony de Bary en 1876 y fue la responsable de la devastación de los campos de cultivo en Irlanda en el siglo diecinueve, que trajo consigo la hambruna, la pobreza y la muerte de más de un millón de personas y la migración de otros tantos (Erwin y Ribeiro, 1996; Daly, 1996).

El estudio de *Phytophthora* y su relación con *Solanum tuberosum* ha tomado gran importancia, principalmente en la búsqueda de variedades que sean resistentes al tizón tardío. En este propósito, se ha logrado descubrir algunas variedades que presentan una resistencia parcial al tizón, por ejemplo Reddick (1930) reportó que una especie

mexicana *Solanum demissum* fue virtualmente inmune al tizón tardío, infortunadamente la resistencia hipersensitiva de esta especie no es generalmente efectiva con todas las especies de este oomiceto.

2.2 Variedad Désirée

La variedad Holandesa Désirée fue obtenida por cruzamiento de las variedades Urgenta y Depesche. Esta variedad fue introducida por primera vez al Reino Unido en el año 1961 (Hamester; et al 2003).

Su follaje emerge y desarrolla moderadamente rápido, sus tallos son bastante numerosos, largos y robustos, los nudos y los entrenudos son de color rojo-púrpura, las hojas son largas, abiertas y rígidas. Tienen inflorescencias muy numerosas con flores de color rojo violáceo. Los tubérculos son de forma oval alargada, la piel es roja y lisa y la carne de color amarillo claro, con ojos superficiales (NIVAP, 2007).

Esta variedad es de maduración semitemprana a semitardía, empleada en el consumo doméstico y medianamente susceptible al tizón tardío (NIVAP, 2007).

2.3 Variedad Revolución

La variedad Revolución, liberada en 1973, fue obtenida mediante el cruzamiento de las variedades Naranja x (Kathadin x Mantaro), realizado por el Ing. Carlos Ochoa y Fermín de la Puente. Correspondiente a la

selección SS-29-4 de la Dirección General de Investigación Agropecuaria (De la Puente et al., 1974).

Las plantas de esta variedad se caracterizan por ser erguidas y compactas, con tallo verde oscuro, hojas anchas verde claro y con nervadura central ligeramente pubescente. Sus flores son de color lila claro, la floración es escasa y presentan androesterilidad. Poseen un periodo vegetativo de 110 a 120 días (precoz) con tuberización temprana y acelerada, estolones cortos, calidad culinaria muy buena. Esta variedad es ligeramente tolerante al tizón tardío (Auroi, 1986).

Su adaptación es en toda la Sierra hasta los 3600 msnm, costa central y sur del Perú. La forma del tubérculo es redonda, con piel de color amarillo pálido y manchas rosadas alrededor de los ojos; el color de la pulpa del tubérculo es blanco cremoso, los ojos son superficiales, y los brotes gruesos y de color rojo violáceo. La floración es escasa, la fructificación nula y la calidad culinaria muy buena (INIA, 1980, Hamester; et al 2003).

Cabe destacar que ambas variedades fueron utilizadas por ser susceptibles a la enfermedad del tizón tardío. Revolución por ser una variedad comercial peruana de maduración precoz y más importante aún por ser androesteril lo que evitaría una posible polinización cruzada con otra especie de papa y Désirée por ser la mayormente empleada a nivel mundial en procesos de transformación genética en papa.

2.4 Transformación genética en plantas

La transformación genética es una herramienta que permite transferir genes de interés de un organismo a otro diferente o de la misma especie, o como por ejemplo los genes de resistencia a *Phytophthora* de algunas especies de papa, las cuales pueden ser transmitidas a otras variedades que son susceptibles. Actualmente se viene utilizando diversas estrategias para la obtención de plantas transgénicas, que incluyen métodos biológicos como la utilización de la bacteria *Agrobacterium* o métodos físicos como biolística (bombardeo de partículas), electroporación, utilización de láser, microinyección. Entre los métodos más utilizados y efectivos se encuentra la transformación por *Agrobacterium*, que es considerado como un ingeniero genético natural, que utiliza un sistema complejo y muy evolucionado de transferencia del ADN (De la Riva, et al., 1998).

Los vectores de clonación son utilizados para introducir en ellos el gen de interés que se desea transferir a la planta. Uno de los vectores más usados son los plásmidos, los cuales son moléculas de ADN circular extracromosomal, comúnmente aislados de *E. coli* que luego son introducido en *Agrobacterium*. Para el caso de la transformación genética en plantas, estos plásmidos artificiales deben de tener las siguientes características: un sitio de replicación, un marcador de selección y un sitio de clonamiento múltiple (Sambrook, et al., 2001).

El ADN que se transfiere a la célula huésped se denomina ADN-T (donde se pueden insertar secuencias

foráneas para la transformación genética) y corresponde a una pequeña sección del plásmido TI (inductor de tumor). Este plásmido tiene un tamaño entre 200 a 800 Kb (Gelvin 2003). Parte del mecanismo de transferencia e integración del ADN foráneo a la planta se efectúa mediante un complejo de proteína y ADN de cadena sencilla, que se introduce en un número reducido de copias por célula vegetal (Birch, 1997).

Este método trae muchas ventajas en la transformación de plantas permitiendo: una precisa transferencia e integración de la secuencia del ADN con promotores y terminadores específicos, la transferencia de genes de interés junto con el gen marcador, una alta frecuencia de transformación estable con muchas inserciones de copia única y una baja frecuencia de transgenes silenciados, así como la habilidad de transferir fragmentos largos de ADN-T (de 150 Kb aproximadamente) mediante el uso de un vector binario (Veluthambi et al., 2003).

Un vector binario es un sistema en el cual se introduce los genes de interés conjuntamente con el gen marcador. Comúnmente para la transformación en plantas se utiliza el vector binario pBIN19 (Bevan, 1984), éste es introducido en *A. tumefaciens*, cepa LBA4404 (Hoekema et al., 1983). Con el fin de mejorar los niveles de eficiencia en transformación se desarrolló una bacteria más virulenta de *A. tumefaciens*, para su utilización en la transformación de monocotiledoneas ya que *Agrobacterium* es específico para dicotiledoneas (Veluthambi et al., 2003). Esta nueva

cepa hipervirulenta se denominó EHA 105 (Hood et al., 1993).

En general, sin importar el sistema que se utilice para la transformación en plantas, el nivel de eficiencia es bajo y sólo unas pocas células son transformadas, por eso con el fin de seleccionar las células transformadas en etapas tempranas del proceso, se utiliza genes marcadores de selección para eliminar las células no transformadas y dejar solamente las transformadas. Estos genes marcadores por lo general son genes de resistencia para antibióticos o herbicidas: como el *nptII* que confiere resistencia a la kanamicina o genes de resistencia a herbicidas como el *hpt* o *bar* (Bryant, 2001).

El posible uso de estos genes, como por ejemplo el *nptII*, en la producción de organismos genéticamente modificados (OGMs) para la alimentación, ha causado inquietud en algunos sectores de la población mundial, quienes temen que los genes de resistencia a antibióticos puedan ser transferidos a las poblaciones de bacterias que conviven en el sistema digestivo humano. La probabilidad de que esto ocurra es infinitamente pequeña, puesto que se requeriría que se produzcan en el estomago e intestino sucesos altamente improbables, para que el gen de resistencia no se degrade con el resto de los alimentos consumidos y para que se incorpore en una bacteria que lo pueda expresar correctamente. Se ha calculado que un individuo sano en un ambiente sano puede ingerir diariamente 1'200,000 bacterias resistentes a antibióticos. Por ello sería mucho más probable que los genes de

resistencias de esas bacterias, ingeridas diariamente, se transfieran a las bacterias del sistema digestivo, en lugar que lo hagan los genes provenientes de las plantas transgénicas (Bryant, 2001).

2.5 Transformación genética libre de marcador de selección

La generación de plantas transgénicas libres de marcadores contribuye a la aceptación pública de los cultivos transgénicos. Por esta razón se han reportado metodologías de transformación en plantas sin el gen marcador de selección. Un método utilizado en la actualidad es la eliminación del marcador por una recombinación de un sitio específico, llamado *Cre-loxP* (Dale y Ow, 1991), este sistema ha sido utilizado eficazmente y consta de un vector binario con el gen de recombinación *cre*, bajo el control de un promotor de choque térmico, el gen marcador que es colocado entre los dos sitios *loxP*, y el gen de interés que es colocado fuera del sitio *loxP*, y por medio del choque térmico el gen marcador y el gen *cre* son eliminados de las plantas ya transformadas reteniendo solamente el gen de interés (Yong et al., 2005). Esta técnica ha sido utilizada en papa teniendo una eficiencia de eliminación del gen marcador *nptII* del 4.7% (Cuellar et al., 2006).

Otro método para la eliminación del marcador de selección es por co-transformación, este método consiste en tener dos ADN- T independientes; uno con el gen marcador de selección y otro con el gen de interés (Komari et al. 1996). Una alternativa a esto, es de trabajar sin un

marcador de selección, es decir solo trabajar con el gen de interés, este método resulta tedioso ya que *in vitro* no se tiene la capacidad de saber qué plantas están transformadas y se tiene que recurrir a pruebas moleculares para determinar la presencia del gen, además que demanda el mantenimiento y evaluación de grandes poblaciones de plantas. En el caso de papa sólo el 0.2% de regenerantes son transgénicos bajo condiciones no selectivas, pudiendo aumentar hasta un 4.5 % usando una cepa supervirulenta de *Agrobacterium* como la EHA 105 o la AGLO (Nick de Vetten et al., 2003).

2.6 *Phytophthora infestans*

Phytophthora significa destructor de plantas y la especie *P. infestans* es el agente que causa la enfermedad del tizón tardío en papa (Erwin y Ribeiro, 1996). La clasificación taxonómica según el NCBI 2008 es la siguiente:

- Reino : Cromista
- Phylum : Oomycota
- Clase : Oonycete
- Subclase: Peronosporomycetidae
- Orden : Pythiales
- Familia : Pythiaceae
- Género : *Phytophthora*
- Especie : *infestans*

El phylum Oomycota, perteneciente al reino Cromista, comprende más de 700 especies, no presentan

pigmentos fotosintéticos, poseen dos flagelos en las zoosporas, poseen paredes formadas por celulosa o polímeros similares a la celulosa y tienen hábitos acuáticos y terrestres, aunque siempre necesitan la presencia del agua.

Por sus formas filamentosas parecidas a hifas, se agruparon originalmente como hongos (Raven, Evert y Eichhorn, 1999), lo que fue descartado por estudios moleculares de filogenia, basadas en las secuencias del ARN ribosomal, también fue evidenciado que los Oomycetos adquirieron la habilidad de infectar a las plantas de manera independiente de los hongos verdaderos (kamoun 2002).

El género *Phytophthora* difiere de los hongos, en la morfología de las crestas mitocondriales (tubulares) y la bioquímica de la pared celular, la cual contiene microfibrillas de celulosa con matriz amorfa de β' 1-3 glucano en vez de quitina, además de la carencia de hipoxidación del escualeno a esteroides y diferencias en las vías metabólicas (Griffith et al., 1992, citado por Erwin y Ribeiro, 1996).

La forma de infección de *P. infestans* es por medio de los esporangios o las zoosporas liberadas que llegan al tejido de la planta huésped, en presencia de agua, y emiten un tubo germinativo el cual ingresa por los estomas, ubicados en el envés de las hojas. Después de la germinación de las esporas, se desarrolla el apresorio y ocurre la penetración al cabo de 16 o más horas, formando

las vesículas de infección intracelular en las células epidermales. En este primer estado biotrófico, 22 horas después de la inoculación, las hifas crecen en los espacios intercelulares, presentándose la ramificación a través del mesófilo y forman entre uno o dos haustorios (Vleeshouwers et al., 2000).

A nivel macroscópico, durante las primeras 24 horas las células del huésped tienen una respuesta poco detectable. Entre 24 a 48 horas o un periodo más prolongado en los huéspedes resistentes, se observa el inicio de la lesión que consta de células necróticas en el centro, rodeadas por tejidos aparentemente saludables, en el cual el patógeno está creciendo, razón por lo que se le denomina organismo hemibiotrófico (se alimenta de tejidos vivos y de tejidos muertos). La zona necrosada va creciendo y es muy característica de los estados avanzados de patogenicidad en las plantas huéspedes (Vleeshouwers et al., 2000; Smart et al., 2000).

2.7 Resistencia a *Phytophthora infestans*

La resistencia al tizón tardío en cultivares de papa está presente en una especie silvestre llamada *Solanum demissum* (Malcomson and Black 1966), esta ha sido estudiada durante varios años y se han reportado 11 genes R que proveen de una resistencia específica a *P. infestans*; sin embargo, estos genes R no son resistentes a todas las variedades del patógeno, son altamente específicos para cada raza, lo cual ha sido descrito genéticamente como una interacción gen por gen (Flor 1954). El estudio de los genes R, ha permitido entender mejor el mecanismo de defensa

de la planta contra el patógeno, mediante la interacción gen por gen, también conocido como resistencia vertical, pero que puede ser vencida rápidamente ante la presencia de una nueva raza virulenta, por lo que suelen tener una corta vida en campo (Wastie, 1991, Fry and Goodwin, 1997). Esta corta duración y especificidad es una gran desventaja, por lo que se viene buscando alguna variedad que tenga una resistencia durable y que pueda vencer a las diferentes razas del patógeno, ahora se viene trabajando con una papa silvestre denominada *S. bulbocastanum* que presenta estas características.

2.8 Solanum bulbocastanum y el Gen RB

Solanum bulbocastanum (Dunal) es una especie diploide ($2n=2x=24$), sexualmente incompatible con otras variedades de solanaceas, debido a la diferencia en el número de balance endospermico (Johnston et al., 1980), pero mediante la hibridación somática se puede vencer la incompatibilidad sexual, por medio de la fusión de células. La manipulación de la ploidía y una serie de cruzamientos han sido usados para efectos de hibridación entre diferentes variedades de solanaceas y *S. bulbocastanum* (Hermsen and Ramanna, 1973), esta técnica ha sido utilizada exitosamente en programas de cultivos (Helgeson, 1992), en resistencia a virus (Austin et al., 1985), al nematode *Meloidogyne chitwoodi* (Austin et al., 1993), entre otros.

La resistencia en *S. bulbocastanum* puede ser capturada y pasada a otras variedades de papa mediante

el uso de la hibridación somática, para esto se utilizaron células de las hojas de *S. bulbocastanum* y de otras dos variedades para fusionar el núcleo (Helgeson et al., 1997), la detección de los posibles híbridos se realizó por RFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción), y las pruebas en campo se hicieron enfrentando estas variedades híbridas con el patógeno, para saber si presentaban la misma resistencia al tizón tardío como lo mostrado por *S. bulbocastanum*, esta prueba se realizó en dos localidades: Wisconsin (USA) en 1994 y en Toluca (México) en 1995, en ambas localidades se obtuvieron las mismas líneas resistentes (Helgeson 1998).

La búsqueda de la resistencia en el genoma de

S. bulbocastanum, se realizó por medio de marcadores moleculares (RAPD y RFLP), generando un mapa genético, tomando como base los trabajos realizados en tomate, lo que permitió localizar el gen de resistencia en el brazo largo del cromosoma 8 (Naess et al., 2000).

La región en la cual se encontró el gen de resistencia al tizón tardío se denominó *RB* (por *Resistencia de Solanum bulbocastanum*). Sabiendo que la resistencia se encuentra en el cromosoma 8 se realizó un mapa físico y genómico de la región *RB*, para esto se construyó una librería genómica con BACs (cromosomas artificiales de bacterias) (Bradeen et al. 2003).

Uno de estos BACs: el BAC177O13, fue totalmente secuenciado y se encontró un gen truncado y cuatro genes

completos que se nombraron RGAs (clase de Genes *R* Análogos). Estos cuatro genes fueron aislados y clonados del BAC y directamente del mismo *S. bulbocastanum* mediante un LR-PCR (PCR de rango amplio), el producto de esto fue introducido en *A. tumefaciens* cepa LBA 4404 para la transformación genética en Katahdin, una papa susceptible al tizón tardío. Las plantas transgénicas obtenidas se inocularon con *P. infestans* y sólo uno de los cuatro genes (el gen *RGA2*) mostró resistencia. El gen *RGA2* que mostró la resistencia provino del producto del LR-PCR, ya que el gen *RGA2* que salió de los BACs no obtuvo el mismo resultado de resistencia en pruebas de invernadero (Song et al., 2003).

El gen *RB* también llamado *RGA2* codifica un polipéptido de 970 aminoácidos, con un peso molecular de 110.3 kDa y pertenece a la familia de genes resistentes de plantas CC-NBS-LRR (sitios de enlaces nucleotídicos, repeticiones ricas en leucina) (Baker et al., 1997). Este gen *RB* se encuentra cercanamente relacionado a la proteína I2 del tomate (Simons et al., 1998). Muchos genes *R* están organizados en clusters (Michelmore y Meyers 1998), igualmente el *RB* es un miembro de cuatro genes localizados en una región de 40 kb en el cromosoma 8, el *RGA2* en el haplotipo susceptible y resistente tienen 21 repeticiones de LRR mientras que los otros *RGA1*, *RGA3* y *RGA4*, contienen 22 repeticiones de LRR, la variación de LRR juega un papel importante en el reconocimiento específico de la proteína RB (Song et al., 2003).

Edwin Van der Vossen y colaboradores en el 2003 desarrollaron un mapa físico y genético del locus *Rpi-blb1* (RB) y los cuatro genes encontrados fueron subclonados

en un BAC para analizarlos y luego introducirlo en un vector binario para transferirlo a un cultivar de papa susceptible, mediante la transformación genética con *Agrobacterium*. La transformación hecha con la cepa

A. tumefacium LBA4404 (Hoekma et al., 1983) presentó una baja eficiencia, mientras que la transformación realizada con la cepa *A. tumefacium* AGLO (Lazo et al., 1991) mostró mayor eficiencia. Solo la construcción genética que tenía el gen *RGA2-blb* fue capaz de complementar el fenotipo susceptible; 15 de los 18 transformados que contenían el *RGA2-blb* fueron resistentes y los otros tres: *Rga1-blb*, *RGA3-blb* y *Rga4-blb* fueron susceptibles a *P. infestans*. Los transformados con el gen *RGA2-blb* demostraron similar resistencia fenotípica que su pariente resistente *S. bulbocastanum*. El *RGA2-blb* fue designado con el nombre de gen *Rpi-blb1* y demostró ser un gen funcional en papa así como también en cultivares de tomate (Van der Vossen et al., 2003).

Para diferenciar entre los cuatro genes RGAs se crearon marcadores específicos, debido a la gran similitud que tienen los RGAs entre sí. Además se desarrolló otro marcador para diferenciar el *RGA2* resistente del susceptible, ya que éstos tienen una similitud del 99.8%. Estos cebadores se diseñaron para el segundo exón del gen en el dominio de los LRR. Con estos resultados se obtuvieron cebadores, que mediante un PCR convencional lograra diferenciar el gen *RGA2* asociado a la resistencia al tizón tardío (Colton et al., 2006).

El fitomejoramiento convencional, que entre otros métodos utiliza la hibridación, es lento y se limita a un número reducido de genomas. Los avances en biotecnología vegetal han permitido sobrepasar estas barreras y hacen posible transferir genes específicos a las plantas. La posibilidad de introducción e integración estable de genes foráneos en el genoma vegetal es una herramienta muy útil para el fitomejoramiento (Birch, 1997).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material Biológico.

Para realizar el presente trabajo se utilizó el siguiente material biológico:

3.1.2 Material vegetal.

Dos variedades de solanáceas: Revolución y Désirée, con los siguientes códigos CIP720043 y CIP800048 respectivamente, las cuales fueron proporcionadas por el banco de germoplasma del Centro Internacional de la Papa (CIP).

3.1.2.1 Cepas bacterianas y plásmidos.

Para los eventos de transformación se trabajó con dos cepas de *A. tumefaciens*: la cepa LBA4404 y la cepa EHA105.

Para la inserción de los fragmentos de interés en los vectores se usó la cepa quimiocompetente Dh5 α de *Escherichia coli* y la cepa electrocompetente de *A. tumefaciens* EHA 105.

Se trabajo con 2 plásmidos: el pBIN19 que no contiene el gen marcador dentro del ADN-T y el plásmido pBIN20, que contiene el gen de resistencia a kanamicina.

El gen *RB* fue proporcionado por la Universidad de Wisconsin al Laboratorio de Biotecnología Aplicada del CIP dentro del plásmido pSPUD6 (Figura N°1), el cual contiene un fragmento de 8,569 pb correspondiente a la región del gen *RB*.

Las cepas utilizadas para este trabajo se encuentran almacenadas a -70°C en forma criopreservada y son parte de la colección de bacterias del laboratorio de Biotecnología Aplicada del Centro Internacional de la Papa.

3.2 Métodos

3.2.1 Propagación *in vitro* del material vegetal

Las variedades Désirée y Revolución fueron obtenidas del Banco de Germoplasma del CIP, en tubos de vidrio conteniendo el medio de conservación M43 (Tabla N°1). Cada plántula fue cortada en varios segmentos o esquejes, a partir de la tercera parte superior del tallo, aproximadamente 5mm de longitud, conteniendo un nudo (meristemo) al cual previamente se le cortaron las hojas. Estos fueron sembrados en número de doce, en cajas plásticas (Phytatray™ II de Sigma-Aldrich), conteniendo 70 ml del medio de propagación MSA (Tabla N°2), para luego ser colocados en cámaras de crecimiento con las

siguientes condiciones: 20 a 22°C de temperatura, 16 horas de fotoperíodo, 3,000 lux de intensidad lumínica y 60 a 70 % de humedad relativa, durante 4 semanas.

Las plántulas de la variedad Revolución propagadas *in vitro* no mostraron un crecimiento apropiado, por lo que se probaron los siguientes medios:

- Medio MS sólido + vitaminas + 0.04 ppm de AG3 + sucrosa
- Medio MS sólido + vitaminas + 0.02 ppm de AG3 + sucrosa
- Medio MS líquido + vitamina + sucrosa
- Medio MS sólido + STOCK MS Control

Para la propagación en el medio líquido se tomaron 8 esquejes de 6 cm de longitud desde la parte superior (Figura N°2) y fueron colocadas en las cajas plásticas (Figura N°3).

La variedad Désirée, se propagó en medio MS semisólido estandarizado en el Centro Internacional de la Papa (CIP).

3.2.2 Estandarización de la concentración de antibiótico

Para controlar el desarrollo de *A. tumefaciens* después de la transformación se trabajó con dos tipos de antibióticos (Carbenicilina y cefotaxima) a varias concentraciones, en el medio de regeneración Wilmitzer (Tabla N°3).

Los antibióticos carbenicilina y cefotaxima fueron estudiados a una concentración de 200, 300, 400, 500, 600, y 800 ppm. Estas pruebas solo se realizaron en la variedad Revolución.

Se realizó una simulación de transformación con *A. tumefaciens* cepa EHA105 (cepa supervirulenta), el material a infectar fueron hojas y nudos de la variedad Revolución de 3 semanas de propagado que fueron colocadas en placas Petri con el medio de regeneración más el antibiótico en estudio y se evaluaron cada 3 días.

En el caso de la variedad Désirée se tomó una concentración de 200 ppm de carbenicilina ya establecida en trabajos anteriores para ambas cepas (LBA4404 y EHA 105), en el medio de regeneración Willmitzer.

3.2.3 Construcción del plásmido quimérico

3.2.3.1 Extracción del ADN plasmídico de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* con los plásmidos pCIP56 y pBIN20 se sembraron en tubos plásticos de 15 ml conteniendo 7 ml del medio LB líquido (anexo 1) y 100 ppm de kanamicina, incubados a 37°C con agitación (Series 25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) a 250 rpm, durante toda la noche.

En la mañana siguiente 2 ml del cultivo bacteriano fueron transferidos a tubos Eppendorf y centrifugados a

14,000 rpm por 5 min (Centrífuga Eppendorf 5415D). El sobrenadante fue eliminado, luego se agregó 2ml más del cultivo bacteriano y se volvió a centrifugar; este paso se repitió por 4 veces hasta obtener una cantidad apropiada del sedimento. Luego se procedió a realizar la extracción de ADN plasmídico con el kit de extracción de ADN Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)

3.2.3.2 Electroforesis

Una vez obtenido el ADN plásmidico se procedió a verificar la calidad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con 1µl de bromuro de etidio (Tabla N° 4) en buffer TBE (Tabla N°5) al 1X. La corrida se llevó a cabo en una cámara electroforética horizontal. Los pocillos del gel fueron cargados con 10ul de la muestra conteniendo 2ul del ADN plasmídico y 8ul de SALB 1X (Tabla N°6) como colorante de carga.

En el primer pozo se cargó 10ul del fago λ digerido con la enzima de restricción *Pst*I (promega) como marcador de peso molecular (tabla N° 7).

Las muestras fueron corridas a 80 voltios por media hora, con una fuente de poder (modelo 250, BRL Life Technologies), finalmente las muestras fueron visualizadas en un transluminador de luz UV (EpiChemin Darkroom), para ser cuantificadas.

3.2.3.3 Digestión del ADN plasmídico con enzimas de restricción

Este paso se llevó a cabo con el propósito de extraer el gen de interés (*RB*) del vector pCIP56 y preparar el vector binario pBIN20 para insertarle dicho gen.

El programa Vector NTI 10 (Invitrogen) fue utilizado para identificar los sitios de corte de cada plásmido y el peso molecular de los fragmentos que serían digeridos. El cual sirvió para el diseño de la construcción.

Se realizó un corte en el vector pCIP56 con las enzimas XmaI y ScaI, para aislar sólo el gen de interés (Figura N°4). Asimismo en el vector binario pBIN20 se realizó el corte con las enzimas ya mencionadas que cortan en el sitio de clonación múltiple (Figura N°5). Se utilizó una concentración de 1 unidad de enzima por cada 1ug de ADN.

Las condiciones de la reacción de digestión fueron:

DIGESTIÓN pCIP56		DIGESTIÓN pBIN20	
80	μl DNA	80	μl DNA
2	μl SacI	4	μl SacI
4	μl XmaI	8	μl XmaI
11	μl buffer 10 x	12	μl buffer 10 x
1	μl buffer 10 x	12	μl buffer 10 x
2	μl NFW*	4	μl NFW*
110μl V. final		120μl V. final	

*Agua libre de nucleasa (Nuclease Free Water)

Las muestras fueron incubadas a 37°C y almacenadas por toda la noche en una incubadora (Gravity Convection Incubator, Presicion Scientific). Al día siguiente se realizó una corrida electroforética de las muestras en un gel de agarosa al 1%, para visualizar los fragmentos obtenidos en la reacción.

Luego de verificar el tamaño de los fragmentos obtenidos se preparó un gel de agarosa al 1% manteniendo las mismas condiciones descritas anteriormente, pero esta vez se juntaron seis peines con cinta adhesiva para tener

un pozo con mayor capacidad de almacenamiento, en este caso se añadió todo el contenido del

ADN digerido con las enzimas de restricción antes mencionadas, luego de la corrida electroforética se comprobó el tamaño de las bandas en cada digestión.

3.2.3.4 Purificación de las bandas de interés

Luego de haber digerido las muestras y corridas en un gel de agarosa se procedió al corte de las bandas de interés (inserto y vector) con un bisturí. Los fragmentos fueron depositados en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml (Eppendorf). Las bandas contenidas en éstos fragmentos fueron purificadas con el kit de purificación Wizard® SV Gel and PCR clean-up System (Promega), luego 5 ul del producto fueron corridos nuevamente en un gel de agarosa al 1% para verificar la purificación y cuantificar el ADN recuperado.

3.2.3.5 Ligación de los fragmentos

Los fragmentos obtenidos de la purificación anteriormente descrita, fueron ligados usando la enzima T4 DNA ligasa (Promega) a una concentración de 1 unidad por cada 1ug del vector.

Se utilizó la proporción 1:3 (vector: inserto) calculada por la fórmula siguiente:

$$\frac{100 \text{ ng vector} \times \text{tamaño del inserto en kb} \times \text{promedio molar de 3 (inserto)}}{\text{kb} \times \text{ng del inserto tamaño del vector en 1 (vector)}}$$

$$\frac{120 \text{ ng} \times 8.605 \times 3}{\text{ng inserto } 11.808} = 262$$

Reacción de Ligación:

Inserto	:	25 µl
Vector	:	3 µl
Buffer 10x	:	4 µl
T4 DNA ligase	:	1 µl (400U/µl)
Agua NFW	:	7 µl
<hr/>		
Volumen final	:	40 µl

La reacción fue incubada a 4°C en una refrigeradora (Isotemp Laboratory Refrigerador, FISCHER SCIENTIFIC) por 24 horas.

3.2.4 Transformación y clonamiento de los fragmentos de interés

3.2.4.1 Transformación de *E. coli* por choque térmico

Este método consiste en la introducción del producto de ligación, al interior de la célula bacteriana de *E. coli* quimiocompetente cepa DH5 α .

- Se utilizaron células quimiocompetentes (100ul), mantenidos a -70°C en tubos criogénicos, al momento de sacar los tubos, éstas se mantuvieron en hielo para que las células no sufran un cambio brusco de temperatura.
- Se añadió 10ul del producto de ligación por tubo con las células quimiocompetentes.
- Seguidamente fueron incubados en hielo por 30 minutos.
- Inmediatamente se colocaron en baño maría a 42°C (RM6, MGW LAUDA) por un minuto.
- Nuevamente fueron colocados en hielo por un tiempo de 5 minutos.
- Luego se añadió en una cámara de flujo laminar 400ul de medio SOC (Anexo 9) y se incubo a 37°C por una hora en una incubadora en agitación (Serie 25 Incubator Shaker, NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC) por el lapso de una hora a 250 rpm.
- Finalmente el caldo de cultivo fue sembrado en una placa con medio LB semisólido más 100 ppm de kanamicina y se incubaron a 37°C (Gravity Convection Incubator, Precision Scientific) por toda la noche.

De las células que crecieron en el medio LB se tomaron colonias al azar, para realizar la extracción de ADN plasmídico y determinar si el plásmido fue incorporado.

3.2.4.2 Extracción de ADN plasmídico de *Agrobacterium*

De un cultivo de *A. tumefaciens* se tomo una colonia y se inoculó dentro de un tubo de 15ml conteniendo 6ml de medio LB con 100 ppm de kanamicina y se incubo a 28°C en agitación por 48 horas.

- Se transfirió el cultivo líquido en tubos Eppendorf de 2ml de capacidad.
- Las células bacterianas fueron centrifugadas a 14,000 rpm por 1min y se descartó el sobrenadante.
- Luego se añadió 150ul de la solución I (Tabla N° 8) y el precipitado fue disuelto en un agitador VORTEX-GENIE 2 ®.
- Se añadió 4mg/ml de lisozima a la solución de trabajo y se incubo a temperatura ambiente por 10min.
- Después de la incubación se agrego 250ul de la solución II (Tabla N° 9) y se mezclo por inversión.
- Se incubo por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se añadió 30ul de fenol alcalino y se mezclo por agitación.
- Se agrego 200ul de la solución III (Tabla N° 10) y se mezclo por inversión del tubo.
- Las muestras fueron incubadas a -20°C por 20 min.
- Seguidamente se centrifugo a 14,000 rpm por 5 min.
- Luego se trasfirió el sobrenadante a un tubo de centrifuga de 1.5ml.

- Se añadió 400ul de fenol-cloroformo y se mezcló por agitación.
- Las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm por 5 min y luego se colectó la fase de arriba.
- Se añadió 800µl de etanol absoluto que fue previamente enfriado y se mezcló por inversión.
- Las muestras fueron colocadas a -70°C por 30 minutos para que el ADN precipite.
- El precipitado fue centrifugado a 14,000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante.
- El precipitado fue lavado con 250ul de etanol frío al 70%.
- Se decantó el etanol y los tubos se invirtieron con la tapa abierta para evaporar los restos de etanol a temperatura ambiente.

Finalmente se disolvió el ADN en 30ul de agua libre de nucleasas.

3.2.4.3 Electroporación

La electroporación se desarrolló utilizando células electrocompetentes DH5α a éstas se le añadieron 1.5 ul de ADN plasmídico para un volumen total de 40 ul.

- Utilizando una pipeta Pasteur se transfirió el contenido a una cubeta de electroporación seca. La cubeta se colocó en un equipo para electroporar *E. coli* pulser (BIO-RAD) a 2.5

k.V. aproximadamente por 5 seg.

- Luego de la electroporación la cubeta fue colocada en la cámara de flujo laminar y se le añadió 600ul del medio SOC, se homogenizo y se transfirió con la ayuda de una pipeta Pasteur el contenido a un tubo estéril que fue incubado a 37°C por una hora.
- Finalmente se sembró en placas con medio LB más kanamicina.
- Se seleccionaron al azar las colonias que crecieron en medio LB con antibiótico, para comprobar la inserción del plásmido.

3.2.4.4 Análisis con enzimas de restricción

Para determinar la inserción del plásmido tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens* se realizó una extracción de ADN plasmídico y luego se digirió con enzimas de restricción que cortan en sitios del gen *RB*.

3.2.4.5 Conservación de las cepas bacterianas

Comprobado la integración del plásmido con el gen *RB* en *E. coli* y en *A. tumefaciens*. Las cepas fueron preparadas para ser conservadas a -70°C, para ello las bacterias fueron cultivadas en medio LB líquido y dispensadas en tubos criogénicos con glicerol a una concentración final del 20% previo a su almacenamiento a -70°C en una ultracongeladora (CFC Free, SANYO). Mientras que las cepas de uso frecuente se mantuvieron en placas Petri con medio LB semisolido a 4°C en una

refrigeradora (Isotemp Laboratory Refrigerador, Fisher Scientific) y en el caso de uso inmediato las cepas se conservaron en medio LB líquido en tubos de 15ml (FALCON) a 4°C.

3.2.5 Cultivo de bacterias

Para la transformación genética de la variedad Revolución, se utilizó *A. tumefaciens* cepa LBA4404, con el plásmido pCIP56.

Las bacterias fueron cultivadas en 25ml de medio LB semisólido con 100ppm de kanamicina en placas Petri (Polystyrene Size 100 x 15mm, American Precision Plastics) e incubadas a 28°C por 48 horas (Gravity Convection Incubator, Precision Scientific), pasado este tiempo, con un asa de siembra se aisló una de las colonias y se procedió a inocularlas en un tubo de 15ml conteniendo 6ml de medio líquido con 100ppm kanamicina. Las bacterias fueron incubadas a 28°C durante 24 horas en agitación constante a 250ppm.

3.2.5.1 Lectura de la curva de crecimiento

Pasada las 24 horas se tomó del cultivo bacteriano 100ul y se diluyeron con 900ul de agua destilada (dilución 1:10), esta dilución fue leída en el espectrofotómetro a 620nm. Estos valores permitieron conocer la concentración de bacterias en el cultivo. La lectura se tomó cada 60min hasta obtener una concentración aproximada de 5×10^7 bacteria/ml, luego el cultivo bacteriano se centrifugo a 5000rpm por 15min, se descartó el sobrenadante y el

precipitado fue resuspendido en el medio de cultivo MS líquido.

3.2.6 Transformación genética

3.2.6.1 Transformación genética vía infección indirecta

Se trabajó con plántulas de la variedad Revolución de 24 días de micropropagadas, las cuales fueron cortadas con ayuda de un bisturí en la base de la hoja y en los entrenudos, luego fueron introducidos en los tubos con suspensión bacteriana por 60min, seguidamente fueron colocados en papel filtro por 5min para eliminar el excedente de la suspensión bacteriana, pasado este tiempo los explantes fueron colocados en medio MSA con papel filtro en la superficie y se dejaron en oscuridad (tapados con papel aluminio) por 24 horas a 18-21°C y 70% de humedad relativa. Además se cortaron plántulas control a las que no se le infectaron con *Agrobacterium*, pero pasaron por un proceso similar a las transformadas para que se encuentren bajo las mismas condiciones de estrés.

3.2.6.2 Transformación vía infección directa

Para este método no se utilizó una concentración fija de *A. tumefaciens*, solo se cortaron las hojas y entrenudos de las variedades Revolución y Désirée con un bisturí el cual fue infectado con *A. tumefaciens* de un cultivo en placa petri de 24 horas de incubado. El corte de las hojas se realizó en el pecíolo y después de tres cortes se pasó nuevamente la cuchilla sobre una colonia de *A. tumefaciens* infectándolo para realizar nuevos cortes, las hojas y entrenudos fueron colocados en medio MSA por 24 horas.

3.2.6.3 Regeneración

Transcurrido las 24 horas los explantes fueron transferidos al medio de regeneración willmitzer con 800ppm de cefotaxima en la variedad Revolución. Cada 2 semanas el medio fue renovado cambiando de placas a los explantes, proceso que se repitió hasta la formación de callos y la obtención de regenerantes, para ambos métodos de transformación (Figura N°7 y 8).

Los regenerantes de aproximadamente 5cm de longitud fueron transferidos a tubos de vidrio con 6ml de medio MSA, para su desarrollo y posterior análisis.

3.2.7 Análisis molecular

3.2.7.1 Extracción de ADN vegetal a pequeña escala

Debido a la cantidad de explantes que se tenían que analizar se decidió hacer una mezcla de éstos, es decir en un tubo de 2ml se colocaban de 5 a 10 hojas de diferentes muestras para permitir hacer un análisis más rápido.

La extracción del ADN vegetal se llevó a cabo por el método CTAB (Tabla N° 11) a pequeña escala.

- Se cortaron hojas provenientes de los regenerantes y se colocaron en tubos eppendorf esterilizados de 2ml.
- Seguidamente se agregó 450ul de la mezcla tampón de extracción CTAB 2X + β -mercaptoetanol(añadir 2ul de β -mercaptoetanol por cada 700ul de CTAB 2x).

- Se colocaron unas esferas de cerámica previamente esterilizadas dentro de los tubos.
- Los tubos fueron colocados en la trituradora (savant Fast prep, thermo).
- Las muestras fueron molidas dos veces por 20 segundos a 4 m/seg.
- Las muestras luego de triturarlas se incubaron a 65° C x 30min, agitando los tubos de forma manual los 5 primeros minutos y luego cada 10min.
- Se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 5min.
- Se agregó 900ul de cloroformo: alcohol Isoamílico (24:1) agitando los tubos por inversión hasta homogenizarlo completamente.
- Se centrifugaron a 14,000rpm por 10min, se retiraron suavemente los tubos para evitar mezclar las fases formadas.
- El sobrenadante fue transferido con cuidado de no tocar la interfase a tubos de 1.5ml (eppendorf), con puntas cortadas (tips).
- Se agregó 0.6 volúmenes de Isopropanol previamente enfriado y mezclándolo suavemente con el sobrenadante.
- Luego se incubaron a -20°C por 20 minutos.
- Se centrifugaron a 14,000rpm por 20 minutos.
- El Isopropanol fue decantado quedando solo el precipitado y luego se invirtieron los tubos sobre papel toalla y se dejó secar el precipitado.
- Se agregó 1ml de etanol al 70% hasta desprender el pellet de la base del tubo y se centrifugó a 14,000rpm/15min.
- El etanol fue descartado dejando solo el pellet y se seco invirtiendo el tubo sobre papel toalla.

- Luego se agrego etanol al 100%, se agitó suavemente las muestras hasta desprender el pellet de la base.
- Se centrifugó a 14,000rpm por 10 min.
- El etanol se descarto con cuidado de no botar el pellet y luego se invirtieron los tubos en papel toalla hasta la completa eliminación del etanol.
- Se dejo secar el pellet en un liofilizador por 10 min.
- El pellet fue resuspendido en 30ul de agua libre de nucleasas (sigma).
- Se agrego 3ul de ARNasa a las muestras, y se agitaron suavemente.
- Las muestras fueron incubadas a 37°C por 60 min.
- Se corrió 1ul de cada muestra en un gel de agarosa al 1% para determinar la calidad de ADN.
- Finalmente las muestras fueron almacenadas a -20C.

3.2.7.1 Diseño de cebadores

Para el análisis molecular se diseñaron cebadores específicos al constructo que lleva el gen *RB*, esto se realizó con un programa bioinformático Vector NTI 10 (Invitrogen) y la secuencia del gen *RB* de *Solanum bulbocastanum* fue obtenida de la base de datos del NCBI (National Center Biotechnology for Information), así mismo se realizó una comparación de las secuencias utilizando el programa BLAST ®.

Los cebadores utilizados para el análisis molecular se encuentran descritos en la tabla N°12

3.2.7.2 Análisis por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Para comprobar la inserción del gen, las muestras de ADN de las plantas regenerados resultado de la transformación, fueron analizadas por PCR con los cebadores anteriormente mencionados.

Las condiciones de las reacciones para la mezcla de los reactivos y su concentración se encuentran detallados en la tabla N°13, los programas de amplificación como condiciones de temperatura y tiempo se encuentran detalladas en la tabla N° 14.

Se empleo el termociclador modelo Mastercycler Gradient (Eppendorf) para las pruebas de gradientes y el modelo PTC 100 de MJ Research Inc, para el PCR de las muestras.

3.2.7.3 Extracción de ADN vegetal a mediana escala

La extracción del ADN genómico se desarrollo por el método CTAB. Para ello se cortaron plántulas jóvenes, propagadas *in vitro*. Estas fueron colocadas en un mortero pre-enfriado a -70°C y pulverizadas con la ayuda de nitrógeno líquido, luego fue transferido a un tubo de 50ml (Falcon), con 20ml de tampón de extracción CTAB y 200ul de β -mercaptoetanol. En seguida la solución fue homogenizada por inversión durante 5min seguidamente se incubó a 65°C durante 30min en baño maría mezclándolo por inversión con un intervalo de 5min, luego se enfrió a temperatura ambiente por 10min, transcurrido este tiempo

se añadieron 20ml de Cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) y mezclándolo suavemente por inversión por 5min.

Las muestras así preparadas fueron centrifugadas a 6,000 rpm por 20min, para separarlo en dos fases (acuosa e inorgánica), la fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo de 50ml, este paso se repitió una vez más, hasta obtener nuevamente la fase acuosa la cual fue transferida a un tubo de 50ml con 15ml de isopropanol frío, el contenido se mezcló por inversión y se incubó a -20°C por 2 horas, luego de las cuales las muestras fueron centrifugadas a 5,000rpm por 30min. (Varifuge RF, HERAEUS SEPATECH). A continuación el sobrenadante fue descartado y el precipitado fue transferido a un tubo de microcentrifuga de 1.5ul.

Al tubo con el precipitado se le agregó 300ul de la solución de lavado I (Tabla N° 15) el contenido se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se agregó 300µl de solución de lavado II (Tabla N° 16), nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm por 5min y se descartó el sobrenadante, dejando secar el pellet y disolverlo en 300ul de agua libre de nucleasa (sigma ®).

Se añadió 5ul de RNasa a una concentración de 10ug/ml y fueron incubadas a 37°C por 60min. Finalmente las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis.

3.2.8. Hibridación por “*Southern blot*”

Esta prueba sirvió para observar la presencia o ausencia del gen *RB* dentro del genoma de las plantas putativamente transgénicas, así como también el número de copias insertadas del transgén en cada una de las líneas transgénicas.

3.2.8.1 Digestión con enzimas de restricción

El ADN genómico de las variedades Revolución y Désirée fueron digeridos con la enzima *Eco RI*.

Después de la extracción a mediana escala se realizó la prueba de calidad para cuantificar el ADN genómico, la reacción de digestión se llevo con una concentración de 15ng de ADN.

3.2.8.2 Electroforesis

El producto de la digestión fue corrido en una cámara de fuente horizontal (Model H4, LIFE TECHNOLOGIES, en un gel de agarosa al 0.8 % con buffer TBE 1X. Los pozos fueron hechos con peines gruesos lo cual permitió introducir en cada uno de los pozos 50ul de la muestra incluyendo el buffer de carga. Como control positivo se añadió al último pozo 50pg de la sonda del gen *RB* y para el control negativo se añadió en el primer pozo ADN de un explante no transgénico. La corrida electroforética se realizó a 20 voltios durante la noche para que los fragmentos se separen. Al día siguiente el gel fue visualizado en el trasiluminador de UV.

(EPIQUEMIN) observándose la total digestión de las muestras para su posterior transferencia.

3.2.8.3 Transferencia

Las muestras de ADN digeridos contenidas en el gel de agarosa fueron transferidas a una membrana de nylon con carga positiva (Hybondt™ – N⁺ Amersham) de acuerdo con el siguiente protocolo:

- El gel de agarosa fue lavado 3 veces con 100ml de agua destilada.
- Se colocó el gel en un contenedor de vidrio con 300ml de HCL 0.25 N, agitándolo suavemente por 10min.
- Luego el gel fue lavado cuidadosamente con agua destilada.
- Seguidamente el gel se introdujo en 100ml de solución de denaturación (Tabla N° 17) agitando suavemente por 15min. Este paso se repitió una vez más.
- La solución fue retirada con cuidado y se añadió 100ml de tampón de neutralización (Tabla N° 18), agitándolo suavemente por 15min. Este paso se repitió una vez más.
- Se cortó una pieza de membrana de nylon del mismo tamaño del gel y se remojó en agua destilada, también se cortaron dos piezas de papel filtro Whatman 3MM del mismo tamaño del gel.
- La membrana y el papel filtro fueron remojadas en 20 X SSC.
- Se ensambló el sistema de transferencia, colocando la cara posterior del gel mirando hacia la membrana y sobre ello se colocó el papel absorbente. El sistema se dejó transfiriendo hasta el día siguiente.

- En la mañana siguiente se desarmó el sistema de transferencia y se colocó la membrana en la solución 5X SSC por algunos segundos.
- Finalmente la membrana se colocó sobre un papel filtro y se dejó secar por 5 min a temperatura ambiente con la cara del ADN hacia arriba.
- Para fijar el ADN a la membrana, ésta fue expuesta por 24 segundos a la luz ultravioleta, a 120,000 milijoules, en un crosslinker (Stratalinker 2400, Stratagene), también se fijo por un periodo de dos horas en un horno a 80°C.
- La membrana fue luego cubierta con papel filtro y colocada dentro de un sobre de aluminio para luego ser almacenada a temperatura ambiente hasta el momento de la hibridación.

3.2.8.4 Preparación de la sonda

La sonda se obtuvo a partir del producto amplificado por PCR del ADN plasmídico pCIP56. Los cebadores utilizados para la amplificación fueron los de la región borde LB (Figura N° 9).

LB-F	TCCTGTTTGATGGTGGTTCCGA
LB-R	TCTCCCTTCCTTTCTCGCCA

El producto fue corrido en un gel de agarosa al 1% y el fragmento fue recuperado del gel mediante el kit de purificación de bandas Wizard® SV Gel and PCR clean-up System (Promega). Se corrió un gel de agarosa al 1% con 2ul

de muestra recuperada para cuantificarla y hacer una dilución hasta obtener 100pg de la sonda.

3.2.8.5 Marcaje de la sonda

Se diluyó la sonda de ADN a una concentración de 25ng en 45ul de buffer TE (10mM Tris ®-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA). Luego la sonda fue denaturada poniendo el tubo en agua 100°C por 5min, inmediatamente se colocó en hielo por 5min. Se centrifugó brevemente para que el contenido baje hasta la base del tubo.

La sonda denaturada fue transferida al tubo de reacción del kit Rediprimer™ II DNA labeling System (Amersham) el cual contenía una solución de dATP, dGTP, dTTP, enzima Klenow libre de exonucleasas y cebadores al azar. A esta mezcla se le añadió 5ul de 10 uCi/ul [³²P] – dCTP, se mezcló por pipeteo y se dejó incubar a 37°C por 1h. Para detener la reacción se agregó 5ul de 0.2 M de EDTA.

La sonda radioactiva fue denaturada colocando el tubo en agua hirviendo por 5min y luego en hielo por 5min. El contenido del tubo fue centrifugado por 30 seg.

3.2.8.5.1 Pre- hibridación

Se utilizó un buffer de pre-hibridación el cual fue pre-calentado a 65°C en un tubo de hibridación para luego introducir la membrana. El volumen del buffer va de acuerdo

al tamaño de la membrana 0.125ml de buffer por 1cm² de membrana. La prehibridación se realizó a 65°C por una hora en el horno de hibridación bajo agitación constante. Luego se realizaron lavados detallados en la tabla N° 19.

3.2.8.5.2 Hibridación

La sonda radioactiva denaturada fue incorporada a la botella de hibridación conteniendo la membrana y el buffer de hibridación y se dejó a 65°C con agitación, por toda la noche en el horno de hibridación.

Al día siguiente se realizaron los lavados de acuerdo a la tabla N° 20.

Se pasó un detector de radioactividad (Geiger-Muller radioactivity) por la superficie de la membrana para evaluar la intensidad de la señal de radioactividad y decidir la necesidad de lavados adicionales.

3.2.8.5.3 Autoradiografía

La membrana fue forrada con plástico Saran® wrap y sellada por los bordes para evitar que se seque. Las burbujas de aire fueron removidas.

La membrana forrada fue colocada en un cassette para fósforo 32. En un cuarto oscuro, se colocó una película radiográfica en el cassette y luego de cerrarlo se procedió a forrarlo con papel aluminio y almacenarlo a -70°C hasta su revelado (2 a 3 días dependiendo de la intensidad de la radioactividad).

Para revelar la película se uso una solución convencional de revelador y fijador (Kodak GBX developer y Kodak fixer, Sigma). La película fue colocada por un minuto en revelador hasta observar las bandas claramente; luego fue lavado con agua en una bandeja por un minuto y finalmente fue colocada en una bandeja con fijador por un minuto. Todo esto se realizó en un cuarto oscuro.

III. RESULTADOS

4.1 Propagación del material *in vitro*

La variedad Revolución en el medio MSA luego de 4 semanas de propagado, presentó un escaso desarrollo de hojas y tallos (Figura N° 10) y como tal no podían ser utilizadas en las pruebas de estandarización de los antibióticos, ni para los eventos de transformación. Razón por la cual se elaboró un medio MSA de micropropagación.

El medio MSA enriquecido con vitaminas y con 0.04ppm de AG3 provocó una rápida elongación de las plántulas con tallos delgados y hojas pequeñas, (Figura N° 11).

En el medio MSA enriquecido con vitaminas y con 0.02ppm de AG3, sólo desarrollaron las hojas y no se observó la elongación del tallo, (Figura N° 12).

En el medio control MSA con vitaminas, el desarrollo de los tallos tuvieron un tamaño promedio de 4.5 cm con hojas pequeñas, (Figura N° 13).

El cultivo en medio líquido MS con vitaminas y en agitación, presentó un mejor desarrollo de las plántulas, observando una elongación de los tallos en menor tiempo, con hojas grandes y vigorosas comparadas con las plántulas en el medio control (Figura N°14).

4.1.1 Estandarización de la concentración de los antibióticos

A una concentración de 200ppm para ambos antibióticos (carbenicilina y cefotaxina) las hojas y entrenudos de la variedad Revolución formaron callos después de la tercera semana de cultivo, pero la contaminación con *A. tumefaciens* fue del 100% por lo que los explantes fueron descartados.

Las concentraciones de 300, 400 y 500ppm de carbenicilina resultaron ser tóxicos para los explantes, ocasionando la mortandad en un periodo de tres semanas, sin embargo estas concentraciones no fueron suficientes para controlar el crecimiento de *A. tumefaciens* cepa EHA 105.

Las concentraciones de 300 y 400ppm de cefotaxima causaron daño en las hojas, sin embargo los entrenudos se mantuvieron viables, pero para ambas concentraciones la contaminación con *A. tumefaciens* persistía.

Con una concentración de 500ppm de cefotaxima tanto las hojas, como los entrenudos formaron callos en tres semanas pero no se logro controlar el crecimiento bacteriano.

Con una concentración con 600ppm de cefotaxima hubo un mejor desarrollo de los callos, comparando con el control y la contaminación por *A. tumefaciens* fue controlada.

Finalmente el ensayo con una concentración de 800ppm de cefotaxima resultó ser la más adecuada ya que el crecimiento de *A. tumefaciens* cepa EHA105 fue controlado totalmente y los explantes formaron callos y regeneraron plántulas en menor tiempo (Figura N° 15).

4.2 Construcción del plásmido quimérico

Las muestras de ADN obtenidas del vector pCIP56 y del vector pBIN20 fueron corridas por electroforesis en un gel de agarosa para observar la calidad y cuantificarlas por densitometría (según la intensidad de las bandas) resultando una concentración de 20ng/ul para el vector pCIP56 y 40ng/ul del vector pBIN20.

También se pudo observar que el tamaño molecular del vector pBIN20 fue mayor al correspondiente vector pCIP56 (Figura N° 16).

4.2.1 Digestión del ADN plasmídico

Después de realizada la digestión con las enzimas XmaI y SacI de los plásmidos pCIP56 y pBIN20, se realizó la corrida electroforética en un gel de agarosa al 0.8 y al 1%, respectivamente para cada vector. En el plásmido pCIP56 se observaron dos bandas con diferentes tamaños, una de 9,371pb y la otra con un tamaño de 8,559pb, luego en la muestra del plásmido pBIN20 se observó una banda de 11.808pb y otra pequeña de 232pb, estos resultados fueron comparados con la simulación realizada en el programa Vector NTI 10, las cuales confirmaron la presencia

de las bandas antes mencionadas en los plásmidos correspondientes (Figura N° 17).

4.2.2 Transformación y clonamiento de los fragmentos

Luego de la transformación genética, para introducir el constructo (plásmido) en *E. coli* mediante choque térmico, se escogieron al azar 28 colonias de *E. coli* crecidas en placas Petri conteniendo medio LB más 100ppm de kanamicina, a las cuales se les extrajo el ADN plasmídico. A continuación fueron corridas por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, donde se logró determinar la calidad de los mismos, además se determinó que la muestra 26 tenía mayor tamaño que las demás indicando la inserción del constructo (Figura N° 18).

Para comprobar la ligación del inserto al vector se digirieron cuatro muestras de plásmidos incluyendo la muestra 26 con las enzimas de restricción PstI y SacI, la digestión fue corrida en un gel de agarosa al 1%, donde se observó 3 fragmentos en la muestra 26 y 2 fragmentos en las demás. Según la simulación realizada con el programa Vector NTI 10 (Invitrogen), solo la muestra número 26, coincidía con la digestión simulada, por lo tanto, la muestra 26 resultó tener incorporado el vector más el fragmento de interés (Figura N° 19).

La transformación también fue realizada en células de *A. tumefaciens* cepa EHA105 con la construcción pCIP60, para ello se realizó una digestión de los plásmidos en *A. tumefaciens* con las enzimas PstI y SacI, donde se verificó la

inserción del constructo pCIP60 con el inserto, en la cual también se observó los 3 fragmentos esperados (Figura N° 20), lo que demuestra la inserción del constructo en *A. tumefaciens*.

4.3 Transformación genética

4.3.1 Regeneración

En la variedad Revolución, como producto de la transformación con *A. tumefaciens* cepa LBA4404 y la construcción pCIP56, por el método de transformación indirecta se obtuvieron 276 regenerantes. Y como resultado de la transformación con *A. tumefaciens* cepa EHA105, con la construcción pCIP56 por el método de transformación vía indirecta se obtuvieron 5,318 regenerantes.

En la variedad Désirée del evento de transformación con *A. tumefaciens* cepa EHA 105, con la construcción pCIP60 por el método de transformación directa, se obtuvieron 14 regenerantes (Figura N°21).

4.4 Análisis molecular

4.4.1 Extracción de ADN vegetal a pequeña escala

Con el método de extracción con CTAB a pequeña escala se obtuvieron concentraciones de ADN de buena calidad, aproximadamente 280 a 400ng por 1ul en todas las

muestras (Figura N°22), comparadas con la concentración del fago lambda (280ng), digerida con la enzima PstI, que se observó en el gel de agarosa (Figura N°23).

4.4.2 Diseño de cebadores

Se diseñaron y probaron varios cebadores pero solo cuatro fueron de interés.

La primera pareja de cebadores (LB borde) amplificaban un fragmento de 300pb del borde izquierdo del vector, es decir no amplificaba ninguna región del gen de interés. En las pruebas de amplificación usando el control positivo (ADN del plásmido de *Agrobacterium* con la construcción que lleva el gen de interés) se obtuvo la amplificación del fragmento esperado y en los controles negativos (ADN de plantas no sometidas a la transformación genética) no se observó amplificación.

La segunda pareja de cebadores que se utilizaron fue Km1, los cuales amplificaban un fragmento de 563pb. En la región del gen de resistencia a kanamicina cerca del borde izquierdo del ADN-T. Estos también fueron probados con los mismos controles negativos y positivos explicados anteriormente. Solo amplificaron los controles positivos de *A. tumefaciens* que llevan en su construcción el gen de resistencia a kanamicina además del gen de interés.

La tercera pareja de cebadores utilizados amplificaba una región fuera del ADN-T, en el gen de resistencia a

kanamicina *nptII* del vector de clonación, produciendo un fragmento de 488pb. Estos cebadores fueron diseñados para descartar los falsos positivos que aparecieran con los cebadores descritos en el párrafo anterior. Estos cebadores solo amplificaron con las muestras de plantas contaminadas con *A. tumefaciens* que lleva el gen de interés y con los controles positivos.

La cuarta pareja de cebadores utilizada fue, la diseñada por Colton de la Universidad de Wisconsin. Siendo ésta una pareja de cebadores específico para el gen *RB*, los resultados demostraron todo lo contrario, los controles negativos de Désirée y Revolución amplificaron con estos cebadores y los controles positivos *Solanum bulbocastanum* y plásmidos con el gen *RB* también amplificaron, por tanto esta pareja de cebadores fueron descartados en esta investigación por no ser de confianza.

4.4.3 Caracterización molecular por PCR

Se realizó una mezcla de muestras de ADN provenientes de las plantas transformadas para determinar la cantidad de muestras que se podían amplificar en un tubo y detectar el gen de interés, sin tener ningún problema de detección. Esto se logro realizar con un total de 10 muestras de ADN diferentes colocadas en un tubo.

En las pruebas de transformación en la variedad Revolución con *A. tumefaciens* cepa LBA4404 no se obtuvieron líneas transgénicas según las pruebas realizadas con el cebador LB borde (Figura N° 24).

En los eventos de transformación con la cepa EHA105 en la variedad Revolución se obtuvieron falsos positivos, es decir que aún mantenían incorporado *A. tumefaciens* en sus hojas y entrenudos (Figura N° 25), lo cual fue confirmado por pruebas con otros cebadores.

Se analizaron un total de 475 muestras, resultando 6 de ellas positivas para la amplificación con el par de cebadores LB borde. Sin embargo, éstas muestras fueron descartadas por ser falsos positivos dado que también amplificaron con el cebador *nptII* fuera del ADN-T, es decir eran contaminadas y se corroboró con los resultados de Southern blot.

Para los eventos de transformación en las variedades en estudio con *A. tumefaciens* cepa EHA 105 se utilizaron los cebadores LB borde, Km1 y *nptII*.

Se evaluaron 5,318 muestras de la variedad Revolución por PCR con el cebador LB borde, pero no se obtuvo ningún transgénico.

Para la variedad Désirée se evaluaron 120 explantes con el cebador LB borde, en la cual amplificaron 14 muestras, éstas fueron evaluadas con el cebador Km1 obteniendo 12 positivos (Figura N°26) mientras que con el cebador *nptII* se obtuvo 3 positivos (Figura N°27).

Los productos de amplificación de las muestras con cada pareja de cebadores fueron evaluados en un gel de agarosa al 1%, donde en todos los casos el primer carril correspondió al marcador lambda, digerido con la enzima pstI (Figura N° 28, 29 y 30).

4.4.4 Caracterización molecular por Southern blot

Se usó el método de extracción a mediana escala para obtener una mayor concentración de ADN de las 12 líneas putativamente transgénicas de Désirée (Figura N° 31) que fueron analizadas por Southern blot.

El ADN de las 12 líneas de la variedad Désirée putativamente transgénicas, así como el de Désirée control fueron digeridos con la enzima EcoRI, (Figura N° 32) para determinar el número de copias con la sonda marcada, la cual según la simulación realizada con el programa vector NTI 10, se esperaba que tengan un tamaño de 756pb como mínimo para determinar el número de copias.

El resultado de la digestión fue homogénea para las 12 muestras más el control, mostrados en la figura N° 32.

Para la transferencia de ADN en el gel de agarosa se cargaron 20ug de ADN digerido de cada una de las líneas putativamente transgénicas y del control negativo. Además se usó como control positivo una dilución de la sonda. La sonda fue obtenida por PCR usando para ello el ADN plásmidico de pCIP56 y amplificado con el cebador LB.

La verificación del tamaño del amplicón (300pb) producto del PCR, fue desarrollado corriendo en un gel de agarosa al 1%. La banda correspondiente a la sonda fue recuperada del gel y cuantificada, obteniéndose una concentración de 10ng/ul (Figura N°33). Seguidamente, se procedió a marcaje radiactivo.

Los resultados del Southern blot demuestran que de las 12 líneas analizadas por PCR, 10 fueron positivas y 4 de éstas presentaron una doble inserción del gen (líneas 27, 50, 62 y 67). Además, los patrones observados en cada una de las líneas positivas fueron diferentes entre si, lo que indica que se trató de eventos de inserción independientes. Las líneas 47 y 83 resultaron negativas en las 3 pruebas de southern blot realizadas (Figura N°34). La línea 53 se perdió, por contaminación de las plántulas.

IV. DISCUSIÓN

En el proceso del mejoramiento genético de plantas utilizando la biotecnología moderna mediada por *A. tumefaciens* es importante eliminar el vector de transformación, luego de la modificación genética para evitar falsos positivos. En nuestro trabajo empleamos concentraciones diferentes de carbenicilina y cefotaxima, antibióticos para el control del crecimiento de *Agrobacterium* en cultivo de plantas genéticamente modificadas. Estos antibióticos al igual que vancomicina son comúnmente utilizados en el cultivo celular de plantas (Nauerby et al., 1997). Concentraciones diferentes de éstos antibióticos han probado ser eficaces en la eliminación de *Agrobacterium*, de acuerdo a la virulencia de la cepa bacteriana y a la especie de planta con la cual se trabaje (Da Silva, Fukai 2001).

En el presente trabajo con una concentración de 800 ppm de cefotaxima se logro controlar en forma satisfactoria el crecimiento de *A. tumefaciens*, que a su vez influyo en el tiempo de regeneración en la variedad Revolución. Por otra parte, concentraciones mayores de 300 a 800 ppm de carbenicilina ocasionaron necrosis en la mayoría de los explantes y los que sobrevivieron presentaron una escasa regeneración. Estos resultados corroboran los estudios realizados por Jhy-Jhu y colaboradores quienes determinaron que las plantas aprovecharían dichos antibióticos como fitohormonas debido a su estructura química, similar a las auxinas, lo cual influencia en el medio

de regeneración, pero son dependiente de cada especie (Jhy. et al ., 1995).

En la variedad Désirée una concentración de 200ppm de carbenicilina fue suficiente para eliminar *A. tumefaciens* y la regeneración de los explantes no fueron afectados por la toxicidad del antibiótico. Concentraciones mayores de éste antibiótico resultaron ser fitotóxicas y provocaron la muerte de los explantes. En trabajos anteriores han probado concentraciones desde 0.5 a 500 ppm de carbenicilina y cefotaxima en *Arabidopsis thaliana*, demostrando que la cefotaxima es más eficiente contra *A. tumefaciens* y que la carbenicilina tiene un efecto toxico a una concentración de 250 ppm en combinación con la fitohormona 2,4 D en hojas de Tabaco, produciendo necrosis (Jhy, et al., 1995).

La transformación genética mediante el protocolo de infección directa fue eficiente en la variedad Désirée (8.3% de eficiencia) más no en la variedad Revolución. Estos resultados corroboran que no todas las variedades presentan la misma capacidad para aceptar la inserción de un gen foráneo y así mismo no regeneran igual bajo las mismas condiciones, la capacidad de regeneración y la eficiencia de transformación no están correlacionadas, son de factores diferentes controlados genéticamente (Heeres et al., 2002).

Esta variedad ha sido empleada en experimentos de producción y evaluación de transgénicos en laboratorio, invernadero y campo (Dale & Mc Partlan, 1992), ha sido

ampliamente utilizada en experimentos de transformación genética por tener una alta capacidad de regeneración y de transformación (Dale & Hampson, 1995).

Generalmente la transformación genética en células vegetales mediada por *A. tumefaciens* ocurre a muy baja frecuencia, es por ello que se utilizan frecuentemente los genes marcadores para identificar a las plantas transgénicas. Varios genes que codifican para resistencias a herbicidas y antibióticos han sido utilizados con este propósito (Bevan, 1983). Las dos construcciones que se utilizaron en el presente trabajo, una con el gen marcador de selección (kanamicina) y la otra libre de marcador de selección, presentaron diferentes eficiencias de transformación.

Los porcentajes de eficiencia de transformación reportados en trabajos previos realizados en papa usando un gen marcador de selección varían de 0.3 a 8.1 % (Visser et al., 1989), de 2 a 13 % (Newell et al., 1991) y de 1 a 5 % según el genotipo utilizado (Vetten 2003). Así mismo la frecuencia de transgénicos analizados por PCR con una cepa super virulenta como la AGLO o la EHA 105 es de 1.3% a 5.6% y para la cepa LBA4404 es de 0 % a 0.8% dependiendo del genotipo de papa usado en ambos casos (Vetten, et al., 2003). Por consiguiente se esperaría un porcentaje similar a la eficiencia de transformación con la construcción sin marcador de selección con la diferencia que el escrutinio para identificar los regenerantes transformados resulta mucho más trabajoso, debido a que se requiere analizar molecularmente todos los regenerantes. En el presente trabajo los eventos de

transformación con la construcción libre de marcador de selección fueron hechos únicamente con la variedad Revolución, las mismas fueron analizadas por PCR para un total de 5,318 explantes, ninguno de ellas presentaron el gen de interés. Sin embargo en los eventos de transformación realizados en la variedad Désirée con la construcción pCIP60 conteniendo el gen marcador de selección la eficiencia de transformación obtenida fue de 8.3% de los 120 explantes, regenerando un total de 14 explantes independientes en medio de cultivo con kanamicina.

La ineficiencia de obtención de transgénicos en la variedad Revolución usando las cepas LBA4404 y EHA105, con dos métodos de transformación probados, puede deberse a que estos métodos no sean apropiados para esta variedad, ya que la eficiencia de transformación depende del genotipo usado y de la variabilidad somaclonal, lo cual se puede verificar en trabajos anteriores (Effat, et al., 2008), así mismo el inserto que debía de ingresar dentro del genoma de la planta tiene un tamaño de aproximadamente 8.5 kb resultando ser grande y quizás inestable en el momento de ser introducido dentro de las células de esta variedad. Un problema de selección también pudo haber alterado los resultados al momento de realizar las pruebas por PCR, por lo que los cebadores utilizados inicialmente reportaban falsos positivos.

En la identificación de los transgénicos por PCR, el gen *RB* juega un papel muy importante para su identificación, debido que tiene una alta tasa de secuencias conservadas, por lo que no es fácil encontrar secuencias

que sean específicos para este gen *RB*. En este trabajo se diseñaron varios cebadores con la finalidad de amplificar el gen *RB*, pero no se obtuvo una secuencia altamente específica. Se probaron varias secuencias, pero estas amplificaban con controles negativos tanto para la variedad Désirée como para la variedad Revolución por lo que no eran confiables para las pruebas por PCR, estas secuencias de cebadores también fueron analizadas por el programa BLAST, lo cual mostró una alta similitud entre las secuencias del gen *RB* y las secuencias del genoma de la papa. Los genes *RB* de resistencia análogos (RGA) presentan una similaridad en su secuencia entre 69 al 79%, mientras que el gen *RB* (resistente) y el gen *rb* (susceptible) tienen un 99.8% de secuencia similar, obstaculizando la identificación por PCR, sin embargo fueron desarrollados marcadores moleculares para la selección del gen *RB* por Colton. Uno de estos cebadores (el más eficiente: cebador RB) fue probado en nuestro trabajo, bajo las mismas condiciones reportadas en el trabajo de Colton pero no se logro obtener los mismos resultados ya que las plantas de la variedad Désirée y la variedad Revolución no transformados amplificaban como un falso positivo, por lo que se realizo un análisis en el programa BLAST, el cual nos mostró un 89% de identidad con *Solanum tuberosum*.

En el presente trabajo solamente se utilizaron los cebadores de la región RGA2 borde, Km1 y nptII para seleccionar los transgénicos.

Las pruebas de hibridación por Southern blot confirmaron la presencia del gen *RB* en las diferentes

líneas de la variedad Désirée putativamente transformados. Diez de estas líneas fueron claramente confirmadas para el gen RB. Las diferentes bandas que presentaron las líneas, indican que estas provienen de diferentes eventos de inserción, lo cual demuestra que no son clones, también se observó en seis de estas líneas una sola banda hibridizada, lo que determina que hay una sola copia del gen *RB* dentro de todo el genoma de la planta transformada. Cuatro de las líneas mostraron la presencia de 2 bandas representando la integración de dos copias del gen en el genoma de la papa.

Las demás líneas que dieron positivo por PCR pero no hibridizaron por Southern blot, nos hace suponer que en algunos de estos casos la inserción del ADN-T no fue completa.

V. CONCLUSIONES

- Se logró controlar la presencia del vector de transformación *A. tumefaciens* cepa EHA105 utilizados en la modificación genética de la variedad Revolución, con una concentración de 800ppm de cefotaxima.
- Se determinó en la variedad Revolución, que el antibiótico cefotaxina a una concentración de 800ppm actúa como fitohormona en la regeneración de los explantes y el antibiótico carbanecilina a una concentración de 400-800ppm tiene un efecto fitotóxico.
- No se logró insertar el gen *RB* en la variedad Revolución, mediante los dos métodos de transformación directa e indirecta con la construcción pCIP56 y pCIP60.
- Se logró incorporar el gen *RB* en la variedad Désirée, utilizando la construcción pCIP68.
- Se logró estandarizar el protocolo de transformación genético por el método de infección directa para la variedad Désirée.
- La eficiencia de transformación con la construcción pCIP68 utilizando el método de infección directa con la cepa EHA 105 de

A. tumefaciens fue del 8.3% en la variedad Désirée. Lo que indica una alta eficiencia de transformación, reafirmando que la eficiencia está relacionada con el genotipo con la cual se trabaja.

VI. RECOMENDACIONES

- Probar otros métodos de transformación genética en la variedad Revolución para la inserción del gen *RB*.
- Diseñar una construcción con el sistema *cre loxp*, para eliminar el gen marcador de selección y quede solo el gen de interés *RB*.
- Realizar más procesos de transformación en la variedad Désirée con el protocolo estandarizado en el presente trabajo.
- Diseñar cebadores específicos para el gen *RB* que sirva para la selección de los transgénicos y para la diferenciación de haplotipos resistentes y susceptibles del gen *RB*.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Allen, Judith, Hardie, J. Sale, Marc, (1965). British atlas of potato varieties. Potato Marketing Board.
2. Auroi, Claude (1986). Difusión de variedades mejoradas de papa en la sierra central del Perú y desaparición de las variedades nativas. 275-300.
3. Austin S., Baer M.A., Helgeson J.P. (1985). Transfer of resistance to potato leaf roll virus from *Solanum tuberosum* by somatic fusion. Plant Science 39: 75-82.
4. Austin S., Pholman J.D., Brown CR., Mojtahed H., Santo G.S., Douches D.S., Helgeson J.P. (1993). Interspecific somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum bulbocastanum*: incorporation of nematode resistance. Am Potato J 70: 485-495.
5. Baker B., Zambryski P., Staskawicz B., & Dinesh-Kumar S.P. (1997). Signaling in Plant-Microbe Interactions. Science 276, 726-733.
6. Bevan M., (1984). Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. Nucleic Acids Res. 12, 8711-8721.

7. Birch R.G., (1997). Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 297-326.
8. Bradeen J.M., Naess S.K., Song J., Haberlach G.T., Wielgus S.M., Buell C.R., Jiang J., Helgeson J.P. (2003). Concomitant reiterative BAC walking and fine genetic mapping enable physical map development for the broad-spectrum late blight resistance region, *RB*. *Journal Molecular Genetics and Genomics* 269: 603-611.
9. Bryant P. (2001). Biodiversity and conservation. A hipertext book. Chool of Biological Sciences, <http://darwin.bio.uci.edu/-sustain/bio65>.
10. Colton L., Groza I., Wielgus M., Jiang J., (2006). Marker-Assisted Selection for the Broad-Spectrum Potato Late Blight resistance Conferred by Gene *RB* Derived from a Wild Potato Species. *Crop Science Society of America* 46: 589-594.
11. Cuellar W., Gaudin A., Solórzano D., Casas A., Ñopo L., Chudalayandi P., Medrano G., Kreuzer J., Ghislain M. (2006). Self-excision of the antibiotic resistance gene *nptII* using a heat inducible *Cre-loxP* system from transgenic potato. *Plant Molecular Biology* 62:71-82.

12. Dale E., Ow D., (1991). Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. Proc Natl Acad Sci USA 88:10558-10562.
13. Dale P. J., J.A. Irwin & McPartlan (1992). Field Performance of transgenic potato plants compared with controls regenerated from tuber disc and shoots cuttings. Theor. Appl. Genet. 84:585-591.
14. Dale P.J. & Hampson K. (1995). An assessment of morphogenic and transformation efficiency in a range of varieties of potato (*Solanum tuberosum* L. Euphytica 85: 101- 108.
15. Daly D.C. (1996). The Leaf That Launched a Thousand Sips. In Natural History 24-35pp.
16. De la Puente F. Javier T., Quijandria R. (1974). Nuevas variedades de papa Revolución y mi Perú. Avances en Investigación (Perú). Ministerio de Agricultura vol 4-5, 2 :30- 32.
17. De la Riva G., González J., Vásquez R., Ayra C., (1998). *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. Electronic Journal of Biotechnology Vol.1 No.3 .

18. Effat Badr, Yasser Mabrouk, Farouk Rakha and Abdel-Halim Ghazy (2008). *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Potato and Analysis of Genomic Instability by RAPD. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4(1): 16-25.
19. Estrada R., N. (2000). *La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa*. CIP-IPGRI-PRACIPA-IBTA-PROINPA- COSUDE-CID. Edición de Hardy, B y Martinez 372 p.
20. Erwin D.C. and Ribeiro O.K. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*. Minesota. The American Phytopathological Society 2: 224-225 pp.
21. FAO(2008). <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/pdf/semipapa.pdf>
22. Flor H. H. (1954). Current status of the gen-for-gen concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.
23. Fry W. E. & Goodwin S.B. (1997). Resurgence of the Irish Potato Famine Fungus. *Bioscience* 6: 363-371.
24. Gelvin B. (2003). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 16-37.

25. Hamester W., Hils U., (2003). World catalogue of potato varieties. Agrimedia GmbH, Germany, 53-149.
26. Hawkes J. W. (1990). The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. Belhaven Press, London. BioScience 47:6.
42. Heeres P., Schippers-Rozenboom M., Jacobsen E., Viser R. (2002). Transformation of a large number of potato varieties: genotype-dependent variation in efficiency and somaclonal variability. Euphytica 124: 13-22.
27. Helgeson J.P., Pohlman JD., Austin S., Haberlach G.T., Wielgus., Ronis D., Zambolim L., Tooley P., McGrath J.M., James R.V., Stevenson W.R. (1997). Somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and potato: a new source of resistance to late blight. Theor Appl Genet (1998) 96: 738- 742.
28. Helgeson J.P. (1992). New genes for disease resistances through somatic hybridization. Netherlands J Plant Pathol 98 (suppl 2): 223-229.
29. Hermsen, J., Ramanna M. (1973). Double-bridge hybrids of *Solanum bulbocastanum* and cultivars of *Solanum tuberosum*. Euphytica 22: 457-466.

30. Hoekema A., Hirsch P., Hooykaas P., Schileperoort R. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir-and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti- plasmid. *Nature*, 303: 179-180.
31. Hood E., Gelvin., Melchers L., Hoekema A. (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res* 2: 208-218.
32. INIA. (1980) Principales Variedades Mejoradas y Nativas de Papa. Boletín técnico N°3.
33. Jhy-Jhu L., Nacyra Assad-Garcia, Jonathan Kuo (1995). Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. *Plant Science* 109: 171-177.
34. Johnston S., Sam den Nijs T.P.M., Peloquin S.J., Hanneman R.E.(1980). The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theor Appl Genet* 57:5- 9.
35. Kamoun S. (2002). Basic Biology: Information of Mechanisms thist make a Pathogen. In : GILB´02 Conference Late blight: Managing The Global Threat. Abstracts 11-13 July, Hamburg, Germany.
36. Komari T., Hiei Y., Saito Y., Murai N., Kumashiro T. (1996). Vector carrying two separate T-DNAs for co-

transformation of higher plants mediated by *Agroacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers Plant Journal 10: 165-174.

37. Lazo G., Stein P., Ludwig R. (1991). A DNA transformation- competent Arabidopsis genomic library in Agrobacterium. Biotechnology 9: 963-967.
38. Malcomson J. F. & Black W. (1966). New R genes in *Solanum demissum* Lindl. & Their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Euphytica 15: 199- 203.
39. Michelmore R. & Meyers B. (1998). Clusters of resistance genes in plant evolve by divergent selection and a birth-and- death process. Genome Res 8: 1113-1130.
40. Naess S. K., Bradeen J. M., Wielgus S. M., Haberlach G. T., McGrath J. M. Helgeson J. P. (2000). Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8. Theor Appl Genet. 101: 697-704.
41. Nauerby B., Billing & Wyndaele R. (1997). Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in

concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* 123:169-177.

42. Nick de Vetten, Wolters M., Raemakers K., Meer I., Stege R., Heeres., Heeres P., Visser R. (2003). A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nature Biotechnology* 21: 439-442.
43. NIVAP, (2007) Netherlands catalogue of potato varieties. Netherlands Potato Consultative Foundation 117.
44. Ochoa C. (1999). *Las Papas de Sudamerica Perú*. Editorial Allen Press, EE.UU. 1-16.
45. Raven P. H., Evert R. F., and Eichhorn S. E. (1999). *Biology of Plants*. Six edition New York Freeman and Company 994. pp370.
46. Reddick D. (1930). Frost-tolerant and blight-resistant potatoes. *Phytopathology* 20:987-991.
47. Sambrook, j. Russell D. (2001). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
48. Simons G., Groenendijk J., Wijbrandi J., Reijans M., Groenen J., Diergaarde P., Van der Lee, Bleeker M., Onstenk J., (1998). Dissection of the fusarium *I2* gene

cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell* 10: 1055-1068.

49. Smart C. D., Sandrock R. W., and Fry R. (2000). Molecular Techniques and Mystery of the Potato Late Blight Pathogen. *Plant-Microbe Interactions*. Vol 5 : 21-24.
50. Spooner D., Karen McLean, Gavin Ramsay, Robbie Waugh and Glenn Bryan (2005). A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *PNAS* 102: 14694 –14699.
51. Song Junqui, Bradeen M., Naess S.K., Raasch A., Wielgus M., Haberlach T., Liu J., Kuang H., Phillips A., Buell C., Helgeson J. P., Jiang J. (2003). Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *PNAS* 100: 9128-9133.
52. Teixeira da Silva J.A., Fukai S. (2001). The impact of carbenicillin, cefotaxime and vancomycin on chrysanthemum and tobacco TCL morphogenesis and *Agrobacterium* growth. *J. Appl. Hort.* 3:18-27.
53. Van der Vossen Edwin, Sikkema A., Heekert L., Gros J., Stevens P., Muskens M., Woouters D., Pereira A., Stiekma W., Allefs S., (2003). An ancient

R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. The Plant journal 36: 867-882.

54. Veluthambi K., Gupta K., Sharma A. (2003). The current status of plant transformation technologies. Current Science 84: 368-380.
55. Vleeshouwers V., Van Dooijeweert, Govers F., Kamoun S. And Colon L. (2000). The Hypersensitive Response is Associated with Host and Nonhost Resistance to *Phytophthora infestans*. Planta 210: 853-864.
56. Wastie, R. L. (1991). In *Phytophthora infestans: The Cause of Late Blight of Potato*, Advances in Plant Pathology, eds. Ingram, D. S. & Williams, P.H. vol. 7: 193-223.
57. Yong Wang, Chen B., Hu Y., Li J., Lin Z. (2005). Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the Cre//lox site-specific recombination system. Transgenic Research 14: 605-614.

VIII. ANEXO

9.1 Figuras

Secuencia genómica del gen *RB*

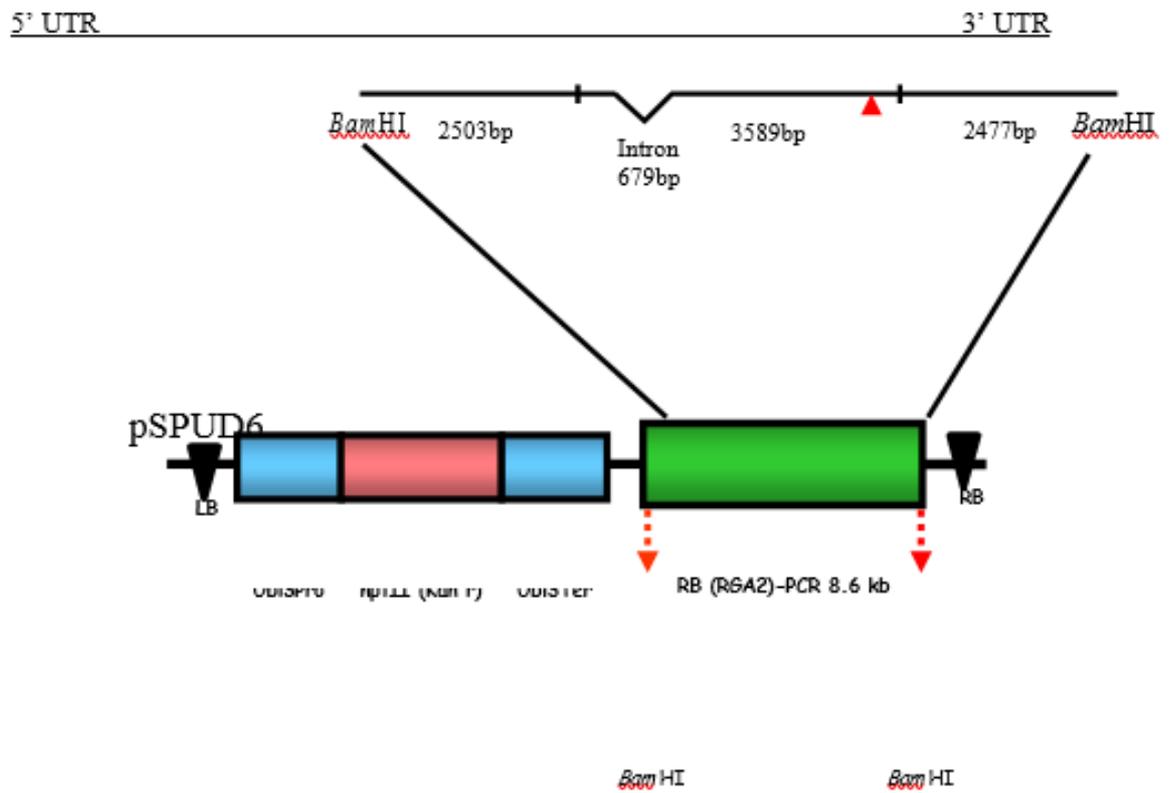


Figura 1. Mapa del plásmido pSPUD6 teniendo la región RB, (proporcionado por la Universidad de Wisconsin).



Figura 2. Esquejes de Revolución.

Figura 3. Esquejes sumergidos en el medio líquido.

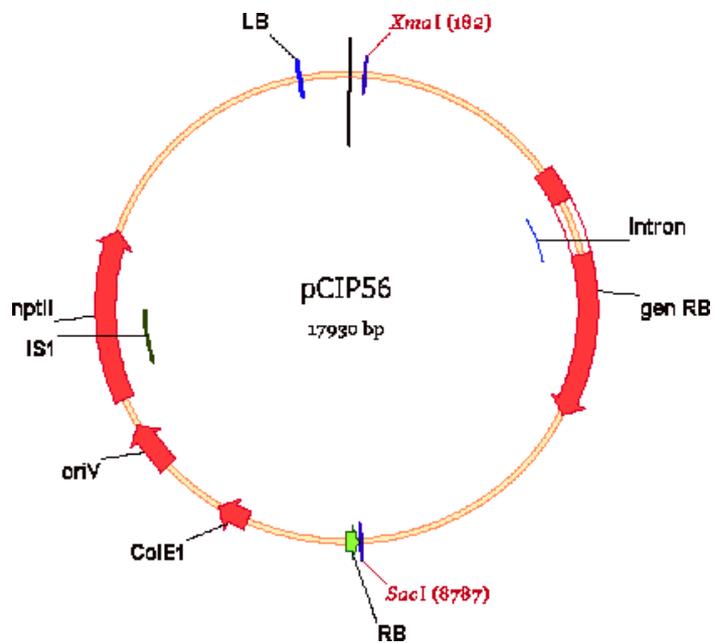


Figura 4. Diseño del constructor pCIP56 con los sitios de corte enzimáticos XmaI y SacI

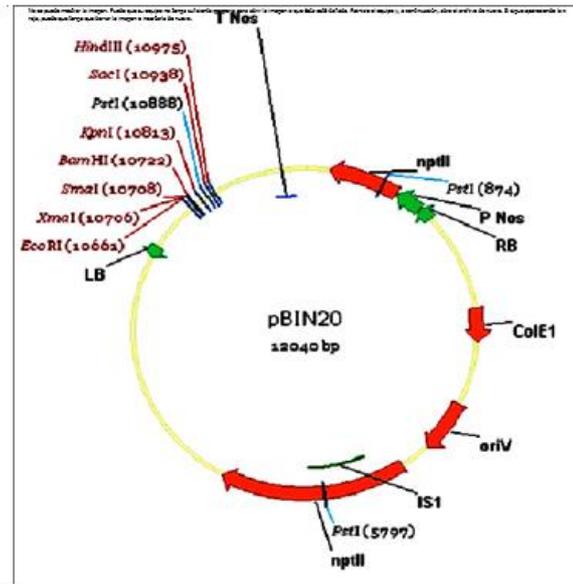


Figura 5. Diseño del constructor pBIN20 mostrando el sitio de clonamiento múltiple.

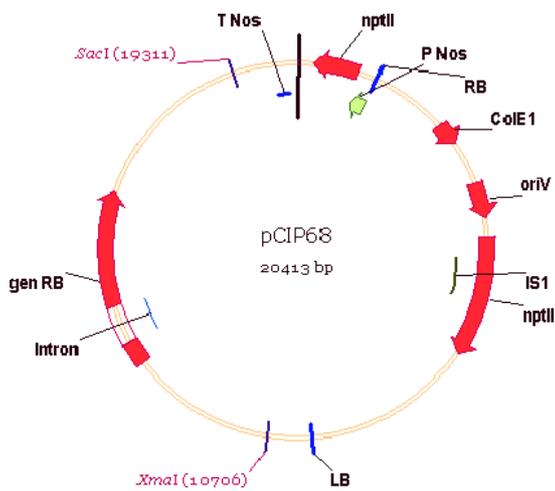


Figura 6. Diseño del nuevo constructor (pCIP68), conteniendo el gen *RB* introducido dentro del vector pBIN20.



Figura 7. Hojas de Revolución infectadas.



Figura 8. Hojas de Revolución con el pecíolo infectado.

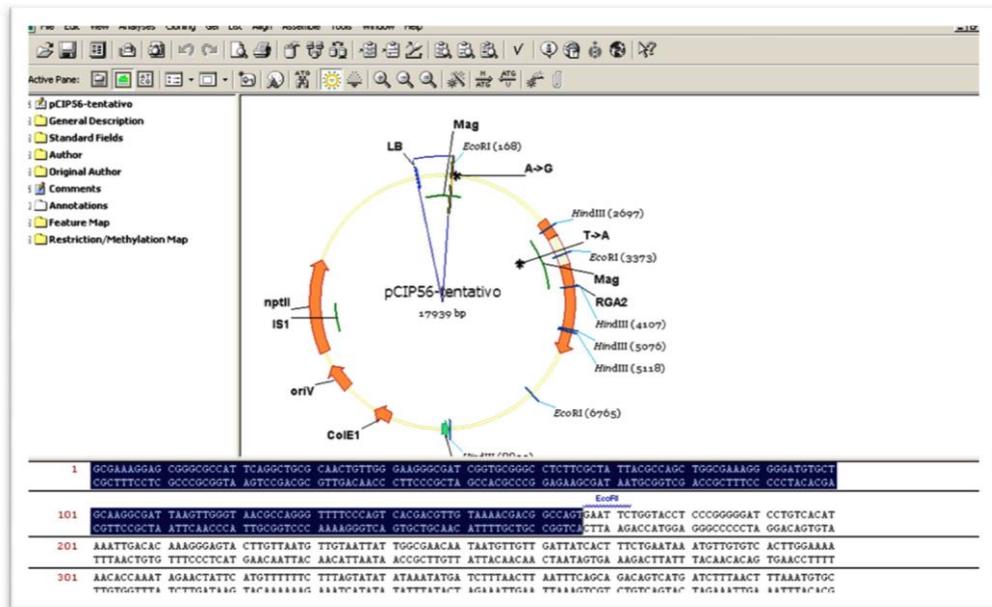


Figura 9. Cebador LB (Amplicón 300pb) para S. blot -Numero de copias- digerido con EcoRI (Tamaño esperado 756pb).

Micropropagación



Figura 10. Variedad Revolución después de 3 semanas de propagado

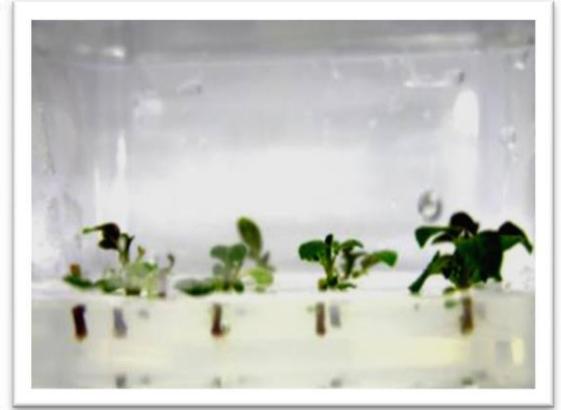


Figura 11. Medio MSA + 0.04 AG3

Figura 12. Medio MSA + 0.02 AG3



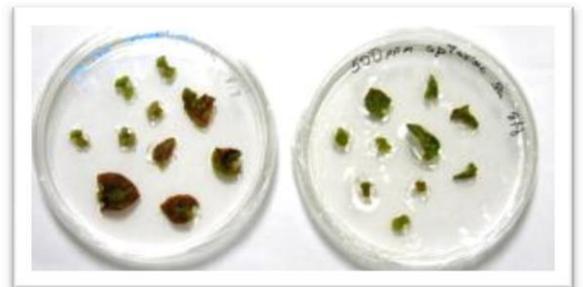
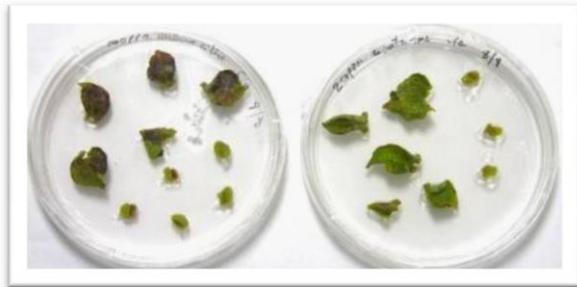
Figura 13. Medio control MSA

Figura 14. Medio liquido MS

Concentración de Antibióticos

Carbenicilina Cefotaxima

Carbenicilina Cefotaxima



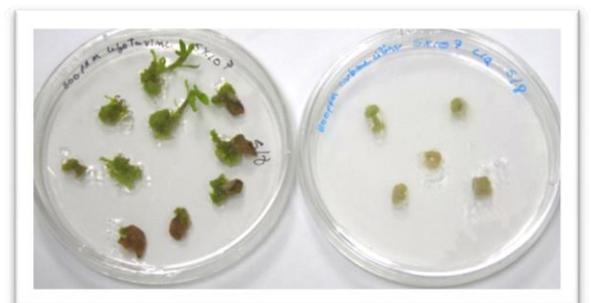
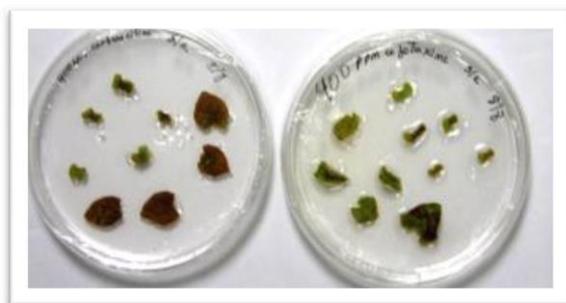
200 ppm

500 ppm



300 ppm

600 ppm



400 ppm

800 ppm

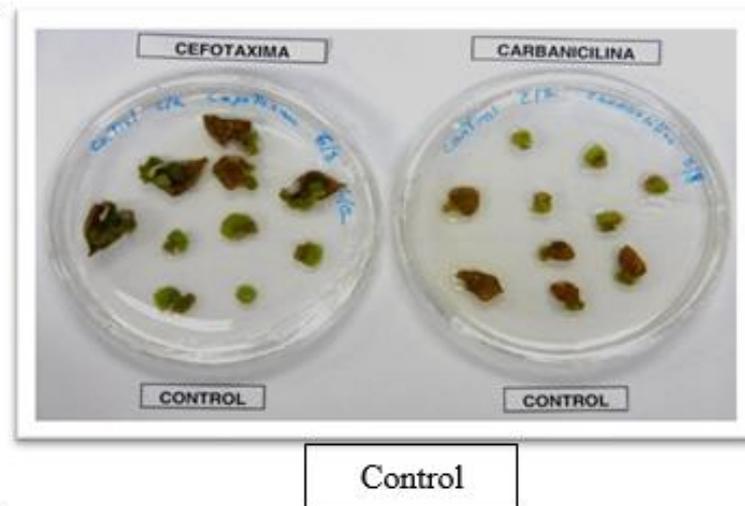


Figura 15. Determinación de la concentración óptima de antibióticos (carbenicilina y cefotaxima) en la variedad Revolución.

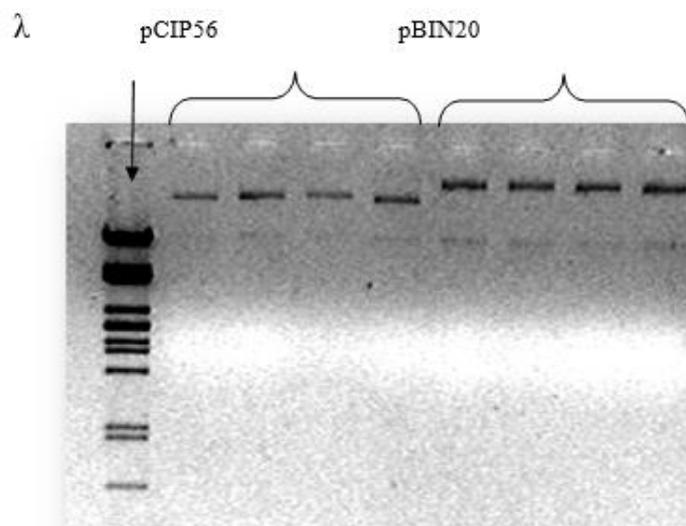


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, con muestras de ADN plasmídico de los vectores pCIP56 y pBIN20.

Digestión de plásmidos

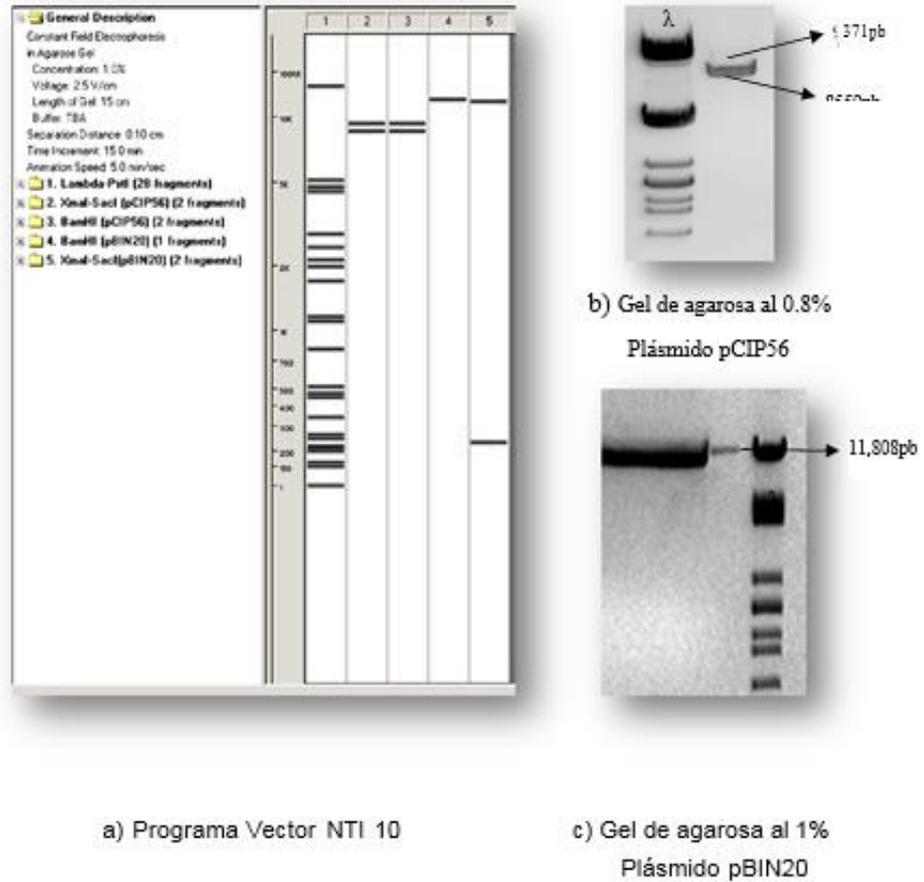


Figura 17. Comparación de los fragmentos observados entre el programa vector y los geles de agarosa. a) digestión virtual de los plásmidos pCIP56 y pBIN20 con las enzimas XmaI y SacI b) digestión del plásmido pCIP56 c) digestión del plásmido pBIN20.

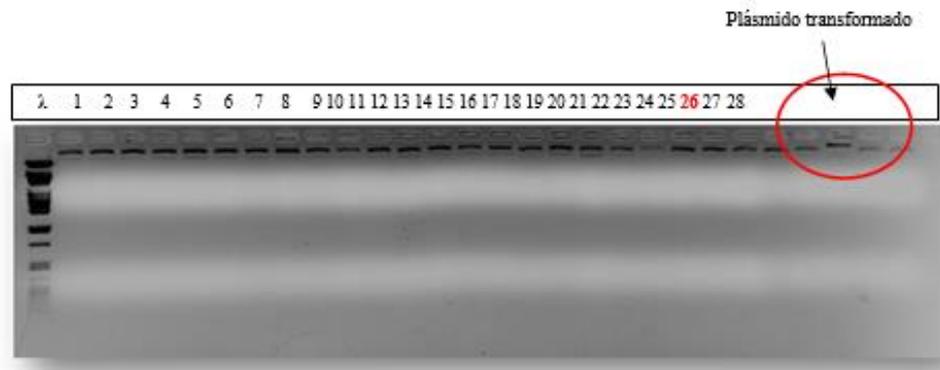


Figura 18. ADN plasmídico de muestras de *E.coli* después de la Ttransformación

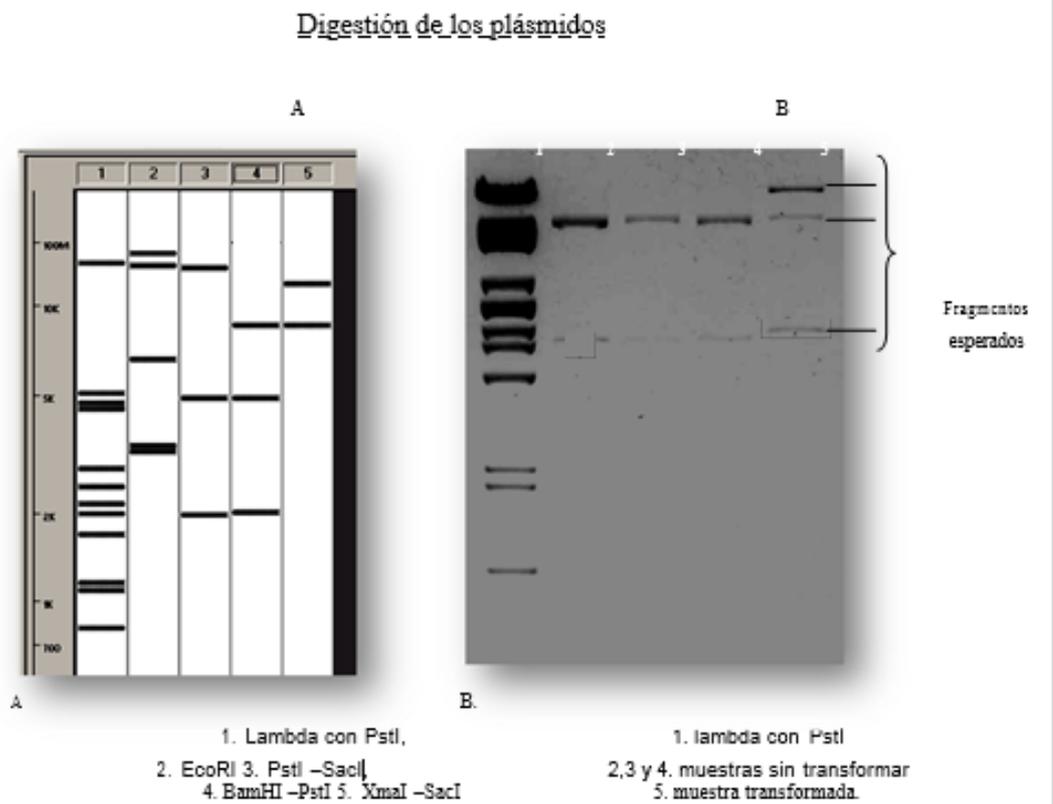


Figura 19. Digestión de los plásmidos: A) simulación de la digestión obtenida en el vector NTI 10.
B) muestras de ADN digeridas y corridas en gel de agarosa al 1%.

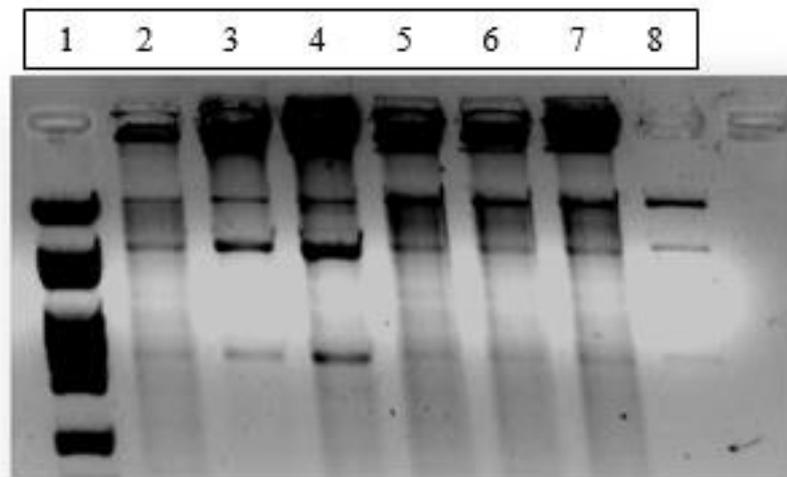


Figura 20. Digestión del ADN plasmídico de *A. tumefaciens* después de la transformación en gel de agarosa al 1%, 1.Lambda con PstI, 2,3,4,5,6 y 7 muestras de *A. tumefaciens*, transformadas, 8. *E.coli* transformado como control.

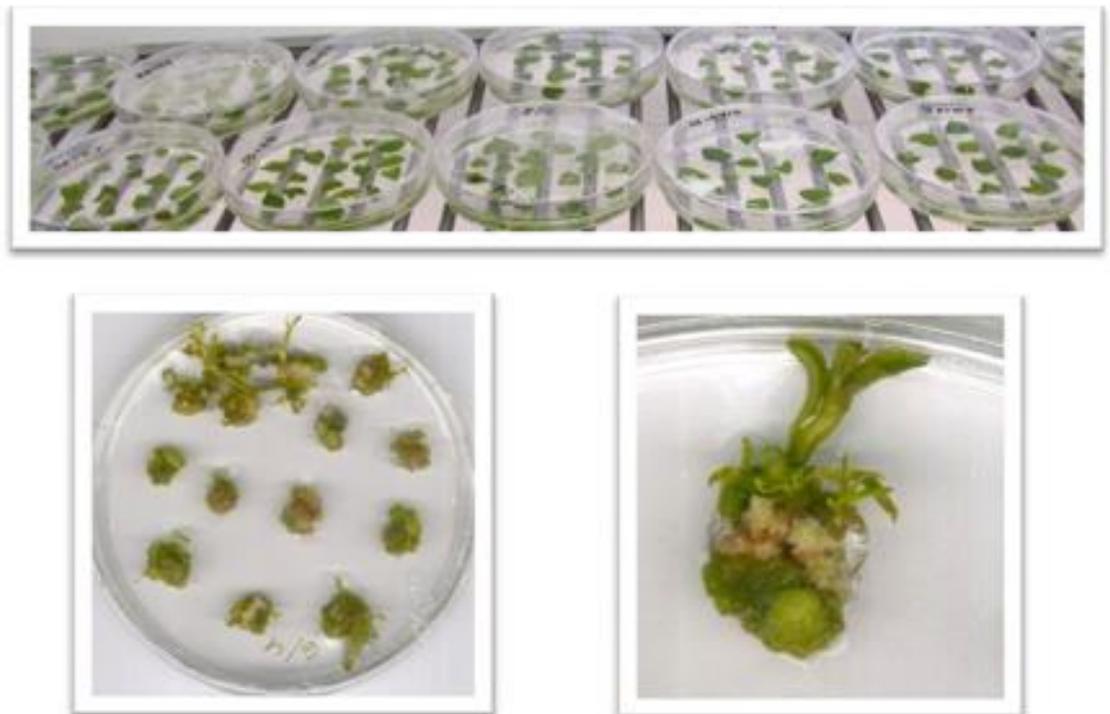


Figura 21. Regenerantes a partir de entrenudos después de la tercera semana de mantenerlos en medio de regeneración.



Figura 22. Muestras de plantas para extracción de ADN a pequeña escala.

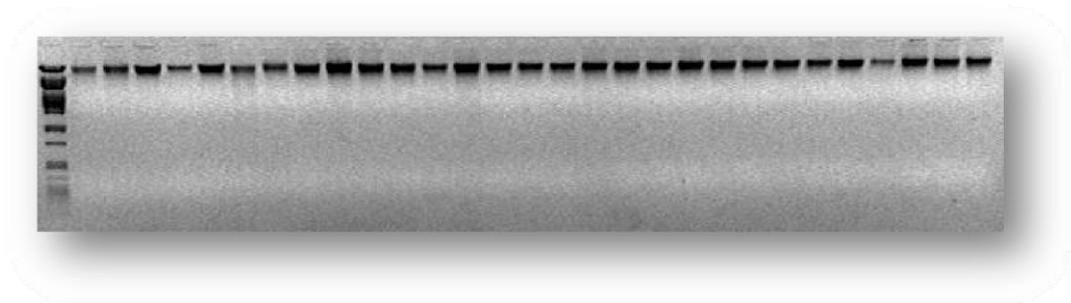


Figura 23. Corrida electroforética de muestras de ADN vegetal en gel de agarosa al 1 %.

Pruebas de PCR

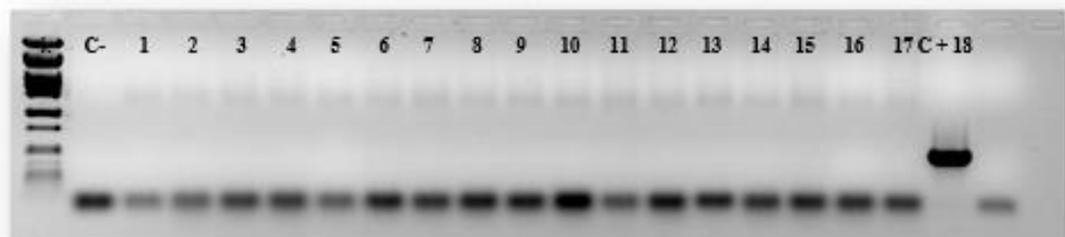


Figura 24. Gel de agarosa con muestras de ADN del primer evento de transformación en Revolución ningún amplificado positivo, solo se observa la amplificación del control positivo(C+) plásmido con la construcción pCIP56.

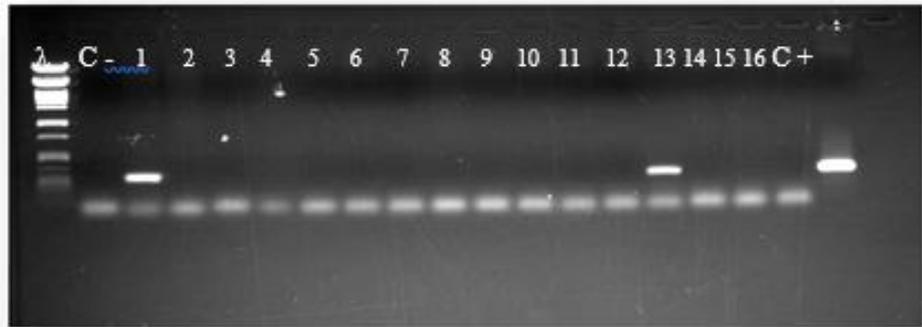


Figura 25. Muestras del evento de transformación con la cepa EHA 105 mostrando amplificados (falsos positivos), C- control negativo, C+ control positivo.

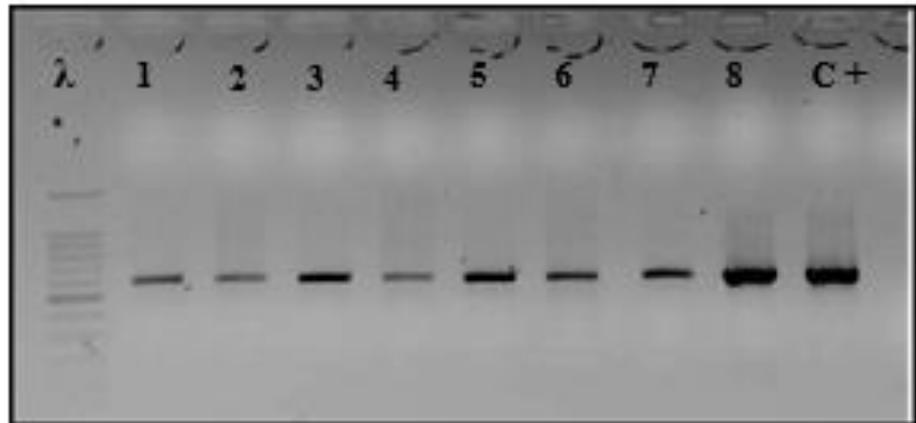


Figura 26. Amplificación de 8 muestras de Désirée de las 11 amplificadas con el cebador Km1 para confirmar los positivos.

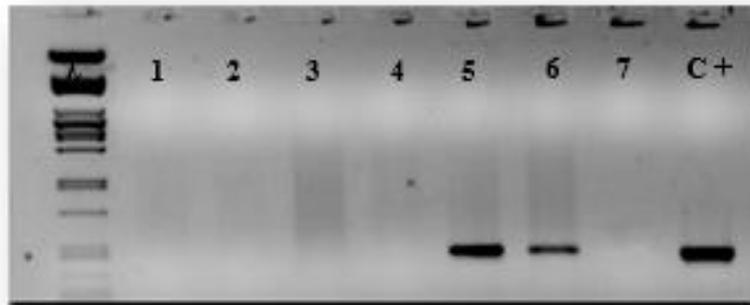


Figura 27. Muestras amplificadas con el cebador nptII. En total amplificaron 3 muestras de las 11 analizadas.

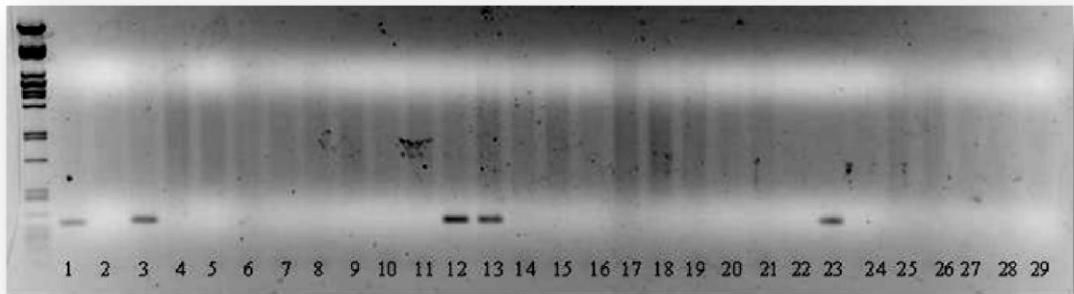


Figura 28. Amplificación positiva para las muestras 1, 3, 12, 13 y 23 Con el cebador LB borde.

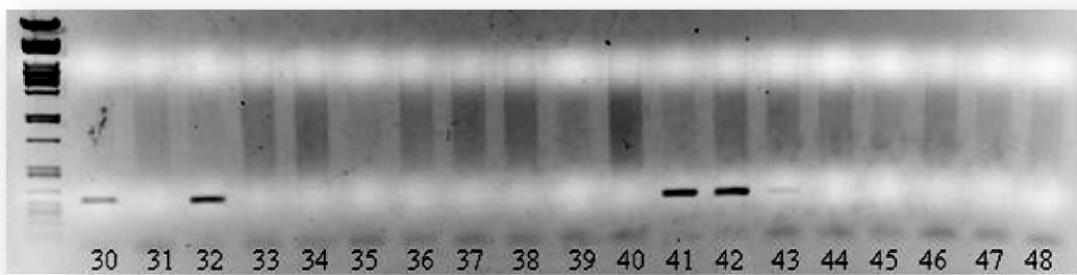


Figura 29. Muestras 30, 32, 41, 42 y 43, con amplificación positiva para el cebador LB borde.

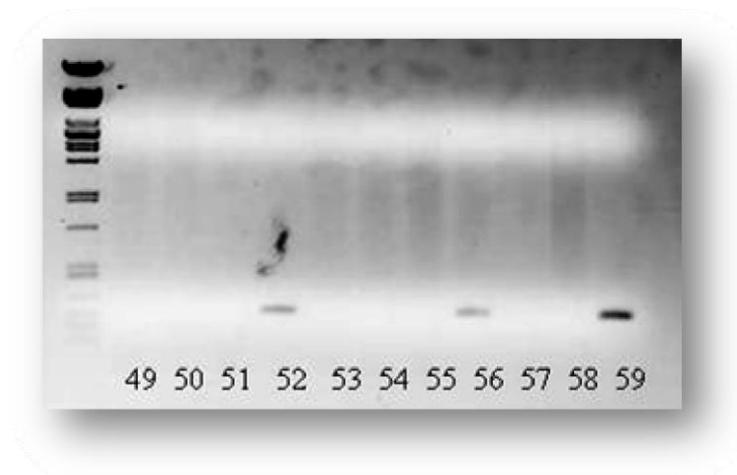


Figura 30. Muestras 52 y 56 con amplificación positiva para el par de cebadores LB borde. Carril 59 corresponde el control positivo (plásmido que contiene el gen de interés).



Figura 31. Líneas de Désirée transgénicas, propagadas para las pruebas de Southern blot.

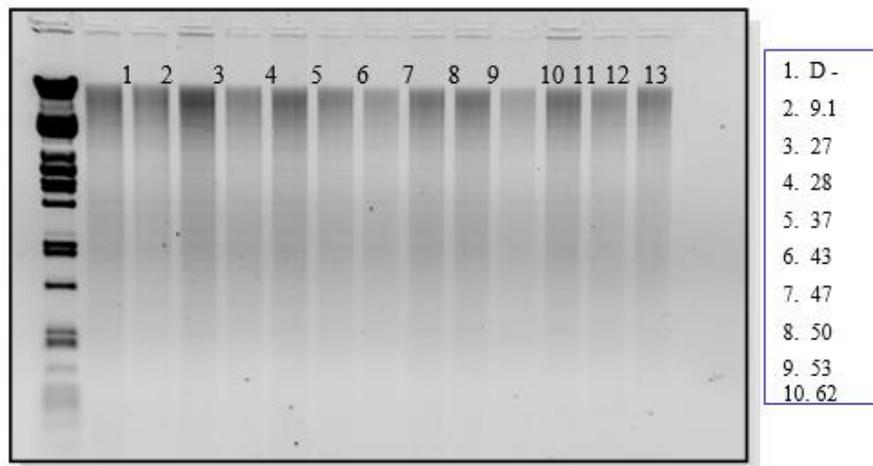


Figura 32. ADN de Désirée transgénicos y control negativo digeridos con EcoRI. La tabla de la derecha indica por cada carril el número con el que fueron codificadas las líneas putativamente transgénicas así como el carril correspondiente al control negativo.

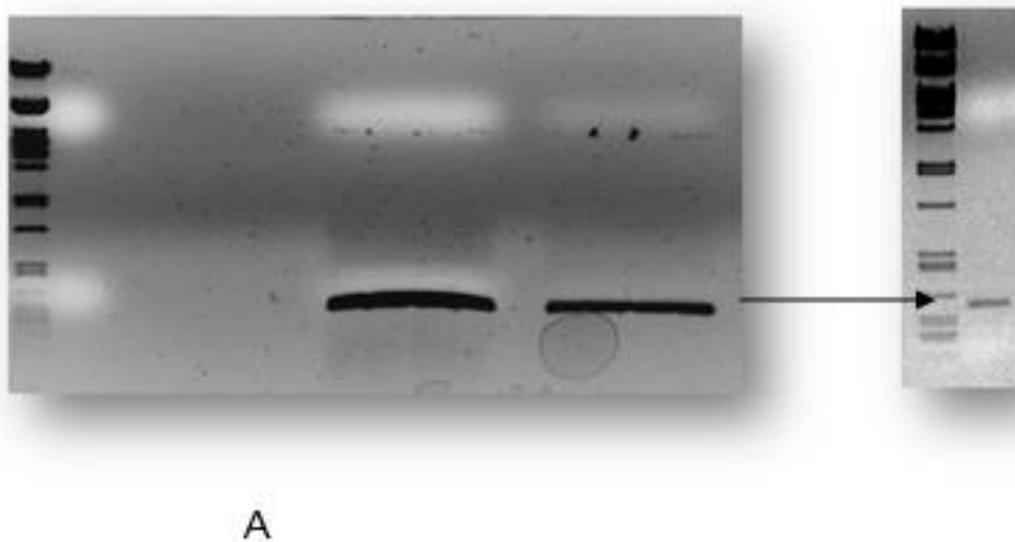


Figura 33. Sonda para Southern blot, A. Gel con muestras del producto del PCR; B. Calidad de la muestra recuperada del gel mediante el kit de purificación de bandas.

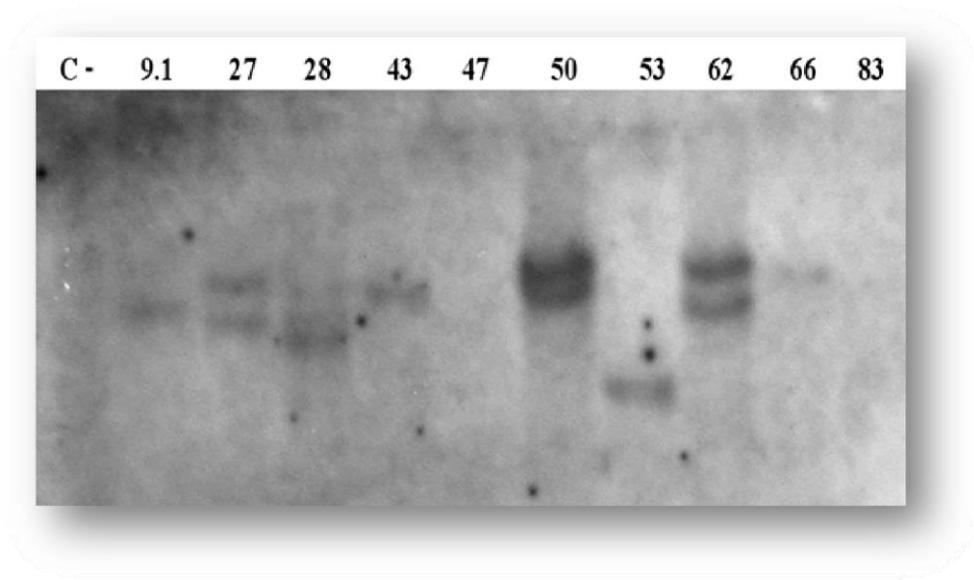


Figura 34. Hibridación por Southern blot de líneas putativamente transformadas de Désirée.

9.1 Tablas

Tabla N°1. Componentes del medio M43

Reactivo	volume n
MS	2.5 ml
MSA base	5 ml
Manitol(4%)	40 g
Sucrosa (3%)	30 g
Phytigel (0.4%)	4 g

Se completa con agua destilada para 1 litro de medio.

Tabla N° 2. Medio de propagación MSA Medio de co-cultivo

Reactivo	Peso molecular	Para 1 litro	Concentración final
Sales Murashige & Skoog	-	4.6 g	4.60 mg/l
Sucrosa	342 .3	20.0 g	2.00%

Llevar a un pH de 7.

Tabla N° 3. Medio de regeneración Willmitzer

Reactivo	PM stock	Para 1 litro	Concentración final
Sales Murashige & Skoog	-	4.60 g	4.60 mg/l
Sucrosa	342.30 g/mol	20.0 g	2.00%
Phytigel®	-	4.0 g	0.40 %
Ácido giberelico	1,000 mg/l	20.0 µl	0.02 mg/l
Acido acético naftaleno	1,000 mg/l	20.0 µl	0.02 mg/l
Zeatina riboside	1,000 mg/l	2.0 ml	2.00 mg/l
Cefotaxima	200,000 mg/l	1.0 ml	200.00 mg/l
Kanamicina	100,000 mg/l	1.0 ml	100.00 mg/l

Ajustar el pH a 8.0

Tabla N° 4. Bromuro de etidio

Reactivos	P M	Para 100ml	Concentración final
Bromuro de etidio	394.33 g	1g	10 g/L
H ₂ O _d		100ml	

Transferir la solución a una botella forrada con papel aluminio y guardar a 4°C

Tabla N° 5. TBE 10 X

Reactivo	Peso molecular	Para 1 litro	Concentración final
Tris®	121.14 g/mol	108 g	892 mM
EDTA 0.5 M, pH 8.0	372,20 g/mol	40 ml	20 mM
Ácido Bórico	61,814 g/mol	55 g	889 mM

Tabla N° 6. SALB 10X

Reactivos	Para 50 ml
Azul de bromofenol	75 mg
Xilen cianol	75 mg
Naranja G	100 mg
Sucrosa	30 g
TBE 10X	2.5 ml

Diluir en 10 ml de agua mili-Q, seguidamente añadir agua pura hasta completar 50 ml.

Tabla N° 7. Fago lambda digerido con *PstI*

Preparación del fago lambda digerido con la enzima *PstI* como marcador de peso molecular.

En un microtubo de 2ml mezclar los siguientes reactivos:

λ -DNA 100 ug	224.2 μ l
10X de tampón para <i>PstI</i>	90 μ l
<i>PstI</i> (10 U/ μ l)	10 μ l
H ₂ O	575.8 μ l
Volumen total	900 μ l

Incubar a 37°C por 1h.

A la mezcla anterior de le añade 100 μ l de tampón de carga de ADN.

Tabla N° 8. Solución de lavado I Solución I

Reactivo	Peso molecular	Para 100 ml	Concentración final
Tris®	121.14 g/mol	0.30 g	25 mM
D-(+)-Glucosa	180.20 g/mol	0.90 g	50 mM
EDTA, s disodio a dihidratado l	372.20 g/mol	0.37 g	10 mM

Ajustar el Tris ® a pH 8.0

Tabla N°9. Solución de lavado
Solución 2

Reactivo	Peso molecular	Para 100ml	Concentración final
SDS	288.40 g/mol	1.00 g	1.00%
NaOH	40.00 g/mol	1.16 g	0.2 M

Tabla N° 10. Solución de lavado III
Solución 3

Reactivo	Peso molecular	Para 100ml	Concentración final
Acetato de sodio anhidrido	82.03 g/mol	24.61 g	3.0 M

Ajustar el pH a 4.8

Tabla N° 11. Tampón de extracción CTAB

Reactivo	Peso molecular	Para 1 litro	Concentración final
Tris® M- HCL, pH 8.0 ¹	121.14 g/mol	100.00 ml	100.00 mM
EDTA 0.5 M, pH 8.0	372.20 g/mol	50.00 ml	25.00 mM
NaCl	58.44 g/mol	81.82 g	1.40 M
CTAB	364.46 g/mol	20.00 g	2.00 %

Autoclavar y almacenar a 4°C

Tabla N° 12. Cebadores utilizados para el análisis molecular

Cebador de la región LB (borde)

F.- 5' TCCTGTTTGATGGTGGTTCCGA 3' 22 pb

R.- 5' TCTTCCCTTCCTTTCTCGCCA 3' 21 pb

Posición : cerca a la región del gen *RB*

Amplificación 300 pb.

Cebador Kml

F- 5' TCCTGTCATCTCACCTTGCTCC 3' 22pb

R- 5' ACGATTCCGAAGCCCAACC 3' 19pb

Posición : en el gen *nptII* dentro del T-ADN.

Amplificación: 563 pb

Cebador nptII

F - 5' AACGGACCACCTATGATGTGCAACGGGA 3' 28pb

R - 5' GCCGCTTCTCCAAGATCAATAAAGCCA 3' 28pb

Posición: en el *nptII* fuera del T-ADN.

Amplificación: 488 pb.

Esta última pareja de cebadores fue desarrollada por Lara M.

Colton 2006.

Cebador de RB

F – 5' CACGAGTGCCCTTTTCTGAC 3' 20 pb

R – 5' ACAATTGAATTTTACTT 3' 20 pb

Posición : dentro del gen *RB*

Amplicón: 213 pb.

Tabla N° 13. Condiciones para la amplificación por PCR

Stock	Para 1 reacción (ul)	Concentración final
H ₂ O	13.56	-----
Buffer 10x	2	1 x
MgCl ₂ 25mM	1.2	1.5 mM (1-3 mM)
dNTPs (100 uM)	0.16	0.2 mM
Primer F (5 uM)	1	0.25 mM (0.2 – 1 uM)
Primer R (5 uM)	1	0.25 mM (0.2 – 1 uM)
Taq 5 u/ml	0.08	1 U
DNA	1	100 ng

Volumen final = 20ul por reacción.

Tabla N° 14. Condiciones del programa para la amplificación por PCR

Programa: Región LB		
Pa so	Temperatura en °C	Tiempo
1	94	5 min
2	94	30 seg
3	55	30 seg
4	72	1 min
5	go to 2	rep 34
6	72	7 min
7	4	5 min

Programa: Km 1		
Pa so	Temperatura en °C	Tiempo
1	95.0	5 min
2	95.0	60 seg
3	63.0	60 seg
4	72.0	1 min
5	go to 2	rep 34
6	72.0	7 min
7	4.0	5 min

Programa: npt III		
Pa so	Temperatura en °C	Tiempo
1	94.0	5 min
2	94.0	30 seg
3	57.0	30 seg
4	72.0	1 min
5	go to 2	rep 34
6	72.0	7 min
7	4.0	5 min

Programa: RB		
Pa so	Temperatura en °C	Tiempo
1	95.0	7 min
2	95.0	20 seg
3	50.0	20 seg
4	72.0	2 min
5	go to 2	rep 38
6	72.0	7 min
7	4.0	5 min

Tabla N° 15. Prehibridación

Solución de lavado I

Reactivo	Peso molecular	Para 1 litro	Concentración final
Acetato de sodio	82.03 g/mol	1.64 g	0.20 m
Etanol absoluto	99.99%	75.00 ml	75.00 %
H ₂ O		16.00 ml	

Disolver el acetato de sodio en agua antes de agregar el etanol.

Tabla N° 16. Solución de lavado II

Reactivo	Peso molecular	Para 1 litro	Concentración final
Acetato de amonio	77.08 g/mol	0.077 g	10.00 mM
Etanol absoluto	99.99%	75.00 ml	75.00%
H ₂ O		16.00 ml	

Disolver el acetato de amonio en agua antes de añadir el etanol.

Soluciones para Southern blot

Tabla N° 17. Solución de denaturación

Reactivo	P M	Por litro	Concentración final
NaOH	40.00 g/mol	20.00 g	0.50 M
NaCl	58.00 g/mol	87.00 g	1.50 M

Tabla N° 18. Tampón de neutralización

Reactivo	P M	Por 1 litro	Concentración final
TRis®	121.14 g/mol	121.14 g	1.00 M
NaCl	58.00 g/mol	87.00 g	1.50 M

Ajustar el pH a 7

Tabla N° 19. Solución de lavado

Reactivo	Concentración stock	Por litro	Concentración final
Solución de lavado I			
SSC(*)	20 X	100.00 ml	2.0 X
SDS	20 %	5.00 ml	0.1 %
Solución de lavado 2			
SSC	20 X	5.00 ml	0.1 X
SDS	20 %	5.00 ml	0.1 %

(*) Para preparar el SSC 20X (citrato de sodio 0.3 M, cloruro de sodio 3.0 M), disolver 88.23 g de citrato de sodio, tribásico, dihidratado (MW = 294.10 g/mol) y 175.32 g de cloruro de sodio (PM = 58.44 g/mol) en un litro de agua destilada.

Ajustar el pH a 7 con NaOH concentrado

Tabla N° 20. Segundo lavado

solución	Temperatura	Tiempo
*Solución de lavado 1 (una vez)	Temperatura ambiente	20 min
*Solución de lavado 2 (dos veces)	65 °C	20 min

IX. APENDICE

10.1 Preparación de hormonas y antibióticos

Ácido giberélico (1000 ppm) disolver 1 mg en etanol y luego añadir agua destilada hasta llegar a los 10 ml. Para obtener una concentración de 100 ppm.

Ácido indol-acético IAA (1000 ppm) disolver 100 mg en etanol/KOH 1N agregar agua destilada hasta completar 100ml.

Ácido naftalen- acético ANA (1000 ppm) disolver 100 mg en KOH 1N agregar agua destilada hasta completar 100 ml.

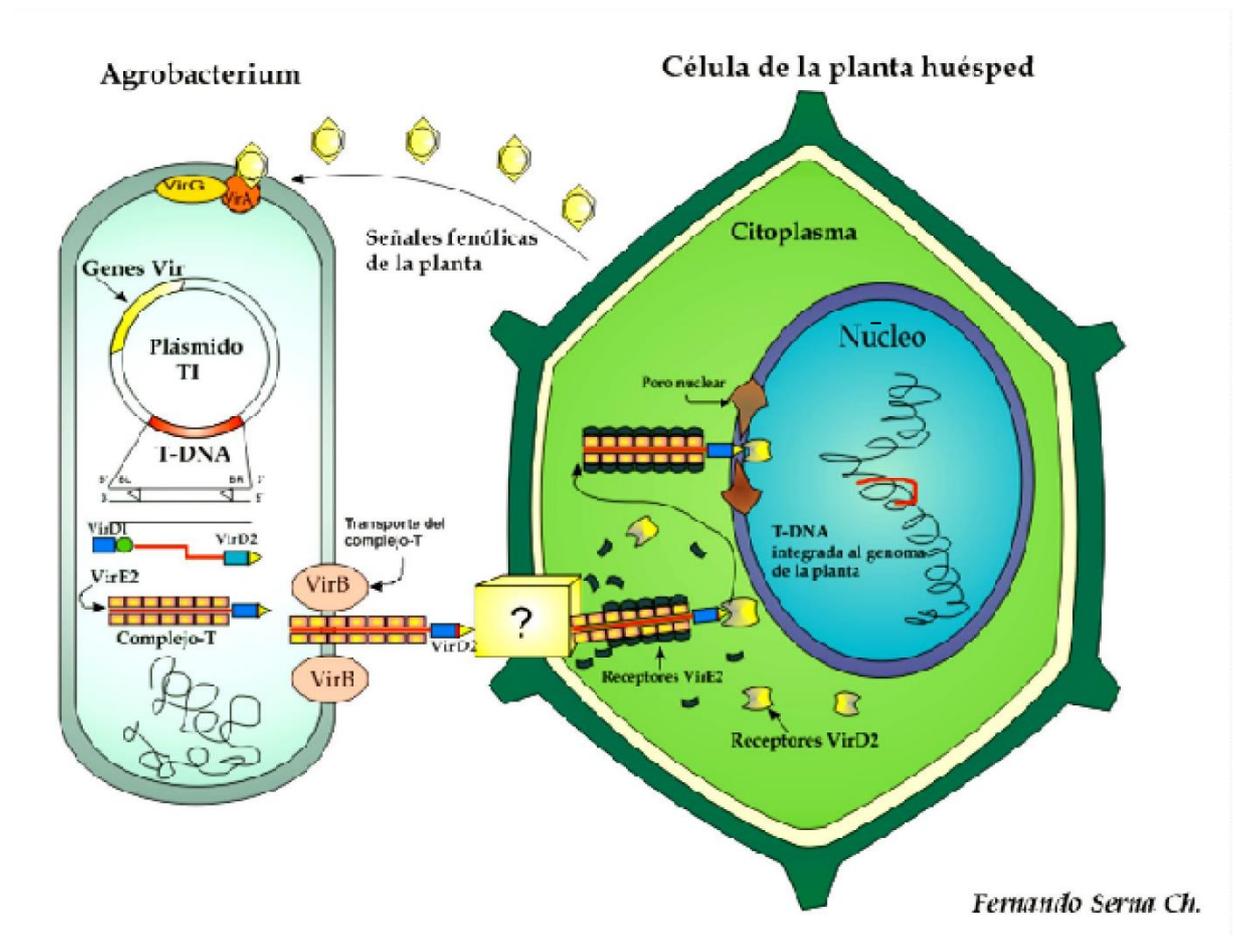
Ribósido de zeatina (1000 ppm) disolver 100mg en KOH 1N agregar agua destilada hasta completar 100 ml.

Kanamicina (100000 mg/l) disolver 2g en 20 ml de agua destilada, para una concentración de 100 ppm utilizar 1 ml del stock para un litro de medio.

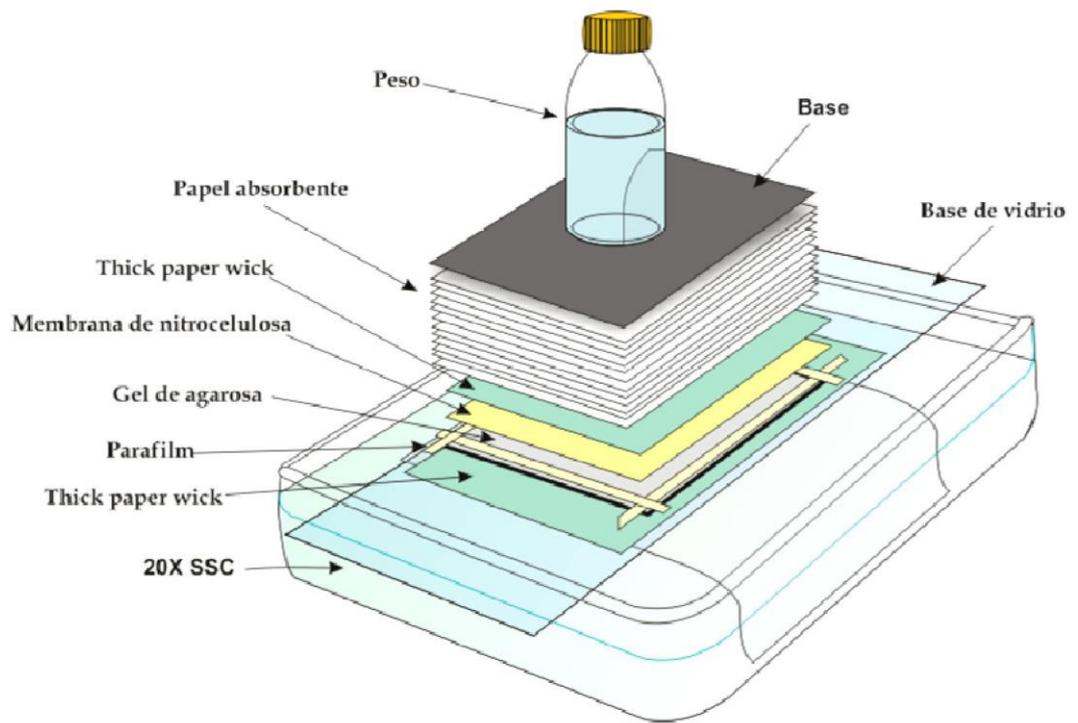
Cefotaxima (200000 mg/l) disolver 1g en 5 ml de agua destilada, para una concentración de 200 ppm emplear 1 ml del stock para un litro de medio.

Carbanecilina disolver 1 g en 5 ml de agua destilada, para una concentración de 200 ppm.

10.2 Esquemas



Esquema 1. Transferencia del ADN-T desde *Agrobacterium* hacia la célula de la planta.

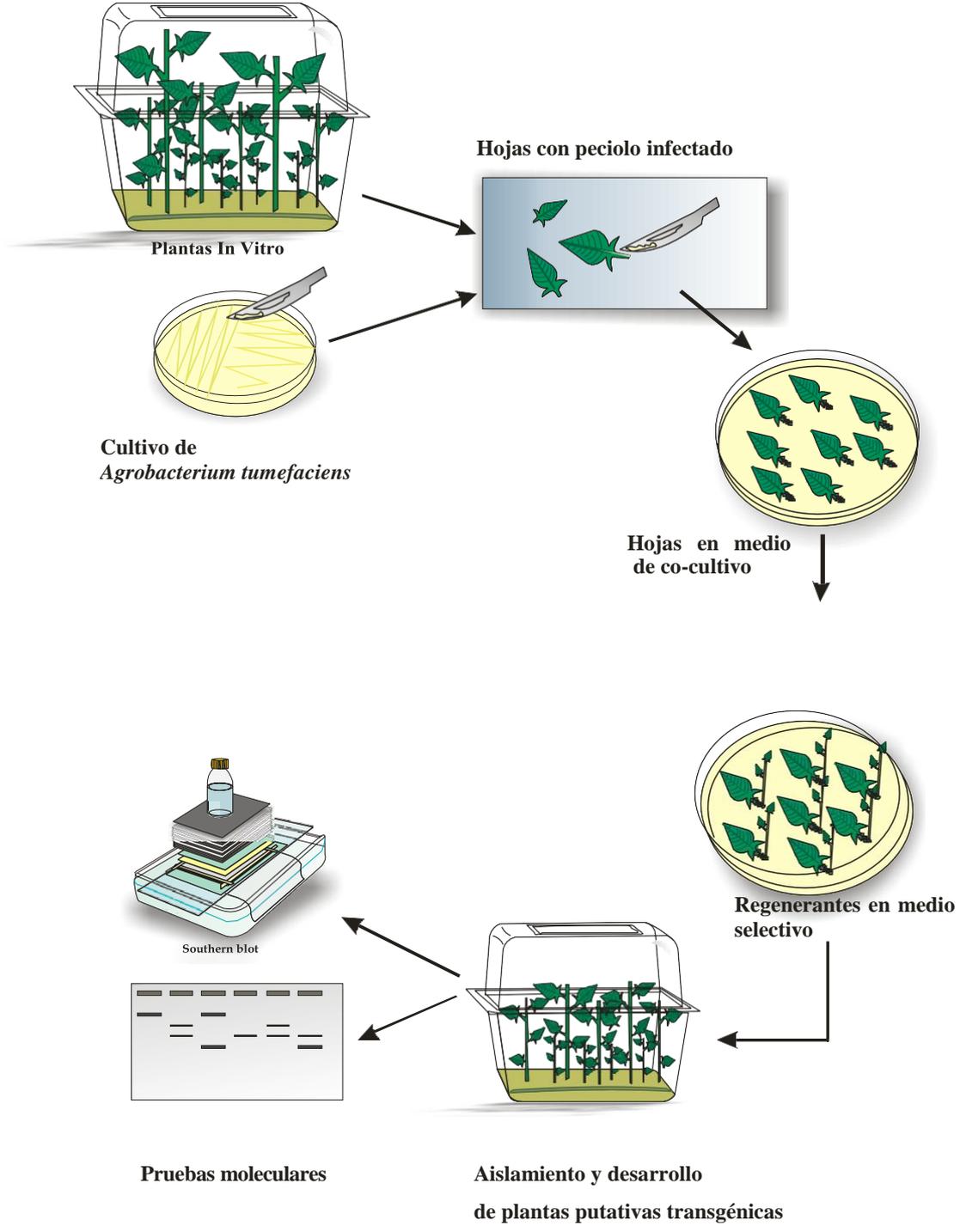


Southern blot

Fernando Serna Ch.

Esquema 2. Sistema de transferencia del ADN, de un gel de agarosa hacia una membrana de nylon.

Transformación genética por Agrobacterium



Esquema 3. Transformación genética de *Solanum tuberosum* mediado por *Agrobacterium tumefaciens* mediante la infección directa.