

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Inserción de genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1* en *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Huachano para conferir resistencia a *Cylas puncticollis* y *C. brunneus* “gorgojos del camote” (Coleoptera: Curculionidae)

Tesis para optar el título profesional de LICENCIADA EN
BIOLOGIA

ROMINA ELVIRA REAÑO CABREJOS

Lima – Perú 2013

ASESORES

Asesor interno:

Dr. Mauro M. Quiñones

Universidad Ricardo Palma

Asesor externo:

Dr. Marc Ghislain

Centro Internacional de la Papa

A mi abuela que en paz descanse.

DEDICATORIA

A mis padres Germán y Dorvi por ser mi ejemplo, por su esfuerzo, motivación y comprensión durante toda mi formación profesional.

A mi hermanos Karina y John por brindarme su apoyo y por siempre estar a mi lado durante toda esta etapa de mi vida.

A mi pequeña Luana....

AGRADECIMIENTO

Al Centro Internacional de la Papa (CIP) por el financiamiento en la realización de la presente tesis.

Al Dr. Marc Ghislain, Jefe del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del Centro Internacional de la Papa (CIP), por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación.

A la Dra. Sandra Manrique por enseñarme todo el manejo del trabajo de laboratorio, por sus recomendaciones, la confianza y amistad brindada durante el desarrollo de la presente investigación.

Al Dr. Mauro Quiñones, asesor universitario, por sus sugerencias, observaciones, correcciones y haberme guiado durante la redacción de la presente investigación.

A la Dra. Veronica Rubin de Celis, Dra. Haydee Montoya y Blga. Mercedes Gonzales de la Cruz, miembros del jurado calificador, por sus consejos y recomendaciones en la presente tesis.

Al MSc. Raúl Eyzaguirre por sus sugerencias durante el análisis estadístico.

A los asistentes de investigación Katterinne Prentice, Milton Untiveros, Dora Quispe, Cristina Rivera, Milagros Ormachea, Maria Guadalupe Román, Juan Daniel Montenegro, Julio Frisancho por el apoyo y la amistad brindada.

A los estudiantes Diana Díaz, Karina Cancino, Bruno Lértora, María Caraza, Elizabeth Fernández, por compartir sus conocimientos y ayudarme de diferentes formas en el desarrollo de esta tesis.

A los técnicos Martin Ramos y Joel Reyes, quienes siempre me ayudaron proporcionándome el material de laboratorio, así como el apoyo en algunos procedimientos del mismo.

Y gracias a todos los que hicieron que el desarrollo de esta investigación sea posible...

RESUMEN

Con la finalidad de insertar los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1* en *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. “Huachano” para conferir resistencia a *Cylas puncticollis* y *C. brunneus* “gorgojos del camote”, se desarrolló la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, siguiendo dos protocolos de regeneración y transformación. Partiendo de 46 meristemos y 282 hojas con peciolo, se obtuvieron 8 eventos transgénicos de inserción completa del ADN - T (4 por cada protocolo de transformación) y un evento de inserción incompleta. Con una eficiencia de transformación de 8.70%, el protocolo a partir de meristemos demostró ser más eficaz en la obtención de eventos transgénicos de inserciones completas que el protocolo a partir de hojas con peciolo, con el cual se obtuvo una eficiencia de transformación de 1.42%. A su vez, los regenerantes fueron evaluados mediante pruebas *in vitro* (resistencia a kanamicina) y moleculares (PCR), con los análisis de PCR se confirmó que los 8 regenerantes callo positivos (resistentes a la prueba de kanamicina) también presentaron la inserción de los transgenes de interés “*cry3Ca1* y *cry7Aa1*” y del gen marcador selector “*nptII*”. Asimismo, se determinó que 4 de los eventos transgénicos integraron secuencias externas al ADN - T “backbone” en el genoma de la planta, uno de los cuales, presentó la inserción del gen bacteriano “*virD2*”.

ABSTRACT

With the purpose of inserting the genes *cry3Ca1* and *cry7Aa1* in *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. "Huachano" to develop resistance to *Cylas puncticollis* and *C. brunneus* "sweet potato weevils", the genetic transformation was developed using *Agrobacterium tumefaciens*, following two protocols of regeneration and transformation. Starting from 46 meristems and 282 leaves with petiole, 8 transgenic events were obtained with complete insertion of T - DNA (4 for each transformation protocol) and one event with incomplete insertion. With an efficiency of transformation of

8.70 %, the protocol of meristems proved to be more effective in obtaining transgenic events of complete inserts than the protocol of leaves with petiole, which obtained a efficiency of transformation of 1.42 %. The regenerants were evaluated by testing *in vitro* (resistance to kanamycin) and molecular (PCR), the PCR analysis confirmed that the 8 regenerants positive callus (resistant to kanamycin test) also presented the insertion of transgenes of interest "*cry3Ca1* and *cry7Aa1*" and selection marker gene "*nptII*". Likewise, 4 of the transgenic events integrated sequences outside the T - DNA "backbone" into the plant genome, one of whom, showed the insertion of the bacterial gene "*virD2*".

TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

2,4 - D Acido 2,4 diclorofenoxiacético

2,4,5 - T Acido 2,4,5 triclorofenoxiacético ABA Acido Abscísico

ADN Acido desoxirribonucleico

ADN - T Acido desoxirribonucleico de transferencia AG₃ Acido giberélico

ANA Acido naftalenacético

β - amy Gen de β - amilasa BAP Bencil amino purina

BSA Albúmina de suero bovino

Bt *Bacillus thuringiensis*, bacteria gram-positiva ceka Antibióticos cefotaxima y kanamicina

CTAB Bromuro de hexadeciltrimetil amonio cv. Cultivar

EDTA Acido etilen diamino tetra acético ER Eficiencia de regeneración

ES Eficiencia de selección

ET Eficiencia de transformación

GUS Gen reportero beta - glucoronidasa Km Antibiótico Kanamicina

LB Luria Bertani

M Molar

MCS Medio de cocultivo semisólido MES Acido morfolino etano sulfónico MPB
Medio de propagación en *I. batatas* m/s metros/segundos

nptII Gen de neomicina fosfotransferasa, confiere resistencia a kanamicina

pb Pares de bases

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa Plásmido Ti Plásmido inductor de tumor

PVP Polivinil pirrolidona

rpm Revoluciones por minuto Sales MS Sales Murashige & Skoog *SPOA* Gen
de esporamina A

TBE Tris - borato - EDTA

TM Toneladas métricas

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	11
ÍNDICE DE FIGURAS	13
ÍNDICE DE TABLAS	15
I. INTRODUCCIÓN	17
II. ANTECEDENTES	19
2.1. Generalidades	19
2.1.1. <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam. "camote"	19
2.1.2. Importancia del cultivo	20
2.1.3. El Cultivar Huachano	21
2.2. Enfermedades, plagas y daños en el cultivo de camote	22
2.2.1. Principales enfermedades y plagas de <i>Ipomoea batatas</i>	22
2.2.2. El gorgojo del camote <i>Cylas</i>	23
2.2.3. Daños ocasionados por la plaga del género <i>Cylas</i>	24
2.3. Mejoramiento genético de <i>Ipomoea batatas</i>	26
2.3.1. Transformación genética	26
2.3.2. Genes <i>cry</i>	28
2.3.3. Regeneración <i>in vitro</i> en <i>Ipomoea batatas</i>	29
2.3.4. Transformaciones realizadas en camote	31
2.4. Caracterización <i>in vitro</i> y molecular de los regenerantes	32
2.4.1. Prueba <i>in vitro</i> de resistencia a kanamicina	32
2.4.2. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1. Lugar de ejecución	36
3.2. Materiales	36
3.2.1. Material biológico	36
3.3. Metodología	36
3.3.1. Propagación <i>in vitro</i> del material vegetal	36
3.3.2. Cultivo y siembra de bacterias	37

3.3.3.	Extracción de ADN plasmídico	37
3.3.4.	Análisis de restricción del vector binario	38
3.3.5.	Transformación genética	38
3.3.6.	Prueba de resistencia a kanamicina (prueba de callos)	41
3.3.7.	Extracción de ADN a pequeña escala	42
3.3.8.	PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	43
IV.	RESULTADOS	44
4.1.	Análisis de restricción del vector binario	44
4.2.	Transformación genética	44
4.3.	Prueba de resistencia a kanamicina (prueba de callos)	46
4.4.	PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	47
V.	DISCUSIÓN	50
VI.	CONCLUSIONES	56
VII.	RECOMENDACIONES	57
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
IX.	ANEXOS	70
9.1.	Figuras	70

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Construcción pCIP84 formada por el vector binario pCAMBIA2305.2 que porta en su ADN - T los genes quiméricos cry7Aa1 (1746pb) y cry3Ca1 (1794pb), que expresan las toxinas Cry7Aa1 y Cry3Ca1, gobernados por promotores y terminadores del gen β-amy de β-amilasa y del gen gSPOA1 de esporamina respectivamente. Así como el gen nptII (792pb), cerca del borde izquierdo usado como marcador de selección por conferir resistencia al antibiótico kanamicina.</i>	70
<i>Figura 2. Propagación in vitro de Ipomoea batatas cv. Huachano.</i>	70
<i>Figura 3. Esquema de transformación genética por embriogénesis somática de Ipomoea batatas cv. Huachano a partir de meristemos.</i>	71
<i>Figura 4. Esquema de transformación genética por embriogénesis somática de Ipomoea batatas cv. Huachano a partir de hojas con peciolo.</i>	72
<i>Figura 5. Meristemos de camote, 1 semana después de la extracción o aislamiento.</i>	72
<i>Figura 6. Transformación de meristemos.</i>	73
<i>Figura 7. Explantes de Ipomoea batatas en el medio F9.</i>	73
<i>Figura 8. Eficiencias de Regeneración (ER) y Transformación (ET).</i>	73
<i>Figura 9. Eficiencia de Selección (ES).</i>	73
<i>Figura 10. Esquema del ADN - T del vector binario pCIP84 con los sitios de restricción de EcoRI y el tamaño de las bandas esperadas.</i>	74
<i>Figura 11. Análisis de restricción: A. Simulación de la digestión del plásmido pCIP84 realizada en el programa Vector NTI - 11. B. Fragmentos de restricción del plásmido pCIP84 en A. tumefaciens digerido con EcoRI.</i>	74
<i>Figura 12. Estados morfológicos de embriogenia durante la regeneración de Ipomoea batatas cv. Huachano a partir de meristemos. A. Globular (medio 2,4,5 - T ceka); B. Globular - corazón (medio 2,4,5 - T ceka); C. y D. Torpedo (medio ABA ceka 10mg); E. y F. Fase cotiledonar (medio ABA ceka 25mg); G. Regenerante anormal (medio AG3 ceka) y H. Regenerante normal (medio MPB semisólido).</i>	76
<i>Figura 13. Evolución de los callos de Ipomoea batatas cv. Huachano a partir de hojas con peciolo. A. Explantes transformados (medio F9); B. Callos (medio G2,4 - D); C. Acercamiento de uno de los callos de la figura 13B.; D. Formación de embriones (medio G2,4 - D); E. Embriones (medio ABA) y F. Regenerantes.</i>	77
<i>Figura 14. Prueba de resistencia a kanamicina de los regenerantes de Ipomoea batatas cv. Huachano en el medio 303. C⁺: Control positivo, hojas de una planta transformada C⁻: Control negativo, hojas de una planta de Huachano no transformada. A. Hojas de los regenerantes obtenidos a partir de meristemos (I, II, IV, V); B. Hojas de los regenerantes obtenidos a partir de hojas con peciolo (1, 2, 3, 4, 5 y 6).</i>	78

Figura 15. Calidad de la extracción de ADN de los regenerantes a pequeña escala. λ : ADN del fago lambda digerido con la enzima PstI, C^- : ADN de una planta del cv. Huachano no transformado. I - V: ADN de regenerantes obtenidos a partir de meristemos. 1 - 6: ADN de regenerantes obtenidos a partir de hojas con peciolo. _____ 78

Figura 16. Amplificación del gen cry7Aa1 (608pb). λ : ADN del fago lambda digerido con la enzima PstI. H₂O: Agua. C^- : Control negativo, 4 carriles de ADN de una planta del cv. Huachano no transformado. I - V: ADN de regenerantes obtenidos a partir de meristemos. 1 - 6: ADN de regenerantes obtenidos a partir de hojas con peciolo. C^+ : Control positivo, ADN plasmídico de *E. coli* conteniendo la construcción pCIP84. _____ 78

Figura 17. Amplificación del gen cry3Ca1 (530pb). λ : ADN del fago lambda digerido con la enzima PstI. H₂O: Agua. C^- : Control negativo, ADN de una planta del cv. Huachano no transformado. I - V: ADN de regenerantes obtenidos a partir de meristemos. 1 - 6: ADN de regenerantes obtenidos a partir de hojas con peciolo. C^+ : Control positivo, ADN plasmídico de *E. coli* conteniendo la construcción pCIP84. _____ 79

Figura 18. Amplificación del gen nptII (636pb). λ : ADN del fago lambda digerido con la enzima PstI. H₂O: Agua. C^- : Control negativo, 4 carriles de ADN de una planta del cv. Huachano no transformado. I - V: ADN de regenerantes obtenidos a partir de meristemos. 1 - 6: ADN de regenerantes obtenidos a partir de hojas con peciolo. C^+ : Control positivo, ADN plasmídico de *E. coli* conteniendo la construcción pCIP84. _____ 79

Figura 19. Amplificación del gen bacteriano virD2 (338pb). λ : ADN del fago lambda digerido con la enzima PstI. H₂O: Agua. C^- : Control negativo, 3 carriles de ADN de una planta del cv. Huachano no transformado. I - V: ADN de regenerantes obtenidos a partir de meristemos. 1 - 6: ADN de regenerantes obtenidos a partir de hojas con peciolo. C^+ : Control positivo, ADN genómico de *A. tumefaciens*. _____ 79

Figura 20. Amplificación de secuencias del vector backbone (561pb). λ : ADN del fago lambda digerido con la enzima PstI. C^- : Control negativo, ADN de una planta del cv. Huachano no transformado. I - V: ADN de regenerantes obtenidos a partir de meristemos. 1 - 6: ADN de regenerantes obtenidos a partir de hojas con peciolo. C^+ : Control positivo, ADN plasmídico de *E. coli* conteniendo la construcción pCIP84. _____ 80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bacterias utilizadas	80
Tabla 2. MPB Store	80
Tabla 3. Medio de propagación en <i>I. batatas</i> : MPB Líquido	80
Tabla 4. Medio Luria Bertani: LB Líquido	81
Tabla 5. Medio Luria Bertani: LB Sólido	81
Tabla 6. Digestión simple del ADN plasmídico de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	81
Tabla 7. Gel de agarosa al 1%	81
Tabla 8. Buffer TBE 10X	81
Tabla 9. Buffer TBE 1X	82
Tabla 10. Fago Lambda	82
Tabla 11. Medio de cultivo 2,4,5 - T	82
Tabla 12. Medio de cultivo 2,4,5 - T acetosiringona	82
Tabla 13. Medio de cultivo 2,4,5 - T ceka	83
Tabla 14. Medio de cultivo ABA ceka 10mg	83
Tabla 15. Medio de cultivo ABA ceka 25mg	83
Tabla 16. Medio de cultivo AG3 ceka	84
Tabla 17. Medio de propagación en <i>I. batatas</i> : MPB semisólido	84
Tabla 18. Medio de cocultivo semisólido: MCS	84
Tabla 19. Medio de cultivo F15	85
Tabla 20. Medio de cultivo F9	85
Tabla 21. Medio de cultivo G2,4 - D	85
Tabla 22. Medio de cultivo ABA	86
Tabla 23. Medio 303 con kanamicina	86
Tabla 24. Medio 303 control (sin kanamicina)	87
Tabla 25. CTAB 2X	87
Tabla 26. Gel de agarosa al 0.8%	87
Tabla 27. Secuencias de los primers usados en la reacción de PCR para la amplificación y reconocimiento de los genes de interés <i>cry7Aa1</i> y <i>cry3Ca1</i> , del gen marcador de selección <i>nptII</i> , gen bacteriano <i>virD2</i> y de secuencias del plásmido externas al ADN - T (backbone)	88
Tabla 28. Master mix o mezcla de componentes en la amplificación por PCR	88
Tabla 29. Programación para la amplificación de los genes <i>cry7Aa1</i> , <i>cry3Ca1</i> , <i>virD2</i> , <i>nptII</i> y la secuencia del vector "backbone"	89
Tabla 30. Explantes totales transformados de <i>Ipomoea batatas</i> cv. Huachano	89

<i>Tabla 31. Eficiencia de regeneración (ER) y Eficiencia de Transformación (ET) en ambos protocolos de transformación</i>	<u>90</u>
<i>Tabla 32. Resultados de la prueba in vitro de los Regenerantes</i>	<u>90</u>
<i>Tabla 33. Resultados de PCR para la detección de los genes introducidos (nptII, cry7Aa1, cry3Ca1 y virD2) y de la secuencia del vector backbone en cada regenerante analizado</i>	<u>90</u>

I. INTRODUCCIÓN

Ipomoea batatas “camote” pertenece al orden Polemoniales y a la familia Convolvulaceae, fue domesticado hace más de 5000 años en América Latina, y es considerado uno de los principales cultivos alimenticios, ampliamente conocido por ser consumido en más de 100 países del mundo.

En África Subsahariana es considerado una planta de gran potencial, aun no desarrollado. Debido a que los países que la conforman no le dan la prioridad que merece el cultivo a pesar de su alto valor energético y su contenido de vitaminas. Uno de los aspectos de su potencial radica en el alto contenido de β - caroteno (precursor de la vitamina A) que contienen los cultivares de pulpa naranja. La deficiencia de vitamina A en África subsahariana afecta a 43 millones de niños menores de 5 años, bastaría con 125g de consumo de estos cultivares de camote para proveer la cantidad necesaria de pro vitamina A en la dieta de un niño.

Además de utilizar las raíces tuberosas como fuente de alimento humano, es materia prima en procesos industriales (producción de bioetanol) y también como forraje para la alimentación animal.

Los principales factores bióticos que disminuyen el rendimiento en la producción de camote son las plagas y enfermedades. La principal plaga es el gorgojo del camote del género *Cylas*, conformada por 3 especies principales: *Cylas formicarius* (Fabricius), *C. puncticollis* (Boheman) y *C. brunneus* (Fabricius). Estas especies inciden en países tropicales ocasionando pérdidas de 10% a 100% en el cultivo. Debido al poco desarrollo tecnológico y a que el germoplasma de camote no presenta resistencia al gorgojo del género *Cylas*, una alternativa para el mejoramiento genético es mediante la introducción de genes de importancia agronómica a través de la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

En la búsqueda de resistencia a plagas se ha encontrado que los genes de *Bacillus thuringiensis* producen endotoxinas con propiedades insecticidas. Modificando el plásmido portador del ADN de transferencia de *Agrobacterium tumefaciens* con genes

Bt que confieran resistencia al gorgojo, se podrá obtener plantas con nuevas características determinadas por estos genes foráneos.

En el presente trabajo se plantea insertar los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1* en el cv. “Huachano” de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. por medio de la transformación genética por *Agrobacterium tumefaciens* vía embriogénesis somática para la obtención de plantas resistentes a *Cylas puncticollis* y *C. brunneus* “gorgojos del camote”.

II. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades

2.1.1. *Ipomoea batatas* (L.) Lam. “camote”

El camote es una planta alógama, herbácea y perenne que fue descrita por primera vez por Linneo en el año 1753 como *Convolvulus batatas*, sin embargo en 1791 Lamarck la clasifica dentro del género *Ipomoea* en base a la forma del estigma y a la superficie de los granos de polen, así recibe el nombre de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (Huaman, 1999).

Clasificación Taxonómica:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Convolvulaceae

Tribu: Ipomoeae

Género: *Ipomoea*

Especie: *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (Huaman, 1999).

El número de cromosomas en la planta de camote es $2n = 6x = 90$. Lo cual indica que es una planta hexaploide con un número básico de cromosomas $x = 15$ (Huaman, 1999).

El camote es cultivado por propagación vegetativa. Los tallos del follaje al cortarse en esquejes, enraizan formando nuevas plantas. En algunos climas fríos cuando el follaje no desarrolla muy bien se puede propagar por medio de sus raíces tuberosas. Su semilla botánica es usada en programas de mejoramiento genético y conservación.

Las raíces tuberosas de camote contienen grandes cantidades de vitaminas A, C y B (riboflavina). Proporcionan de 113 a 123 calorías y de 1.3g a 1.8g de proteína por cada 100g así como un importante aporte en β - caroteno, el cual es el precursor de la vitamina A (0.048 - 0.084 mg/100g). Además es una fuente interesante de forraje para la actividad ganadera (Fonseca *et al.*, 2002).

2.1.2. Importancia del cultivo

Se encuentra en el sexto lugar dentro de los cultivos de mayor importancia a nivel mundial, pero en los países en desarrollo es el quinto cultivo alimenticio más importante después del arroz, trigo, maíz y yuca. También es considerado como la segunda raíz más importante después de la yuca en muchos países tropicales (FAOSTAT, 2009).

El camote se cosecha durante todo el año, existen muchos cultivares de camote incluyendo cultivares de piel naranja, morada y blanca con igual número y combinaciones de color de la pulpa interna; el Perú tiene 2016 cultivares lo que representa 65.1% del total mundial de cultivares de camote (CEDIR, 2005).

Su importancia a nivel económico radica en que cada año se producen más de 105 millones de toneladas de camote en el mundo, 95% de las cuales crecen en los países en desarrollo (CIP, 2010).

El camote juega un rol importante en la alimentación humana consumiéndose principalmente en África, Asia y América, por su bajo costo y agradable sabor, es un buen aporte frente al déficit nutritivo que se observa en las familias de bajos ingresos.

En África Sub - Sahariana (SSA) se utiliza para aliviar la pobreza y reducir la malnutrición, ya que es una fuente rica en carbohidratos, fibra y micronutrientes. Cultivándose 3.2 millones de hectáreas con una producción de 13.4 millones de toneladas de camote en el año 2005 (Andrade *et al.*, 2009).

En el 2006 la FAO estimó que el occidente, este, centro y sur de África tenían una producción anual de 4.2, 7.2, 1.2, y 0.5 millones de toneladas, respectivamente (Andrade *et al.*, 2009).

En el 2009 la producción de camote en Uganda fue de 2'766,000 TM, en Kenia 930,784 TM, en Madagascar 886,791 TM, en Mozambique 838,413 TM y en Rwanda 801,376 TM (FAOSTAT, 2009).

En el Perú se siembra en los valles de la costa, a nivel del mar; en los valles interandinos y de la selva entre 500 a 2,000 metros de altitud (Fonseca *et al.*, 2002). En el año 2007 el Perú exportó de camote y sus derivados 442.639 dólares. El principal destino de las exportaciones peruanas es Estados Unidos, país que consume el 74% del total de lo exportado. Le siguen Reino Unido e Italia en Europa, y Chile.

Actualmente China es el principal productor de camote a nivel mundial, con 85 millones de toneladas producidas al año (CIP, 2010).

2.1.3. El Cultivar Huachano

Huachano es un cultivar nativo de camote peruano que presenta hojas simples de color verde oscuro algunas con pigmentación púrpura en el borde, las hojas tienen 7 lóbulos y las raíces tuberosas presentan piel de color naranja parduzco y pulpa naranja.

Debido a su alta eficiencia en regeneración y siendo extremadamente resistente al virus del moteado plumoso del camote (SPFMV), se han realizado transformaciones genéticas en este cultivar para la obtención de variedades resistentes a la enfermedad viral del camote (SPVD), que está formado por infecciones combinadas entre el virus del moteado plumoso del camote (SPFMV) y el virus del enanismo clorótico del camote (SPCSV) (Cuellar *et al.*, 2009); así como también otras para incorporar el gen de la glutenina del *Triticum aestivum* “trigo”, para mejorar la calidad de la harina (Walker & Prain, 2003).

2.2. Enfermedades, plagas y daños en el cultivo de camote

2.2.1. Principales enfermedades y plagas de *Ipomoea batatas*

Las mayores amenazas en la producción de camote son causadas por insectos y virus. En África dentro de las principales enfermedades virales encontramos: al Virus del Moteado Plumoso del Camote (SPFMV) y al Virus de la Mancha Anillada (SPRSV), que son transmitidos por áfidos; el Virus de Moteado Leve (SPMMV) y el Virus del Enanismo Clorótico del Camote (SPCSV) transmitidos por mosca blanca y otros como: la Enfermedad Viral del Camote (SPVD) producida por un complejo viral (Ames *et al.*, 1997; Skoglund & Smit, 1994).

Dentro de las plagas tenemos las que atacan el follaje: *Acraea acerata* “mariposa del camote”, *Aspidomorpha spp.* “escarabajo tortoise”, *Agrius convolvuli* “gusano cornudo”; las que atacan el tallo: *Alcidodes dentipes* “escarabajo rayado del camote”, *Synanthedon spp.* “polilla de alas claras”, *Peloropus batatae* “escarabajo Peloropus” y las que atacan la raíz: *Blosyrus sp.* “escarabajo áspero del camote”, *Cylas spp.* (*Cylas formicarius*, *C. puncticollis* y *C. brunneus*) “gorgojo del camote” (Ames *et al.*, 1997; Skoglund & Smit, 1994).

En general los gorgojos del camote (*Cylas spp.*) y las enfermedades virales causan la mayor pérdida en los cultivos de *Ipomoea batatas*.

En el Perú las principales plagas que causan daño al cultivo de camote son: pulgones (*Aphis gossypi*, *Myzus persicae*), cigarritas (*Empoasca sp.*), el gusano de hoja (*Prodenia sp.*), escarabajos (*Diabrotica sp.*, *Euscepes postfasciatus*), polillas (*Ochyrotica fasciata*, *Brachmia sp.*, *Sylepta helcitalis* y *Cosmopterix sp.*) y en algunos casos la arañita roja (Van de Fliert & Braun, 2001; Maes, 1995; Burga, 1987; Raman, 1987).

En áreas de la Costa central, se presenta con marcada incidencia el “gorgojo del camote” (*Euscepes postfasciatus*) y el nemátodo *Meloidogyne incognita*, causando fuertes daños en tallos y raíces tuberosas, produciendo significativas pérdidas económicas (Burga, 1987).

2.2.2. El gorgojo del camote *Cylas*

El gorgojo del género *Cylas* es la plaga destructiva más importante del camote en muchos países en desarrollo. La producción de camote se ve principalmente atacada por dos especies de gorgojo *Cylas puncticollis* y *C. brunneus*, los cuales causan pérdidas del 60 - 100% del rendimiento (Smit *et al.*, 2001). Reportándose pérdidas por encima del 73% en Uganda, que es el cuarto productor mas grande de camote (Smit & Van Huis, 1999).

De las tres especies anteriormente nombradas. *C. formicarius* es originaria de Asia y es extensivamente pantropical abarcando Oceanía (Papúa Nueva Guinea, Samoa, Fiji, Islas Salomón, este de Australia); Asia (China, Las Filipinas, Indonesia, India, Bangladesh, Sri Lanka); América (Sureste de los Estados Unidos, Hawaii, México, Indias Occidentales, Caribe, Guyana y Venezuela) y África (este de África y en Suráfrica). Mientras que, *C. puncticollis* y *C. brunneus* son plagas originarias de África. *C. puncticollis* se distribuye principalmente en Burundi, Camerún, Chad, Congo, Guinea, Kenya, Malawi, Mozambique, Nigeria, Rwanda, Senegal, Sierra Leona, Somalia, Sudan, Tanzania y Uganda (Raman, 1987).

Clasificación Taxonómica:

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Subclase: Pterygota

Orden: Coleoptera

Suborden: Polyphaga

Familia: Curculionidae

Género: *Cylas*

Especies: *Cylas formicarius*, *C. puncticollis* y *C. brunneus* (Ames *et al.*, 1997).

2.2.3. Daños ocasionados por la plaga del género *Cylas*

El gorgojo del camote del género *Cylas* es uno de los factores bióticos limitantes más importantes en la producción de camote a nivel mundial (Smit *et al.*, 2001).

El mayor daño causado por los gorgojos del camote del género *Cylas* se produce 20cm por debajo de la base del tallo en la parte superior de las raíces tuberosas. En condiciones de sequía constituyen un serio problema, encontrando fácilmente las raíces tuberosas a través de las grietas del suelo formadas por la sequía (Muyinza *et al.*, 2007).

Las hembras de *Cylas spp.* colocan sus huevos en la raíces tuberosas, el estadio larval es la etapa más destructiva debido a los túneles que desarrolla la larva y sus hábitos alimenticios tanto en el follaje como en la raíz tuberosa (Stathers *et al.*, 2003). En respuesta al ataque del gorgojo, las raíces tuberosas de camote acumulan terpenos tras su infestación en un periodo de 24 horas (Sato *et al.*, 1982), ocasionando un sabor amargo lo que hace que esta raíz sea inservible tanto para la alimentación del hombre como del animal.

Las larvas forman pupas en los túneles de las raíces, a los pocos días ocurre la eclosión, los adultos emergen de las raíces tuberosas infestadas y las hembras buscan nuevas plantas de *Ipomoea batatas* con grietas para ovipositar sus huevos (Skoglund & Smit, 1994), repitiéndose el ciclo biológico.

Las plantas suelen morir debido al extenso daño en los tejidos de los tallos, causando la reducción en el tamaño y número de las raíces tuberosas.

El daño externo afecta la calidad y el valor de las raíces, mientras que el interno puede generar la pérdida completa de la planta. Inclusive los bajos niveles de infestación pueden reducir la calidad de la raíz (Stathers *et al.*, 2003). Constituyendo la más alta limitación en la producción y utilización de camote a nivel mundial, con pérdidas del cultivo hasta en un 80%, en algunos casos hasta el 100% (Jansson *et al.*, 1987; Mullen, 1984).

Se han aplicado ciertas alternativas para adquirir una adecuada protección del cultivo, entre ellas, el control biológico. En Cuba el patógeno fúngico *Beauveria bassiana* ha

sido usado con éxito (Cisneros & Alcázar, 2001), mientras que, en regiones secas de África el potencial de control de este patógeno se ve limitado (Smit *et al.*, 2001), debido a que, se requieren de suelos húmedos para el establecimiento de *B. bassiana*, por lo que resulta incompatible en suelos predominantemente secos sin disponibilidad de riego como los de África (Cisneros & Alcázar, 2001). Otra forma de control biológico surgió con la identificación de las feromonas producidas por *C. formicarius*, *C. puncticollis* y *C. brunneus*, las que fueron colocadas en trampas como una modalidad para la supresión de poblaciones, no siempre obteniéndose reducciones significativas en la tasa de infestación (Downham *et al.*, 2001).

Varios intentos se han realizado para mejorar la resistencia de *Ipomoea batatas* a *Cylas spp.* convencionalmente. Según las investigaciones desarrolladas a la fecha aún no se han encontrado plantas de camote altamente resistentes dentro del germoplasma del cultivo, y los pocos recursos de resistencia no han podido ser utilizados en defensa de la planta debido a la relación entre el hospedero y la plaga (Talekar, 1987). El mejoramiento genético convencional, también es limitado por las siguientes razones: la naturaleza hexaploide del cultivo, difícil obtención de semilla, incompatibilidad multialélica con 2 loci de efectos epistáticos y problemas complejos de esterilidad de polen (Sevilla & Holle, 2004).

El desarrollo de plantas transgénicas a través de la ingeniería genética es una de las estrategias más sustentables para mejorar el rendimiento del cultivo insertando genes de resistencia en el germoplasma del camote (Xing *et al.*, 2008).

La obtención de cultivos *Bt* reducirá significativamente el uso de insecticidas e incrementará la producción, para el beneficio de los agricultores y consumidores (Cattaneo *et al.*, 2006).

2.3. Mejoramiento genético de *Ipomoea batatas*

2.3.1. Transformación genética

La biotecnología se basa en la información codificada en el ADN, abriendo nuevas oportunidades para la solución de problemas agrícolas. Con la biotecnología se ha podido desarrollar la ingeniería genética mediante la tecnología del ADN recombinante o transformación genética. La transformación se realiza con el fin de introducir genes benéficos en las plantas para otorgarles resistencia a patógenos o tolerancia a condiciones adversas del ambiente o para mejorar la calidad, todo ello con el fin de incrementar la producción (Doussoulin & Chávez, 2002).

El desarrollo de técnicas de transformación genética ha permitido el mejoramiento genético de plantas. El número de genes insertados y la localización en los cromosomas de los genes integrados no son controlables (Li *et al.*, 1993). Existen dos técnicas principales de transformación genética: transformación por biobalística y transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

La transformación mediada por *Agrobacterium* es uno de los sistemas favoritos, ya que no necesita de equipamiento sofisticado, produce una mayor regeneración de plantas, la eficiencia de transformación es más alta y frecuentemente produce mejores eventos (integraciones intactas y de una sola copia) que el bombardeo de partículas de oro o tungsteno impregnados con ADN (Tabares *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 1997). Esto explica la preferencia de la transformación por *Agrobacterium* frente al método de bombardeo de partículas para el desarrollo de transformación genética en el cultivo de camote.

Agrobacterium tiene un mecanismo elaborado para realizar el ordenamiento y arreglo de los transgenes en el ADN cromosomal de las plantas. La bacteria transfiere un segmento de su plásmido Ti, llamado ADN - T (ADN de transferencia) al núcleo de la célula de la planta, donde es integrado en el genoma nuclear de la planta. El proceso de transferencia del ADN - T es mediado por productos codificados por la región de virulencia (vir) del plásmido Ti (Tzfira & Citovsky, 2003).

Modificando los genes presentes en ADN - T, genes de interés agronómico pueden ser insertados en el plásmido (Tzfira & Citovsky, 2006), y usados en el mejoramiento genético de los cultivos.

a) Factores que median la transformación genética

Existen diferentes factores que intervienen en la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* determinando el éxito o fracaso en la transferencia del gen de interés y su posterior integración y expresión. Estos factores pueden ser: optimización de las condiciones del cultivo *in vitro* (composición de los medios de cultivo, cantidad de acetosiringona, temperatura de regeneración), tipo de explante con el que se iniciará el proceso de transformación (fuente y tamaño), genotipo del cultivar, edad de la planta, cepa de *Agrobacterium tumefaciens* empleada en la transformación, tiempo y condiciones de inoculación del tejido con *Agrobacterium tumefaciens*, densidad y período de pre - cultivo de la bacteria y la presencia de necrosis en el tejido de la planta causada por *Agrobacterium* (Levitus *et al.*, 2010; Alimohammadi & Bagherieh- Najjar, 2009; Luo *et al.*, 2006; Valderrama *et al.*, 2005; Yancheva *et al.*, 2002; Hiei *et al.*, 1994).

b) Limitantes durante la transformación genética

Durante la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* usualmente se obtienen plantas transgénicas que tienen ventajas como: inserciones de naturaleza estable, aleatoriedad de las inserciones que ocurren en el genoma y un bajo número de copias por evento. Pero en algunos casos se presentan ciertas plantas con desventajas como: inserciones incompletas del ADN - T, con delecciones, más de una copia de ADN - T (o fragmentos del ADN - T) en una o mas localizaciones del genoma de la planta y reorganizaciones cromosómicas (Wilson *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2003; Kohli *et al.*, 2003; Dai *et al.*, 2001; Fuertes, 1999; Cheng *et al.*, 1997; Bhattacharyya *et al.*, 1994).

Una de las primeras etapas que ocurren durante la transformación, es la fase de reconocimiento y adherencia entre la bacteria y las células de la planta, al finalizar esta fase ocurren varios mecanismos para la inserción del ADN - T al núcleo de la

célula hospedera, luego de generarse una copia del ADN - T, el gen *virD* produce la proteína VirD2 que actúa como endonucleasa de restricción clivando el ADN - T, tras la ruptura, esta proteína permanece unida al extremo 5', mientras que VirE2 crea una cubierta proteica, protegiendo el ADN - T de la degradación por nucleasas, así estas proteínas forman un complejo exportando el ADN - T hacia el núcleo de la célula vegetal (Deng *et al.*, 1998; Citovsky *et al.*, 1994).

Debido al hecho en que la proteína VirD2 se liga al extremo 5' del ADN - T, la integración del ADN - T al núcleo de las células de la planta hospedera ocurre por el borde derecho, (Hansen *et al.*, 1997), pero en algunos casos en ciertos eventos de transformación el ADN - T se puede insertar por el borde izquierdo antes que el borde derecho en el genoma de planta, y esto se da debido a los rearrreglos producidos cuando las inserciones o integraciones del ADN - T no son exitosas durante la transformación (Nacry *et al.*, 1998; Tax & Vernon, 2001).

2.3.2. Genes *cry*

Muchos de los genes foráneos que se sintetizan y se optimizan para el mejoramiento de cultivos de importancia agronómica derivan de los genes *Bt*, aislados de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, como los conocidos genes *cry*, los cuales codifican proteínas altamente específicas que son letales para diversos grupos de insectos (Doussoulin & Chávez, 2002).

La toxicidad de este insecticida biológico se debe a que *B. thuringiensis* presenta un cristal paraesporal durante la esporulación, este cristal contiene una δ - endotoxina también conocida como proteína Cry, responsable del efecto insecticida (Arrieta *et al.*, 2004). Dentro del grupo de δ - endotoxinas, se encuentran las proteínas Cry7Aa1 y Cry3Ca1. Estas son producidas como cristales romboidales y bipiramidales, respectivamente, que actúan en el control de insectos y son efectivas en coleópteros (Lambert *et al.*, 1992).

La toxina al ser ingerida por el insecto se inserta en las células intestinales y como su composición es proteica, se desnaturaliza por el calor, solubilizándose en condiciones

alcalinas con pH superiores a 9,5 (Fernández & Vega, 2002), luego se forma un poro o lesión, lo cual trae como consecuencia la lisis de las células intestinales, ocasionando la muerte del insecto.

Estas proteínas están constituidas por 3 dominios. El dominio I contiene siete hélices α antiparalelas y anfipáticas. Éste dominio está encargado de la formación del poro iónico. El dominio II está formado por tres láminas plegadas β y por tres asas. Este dominio juega un papel fundamental en la especificidad de la toxina, donde las asas interactúan con el receptor localizado en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio del insecto. El dominio III está formado por dos láminas plegadas β antiparalelas y también está involucrado en la interacción con receptores (Soberón & Bravo, 2008).

2.3.3. Regeneración in vitro en *Ipomoea batatas*

El establecimiento de un adecuado sistema que garantice la regeneración *in vitro* de los explantes transformados, es uno de los requisitos más importantes en la inserción de genes mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

El camote en cuanto a su capacidad de desarrollo, es una planta altamente plástica. Ha sido posible regenerar plántulas *de novo in vitro* de casi todas las partes de la planta: protoplastos, meristemos, porciones de tallo, hojas con peciolo, raíces y discos de hoja (Dodds, 1987).

Los meristemos son tejidos compuestos de células en constante división o también conocidas como células pluripotentes, las células meristemáticas al dividirse forman nuevos tejidos (Lizarraga *et al.*, 1992), cuyas actividades están reguladas por señales intrínsecas y ambientales (Okamura *et al.*, 1996). Motivo por el cual, los meristemos representan un excelente explante en la regeneración de plantas particularmente en especies recalcitrantes, o en especies en las cuales el sistema de regeneración en cultivo de tejidos *in vitro* aún no ha sido establecido (Hussein *et al.*, 2001). Así las plantas en las cuales su morfogénesis se da a partir de meristemos, regeneran asegurando que la inestabilidad genética y la variación somaclonal sean mínimas (Alam *et al.*, 2010). De

esta manera, los explantes que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, ya sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas (Levitus *et al.*, 2010).

Las hojas con peciolo también son explantes muy usados en la transformación de camote debido a los altos porcentajes de regeneración que presentan (Porobo Dessai *et al.*, 1995).

En todos los casos la primera etapa es la formación de callos en la superficie cortada. El tamaño y tipo de callos varía entre tratamiento y genotipos. Con un estímulo hormonal adecuado, es posible inducir a partir de la formación de callos plántulas regeneradas (Dodds, 1987).

La regeneración de plántulas *de novo* puede tener lugar a través de dos posibles vías: por organogénesis o por embriogénesis a partir de células somáticas. Ambas tanto organogénesis como embriogénesis pueden ocurrir de manera directa o indirecta, es decir, sin la presencia de un callo previo a la regeneración, o con ella, respectivamente (Litz & Jarret, 1991).

Se ha reportado la inducción de embriones somáticos en muchas plantas, entre ellas varios genotipos de camote. Los factores químicos más importantes para la embriogénesis somática son las auxinas exógenas, la fuente y la concentración del nitrógeno, y algunas otras sustancias como la sacarosa (Villalobos & Thorpe, 1991).

Se necesita la presencia de una auxina para la inducción del callo embriogénico. Usualmente se emplea el 2,4 - D o también el 2,4,5 - T, los cuales brindan el estímulo o inician la inducción de la embriogénesis somática en el callo. Sin embargo, la maduración de los embriones y la germinación no ocurren en presencia de las auxinas, en consecuencia hay que remover las auxinas o usarlas en concentraciones más bajas. Tanto la inducción de la embriogénesis somática como el desarrollo de los estados subsiguientes de los embriones dependen de la reducción de nitrógeno en el medio de cultivo (Litz & Jarret, 1991).

En dicotiledóneas, como lo es el camote, la embriogénesis somática es morfológicamente similar a un embrión cigótico, las células somáticas desarrollan a

plantas mediante estados de embriogenia morfológicos característicos, que se conocen como: globular, corazón, torpedo y fase cotiledonar (Yasuda *et al.*, 2000).

La respuesta embriogénica del callo depende del genotipo de la planta. Algunos cultivares se pueden regenerar fácilmente en un medio específico, mientras que otros cultivares no responden en el mismo medio (Litz & Jarret, 1991). Esto se produce debido a que ciertos cultivares de camote son recalcitrantes, haciendo que la producción de callos y la obtención de regenerantes sea difícil, lenta o laboriosa.

En la presente investigación se utilizó el cultivar Huachano ya que fue reportado como un cultivar con alto grado de totipotencia, lo que lo hace ideal como modelo de transformación (Medina, 1991).

2.3.4. Transformaciones realizadas en camote

Se han realizado varias transformaciones de camote con *Agrobacterium tumefaciens* vía embriogénesis somática en los cuales los transgenes fueron exitosamente insertados y expresados en las plantas regenerantes (Xing *et al.*, 2008; Otani *et al.*, 1998; Gama *et al.*, 1996). También resultan exitosas las transformaciones con *Agrobacterium* vía organogénesis usando como explantes hojas con peciolo se han llegado a transformar plantas de los cultivares Jewel y CEMSA 78354 (García *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2006).

En la búsqueda de resistencia a enfermedades y para el mejoramiento de la calidad nutricional se han realizado transformaciones en camote; introduciéndose genes de importancia agronómica para la resistencia a virus, como es el caso de la transformación en el cultivar Chikei, descrito por Okada *et al.*, 2001. Otros genes para resistencia a nematodos, como en la transformación genética de camote cultivar Lizixiang con el gen *OCI* (oryzacystatin-I) (Sheng-Jun *et al.*, 2004). Otras transformaciones de importancia se han realizado en la búsqueda de resistencia al gorgojo del camote, transformándose discos de hojas del cultivar Jewel usando el gen *cryIIIa* de *Bacillus thuringiensis*, obteniéndose plantas transgénicas para la resistencia a *Cylas formicarius*, a través de regeneración por organogénesis (Morán *et al.*, 1998). También se han usado los genes *cry7Aa1*, *cry3Ca1* y *ET33 - 34* en el cultivar Jewel vía organogénesis para conferir

resistencia a *Cylas puncticollis* y *C. brunneus* (Prentice, 2012; Ormachea, 2011) y otras investigaciones se han llevado a cabo para mejorar la calidad nutritiva del camote (Otani *et al.*, 2010; Otani *et al.*, 2007; Kasukabe *et al.*, 2006; Kimura *et al.*, 2001).

Ciertos autores han reportado transformaciones con un vector binario para dos genes de resistencia a antibióticos (kanamicina e higromicina) y el gen reportero GUS (Song *et al.*, 2004). En esta investigación se reportará la transformación del cultivar de camote Huachano vía embriogénesis somática con la construcción doble pCIP84 que lleva los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1* para la resistencia al gorgojo del género *Cylas*.

2.4. Caracterización *in vitro* y molecular de los regenerantes

Realizada la transformación, la caracterización tanto *in vitro* como molecular de los regenerantes putativamente transgénicos es una evaluación necesaria para el análisis de identificación, expresión y selección de los eventos que obtuvieron inserciones exitosas a diferencia de los que no la presentaron.

2.4.1. Prueba *in vitro* de resistencia a kanamicina

Las plantas resistentes a kanamicina, son aquellas que presentan en su genoma copias del gen *nptII*, el cual ha sido incorporado mediante transformación genética. En la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* se transfiere todo material genético ubicado dentro del ADN

T, los genes de resistencia a antibióticos o genes marcadores son colocados cercanos al borde izquierdo del ADN - T y los genes de interés son colocados cercanos al borde derecho; como la transferencia del ADN - T se da primero por el borde derecho que por el borde izquierdo, de esta manera se asegura la transferencia del gen de interés (Hellens *et al.*, 2000). Mediante esta prueba se puede evaluar de manera indirecta la incorporación de los transgenes en la planta, se asume que si el gen marcador de

selección fue capaz de introducirse dentro del genoma de la planta, también lo hicieron el resto de genes de interés.

Así, la discriminación de los eventos transgénicos de los escapes, proporciona el ahorro de tiempo y materiales durante la investigación.

2.4.2. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Esta prueba utiliza diferentes juegos de primers o iniciadores capaces de amplificar y así identificar la presencia de diversas secuencias de los genes de interés y sus respectivos promotores (*cry*), genes marcadores (*nptII*), genes de virulencia (*virD2*) y secuencias externas al ADN - T (backbone) que han podido ser integradas en el genoma de la planta durante el proceso de transformación.

a) Identificación de genes *cry*

Mediante PCR la presencia de los transgenes *cry* en las plantas putativamente transgénicas pueden ser identificados fácilmente, permitiendo diferenciar y seleccionar aquellas plantas que tras la transformación integraron estos genes de interés en su ADN.

b) Identificación del gen *nptII*

El gen *nptII*, el cual codifica a la enzima neomicina fosfotransferasa II inactivando al aminoglucósido 3'- fosfotransferasa (aph (3') - II) mediante una fosforilación, confiere resistencia al antibiótico kanamicina y puede ser identificado en los regenerantes putativamente transgénicos mediante PCR, con la amplificación se puede confirmar la presencia de la inserción del gen marcador de selección en el ADN de los eventos transgénicos (Beck *et al.*, 1982).

c) Identificación del gen *virD2*

Este PCR se realiza con la finalidad de verificar que no hubiesen secuencias asociadas con la virulencia proporcionada por *Agrobacterium tumefaciens* en las plantas resistentes a kanamicina, en el cual se utilizan primers que amplifican parte de la secuencia del gen bacteriano *virD2*.

La expresión de genes *vir*, presentes en uno de los plásmidos del vector binario de *Agrobacterium tumefaciens* en el proceso de transformación, permiten la producción y transferencia del ADN - T. El gen *virD2* se traduce a una proteína VirD2 que actúa como una endonucleasa de restricción clivando los bordes de las secuencias altamente conservadas, al escoger primers específicos para este gen *virD2*, se puede detectar si secuencias del gen *virD2* se encuentran en la planta debido a la patogenicidad brindada por *A. tumefaciens* en el momento de la transformación (Haas *et al.*, 1995).

d) Identificación de secuencias externas al ADN - T

Anteriormente se creía que durante la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*, solo secuencias entre los 2 bordes del ADN - T se transferían a la planta. Sin embargo hoy existen evidencias de que secuencias de ADN que se encuentran fuera de los bordes del ADN - T pueden ser ocasionalmente transferidas o integradas a la planta junto con el ADN - T, estas secuencias externas también son llamadas secuencias del vector binario o del esqueleto del plasmido "backbone" (Fu *et al.*, 2000; Kononov *et al.*, 1997; Ramanathan & Veluthambi, 1995; Ooms *et al.*, 1982).

Estas integraciones suceden como consecuencia de que la proteína VirD2 en lugar de asociarse al extremo 5' del ADN - T, se asocia al extremo 5' de las secuencias externas al ADN - T del plásmido Ti iniciando la transferencia de estas secuencias hacia la planta (Kononov *et al.*, 1997).

Las integraciones de secuencias externas al ADN - T ligadas al borde izquierdo se generan cuando el complejo proteína - ADN - T se exporta de la bacteria por el borde derecho (Ooms *et al.*, 1982), mientras que las secuencias externas ligadas al borde derecho son el resultado de que la iniciación y exportación del complejo proteína - ADN - T se realiza por el borde izquierdo.

Generalmente la transferencia de las secuencias externas al ADN - T podrían no ser detectadas debido a: (1) que no hay ningún tipo de selección en la transferencia de estas secuencias; y a que (2) los investigadores generalmente no analizan si las plantas que obtuvieron mediante transformación tienen en su genoma la inserción de estas (Martineau *et al.*, 1994). Muchas veces las secuencias externas del ADN - T pertenecientes al esqueleto del vector “backbone” son muy pequeñas, siendo difíciles de distinguir. Aunque cabe señalar que no siempre la presencia de estas secuencias externas suelen pasar desapercibidas, a veces pueden traer efectos indeseables, promoviendo rearrreglos en el transgen (Fu *et al.*, 2000).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada del Centro Internacional de la Papa (CIP), en coordinación con el laboratorio de biotecnología y fisiología vegetal de la Universidad Ricardo Palma (URP), Facultad de Ciencias Biológicas.

3.2. Materiales

3.2.1. Material biológico

Se utilizó como material vegetal plantas de camote *Ipomoea batatas* cv. Huachano (CIP420065) provenientes del Banco de Germoplasma *in vitro* del CIP.

Asimismo, se utilizaron las bacterias transformadas de: *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli* (Tabla 1), conteniendo el plásmido pCIP84 con los genes de resistencia *cry7Aa1* y *cry3Ca1* (Figura 1). Ambas provenientes de criopreservación del banco de bacterias del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del CIP.

3.3. Metodología

3.3.1. Propagación *in vitro* del material vegetal

La propagación del material *in vitro* se realizó siguiendo el protocolo señalado por Ormachea, 2011.

Las plantas de camote *Ipomoea batatas* cv. Huachano (CIP420065) se propagaron en magentas plásticas (Phytatray II, SIGMA) conteniendo 70ml del medio de propagación en *I. batatas* (MPB) líquido estéril (Tablas 2 y 3). Se cortaron y colocaron 4 o 6 esquejes del tallo de la planta *in vitro* de *Ipomoea batatas* cv. Huachano, cada uno con 6 o 4 nudos respectivamente, manteniéndose a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas luz a 3000 lux ($40 \text{ uE/ m}^2/\text{seg}$) de intensidad luminosa y 70% de humedad relativa (Figura 2) por 5 semanas, momento en el cual se procedió al aislamiento de meristemas o a la extracción de hojas con peciolo para las transformaciones por embriogénesis somática indirecta.

3.3.2. Cultivo y siembra de bacterias

Se tomó un inculo de las bacterias criopreservadas (AT131 y EC194) y se sembró en tubos corning estériles, con 3ml del medio Luria Bertani (LB) líquido (Tabla 4). Luego las bacterias se incubaron en agitación constante a 250 rpm con una temperatura de 28°C por 48 horas en el caso de *A. tumefaciens* y a 37°C por 24 horas en el caso de *E. coli* para la extracción de ADN plasmídico.

A su vez, la bacteria *A. tumefaciens* que porta el plásmido pCIP84 se resembró en placas Petri plásticas que contenían el medio LB sólido (Tabla 5). Finalmente, las placas sembradas se incubaron en la estufa (Gravity convection incubador, PRECISION SCIENTIFIC) a 28°C por 48 horas para la transformación de explantes de camote.

3.3.3. Extracción de ADN plasmídico

Se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit SV Minipreps DNA Purification System Wizard® Plus - PROMEGA.

Se centrifugó 2ml de cultivo bacteriano a 13,200 rpm (Centrifuge 5415D, EPPENDORF) durante 5 minutos, a continuación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 250 μl de la solución de resuspensión celular, se añadió 250 μl de solución de lisis celular y, se mezcló homogéneamente, enseguida se añadió 10 μl de

solución de proteasa alcalina, se mezcló nuevamente, y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego, se añadió 350µl de solución de neutralización, se mezcló y se centrifugó 13,200 rpm por 10 minutos.

Se decantó el sobrenadante en la columna del kit, colocada dentro del tubo de colección, y se centrifugó a 13,200 rpm durante 1 minuto, después se descartó el líquido del tubo de colección y se reinsertó la columna. Luego, se añadió 750µl de la solución de lavado y se centrifugó a 13,200 rpm por 2 minutos, se descartó el líquido del tubo de colección y se repitió el lavado con 250µl. Después, se transfirió la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml estéril.

Finalmente, se añadió 100µl de agua libre de nucleasas esterilizada a la columna, se centrifugó a 13,200 rpm por 1 minuto, se descartó la columna y se almacenó el ADN plasmídico a - 20°C.

3.3.4. Análisis de restricción del vector binario

Se realizó una digestión simple del plásmido extraído de *Agrobacterium tumefaciens* (Tabla 6) con la endonucleasa de restricción *EcoRI* (20U/µl, BIOLABS). El producto obtenido se corrió en un gel de agarosa al 1% (Tabla 7). El gel se colocó en la cámara electroforética, la cual contenía 60ml de buffer TBE 1X (Tablas 8 y 9), se cargaron las muestras y se dejó correr por 30 minutos a 70V, usando como marcador de peso de bandas del fago Lambda (lambda DNA - BIOLABS digerido con la endonucleasa de restricción *PstI*) (Tabla 10), con la finalidad de determinar que el patrón de bandas obtenido coincida con el reportado para el plásmido pCIP84 en el programa Vector NTI (versión 11).

3.3.5. Transformación genética

Se utilizaron dos protocolos de transformación por embriogénesis somática indirecta con *Agrobacterium tumefaciens*, según el tipo de explante inicial: meristemos y hojas con peciolo (Figura 3 y 4).

a) Embriogénesis somática a partir de meristemos

Las plantas *in vitro* de *Ipomoea batatas* cv. Huachano se transformaron tomando como base los protocolos de regeneración de Liu *et al.*, 2001; Dhir *et al.*, 1998 y Al - Mazrooei *et al.*, 1997.

Removiéndose los primordios foliares, se aislaron con un bisturí (SMIC N°11), los 3 primeros meristemos laterales de 0.5mm aproximadamente, de plantas de 5 semanas de propagadas, para inducir en ellos embriogénesis somática. Se colocaron 20 meristemos por placa petri (Figura 5) que contenía el medio de cultivo 2,4,5 - T (Tabla 11), manteniéndose en oscuridad y realizándose su respectivo cambio de placas mensualmente.

Seis semanas después del aislamiento de meristemos se realizó la transformación de los callos embriogénicos, mediante el método de corte con cuchilla (bisturí SMIC N°10) citado por Medina *et al.*, 2003.

Los callos embriogénicos fueron cortados con la cuchilla embadurnada en la bacteria (Figura 6) y se colocaron en una placa petri estéril con el medio de cultivo 2,4,5 - T acetosiringona (Tabla 12), durante dos días en oscuridad.

Los callos control, fueron cortados del mismo modo que los anteriores pero sin la presencia de la bacteria. Los fragmentos de callos se colocaron en una placa petri estéril conteniendo el medio de cultivo 2,4,5 - T.

Los callos transformados se colocaron en una placa con el medio de cultivo 2,4,5 - T ceka (Tabla 13). Se mantuvieron 12 callos por placa en este medio durante 8 semanas.

Posteriormente los callos se colocaron en placas con el medio de cultivo ABA ceka 10mg (Tabla 14) durante 4 semanas para luego ser cambiados a placas con el medio de cultivo ABA ceka 25mg (Tabla 15) por un tiempo de 8 semanas.

Por último para la regeneración, los callos embriogénicos se colocaron en magentas conteniendo el medio de cultivo AG₃ ceka (Tabla 16), durante 9 semanas.

La evaluación de cada tratamiento se realizó cada 15 días previo al cambio de medio en cada una de las etapas anteriormente nombradas. Con excepción del último tratamiento

cuyas evaluaciones y cambio de medio se efectuó mensualmente. Los callos control siguieron el mismo tratamiento que los explantes transformados, pero sin presencia de los antibióticos kanamicina y cefotaxima en los medios de cultivo.

Los regenerantes que presentaron apariencias normales fueron transferidos a tubos de ensayo que contenían 5 ml del medio MPB semisólido (Tabla 17).

b) Embriogénesis somática a partir de hojas con peciolo

Las plantas *in vitro* de *Ipomoea batatas* cv. Huachano se transformaron siguiendo los protocolos de Samolski, 2004 y Cipriani *et al.*, 1999.

Se cortaron con el bisturí (SMIC N°10) las 4 hojas más jóvenes y abiertas de plantas de 5 semanas de propagación, conservando un peciolo de 1,5cm aprox.

Las hojas control, después de cortadas se colocaron en una placa petri estéril conteniendo el medio de cultivo MCS (Tabla 18), mientras que en las hojas que se realizó la transformación, la región cortada del peciolo se colocó en contacto con la bacteria y luego se introdujo en el medio de cultivo MCS, durante 2 días en oscuridad, luego de lo cual los explantes se colocaron en el medio de cultivo F15 (Tabla 19), por 3 días, luego de los cuales se les trasladó al medio de cultivo F9 (Tabla 20) por 6 semanas (Figura 7).

Después de ello, los callos se colocaron en el medio de cultivo G2,4 - D (Tabla 21), manteniéndose en este medio hasta que se obtuvo embriones. Los embriones obtenidos fueron transferidos al medio de cultivo ABA (Tabla 22) hasta obtener plantas de apariencia normal.

Finalmente los regenerantes de apariencia normal se colocaron en tubos de ensayo que contenían el medio MPB semisólido, mientras que, las plantas anormales se colocaron de nuevo en el medio de cultivo F9.

La evaluación de cada tratamiento se realizó previo al cambio de medio en cada etapa, los explantes control se cambiaron a los mismos medios durante el mismo periodo de tiempo que los explantes transformados, pero sin presencia de los antibióticos kanamicina y cefotaxima.

La eficiencia de regeneración (ER) y transformación (ET) se evaluó utilizando el Test de Proporciones del programa R (Versión 2.15.2), el cual permitió comparar estadísticamente las eficiencias de regeneración y transformación en la comparación de ambos métodos de transformación usados (meristemos y hojas con peciolo). La eficiencia de regeneración (ER) se calculó dividiendo el número de explantes regenerados (se consideró solo un regenerante por explante) entre el número total de explantes transformados, multiplicando el resultado por cien; mientras que la eficiencia de transformación (ET) se calculó dividiendo el número de eventos transgénicos entre el número total de explantes transformados, multiplicando el resultado por cien (Figura 8).

3.3.6. Prueba de resistencia a kanamicina (prueba de callos)

Esta prueba se realizó siguiendo el protocolo señalado por Ormachea, 2011.

Se seleccionaron los regenerantes que muestran resistencia a kanamicina de los que no la tienen, tomándose las hojas del tercio superior: de los regenerantes obtenidos mediante el proceso de transformación, de una planta no transgénica (planta control negativo) y de una planta transgénica (planta control positivo). A continuación, se cortaron fragmentos de hojas tanto de los regenerantes obtenidos en la transformación como de las plantas controles y se colocaron en placas Petri que contenían el medio 303 con kanamicina (Tabla 23) y el medio 303 control (Tabla 24).

Luego, la selección se llevó a cabo 5 semanas después de iniciada la prueba. Para la identificación de regenerantes resistentes a kanamicina, se observó la formación de callos en los medios 303 con kanamicina y 303 control. La eficiencia de selección expresada como el número de eventos transgénicos obtenidos del total de explantes regenerados multiplicados por cien también fue evaluada (Figura 9).

Finalmente, los regenerantes que formaron callo en el medio 303 con kanamicina, fueron reconocidos como eventos km positivos y se propagaron en tubos de ensayo con medio MPB semisólido para su caracterización molecular mediante PCR.

3.3.7. Extracción de ADN a pequeña escala

Se realizó la extracción de ADN vegetal a pequeña escala de los regenerantes obtenidos siguiendo el protocolo descrito por Wilson, 1987.

Se cortaron de 4 a 6 hojas de plantas *in vitro* de los regenerantes, enseguida se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 2ml de capacidad. A estos tubos se les agregó 500µl de la mezcla de Buffer de Extracción CTAB 2X (Tabla 25) + β - mercaptoetanol. (Por cada 700µl de CTAB 2X se le agregó 2µl β - mercaptoetanol). Luego se colocaron las esferas de cerámica estériles dentro de los tubos, y los tubos se pusieron en la trituradora Savant Fast Prep Grinder, moliéndose por 40 segundos a una velocidad de 4m/s. Luego se incubaron las muestras a 65°C durante 30 minutos, agitando los tubos 3 veces los primeros 5 minutos de la incubación. Después se agitaron 2 veces cada 10 minutos. Se retiraron las muestras de la incubadora y se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos. Inmediatamente, se agregó 900µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), y se agitaron los tubos hasta homogenizar el contenido. Luego se centrifugó a 14,000 rpm (Centrifuge 5415D, EPPENDORF) por 10 minutos, se retiraron los tubos de la microcentrifuga con cuidado de no mezclar las dos fases formadas y se transfirió el sobrenadante a tubos Eppendorf esterilizados de 1.5ml, teniendo cuidado de no transferir la interfase. Después se agregó 0.6 volúmenes de isopropanol frío (240µl aprox.) y se agitó suavemente por espacio de 10 segundos. Se incubó a - 20°C durante 20 minutos. Seguidamente, se centrifugó a 14,000 rpm por 20 minutos. Se decantó el isopropanol y se dejó los tubos invertidos sobre papel toalla por 1 minuto, a continuación se lavó el pellet con 1ml de etanol al 70% primero y después con etanol al 100%, eliminando luego el alcohol y dejando secar. Finalmente se resuspendió el pellet en 100µl de agua destilada esterilizada. Luego de la extracción del ADN se le realizó un paso de limpieza para lo que se le agregó 100µl de cloroformo: fenol: alcohol isoamílico (25: 24: 1), se homogenizó y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos. Después se separó el sobrenadante en un tubo Eppendorf estéril y se le agregó 0.1 volumen de acetato de sodio 3M pH 5.0 más 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se homogenizó y se dejó precipitar el ADN a - 70°C durante 30 minutos, luego se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos a - 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500µl de etanol al 70% frío, se centrifugó a 14,000 rpm durante

10 minutos, se dejó secar el pellet de ADN, y se resuspendió en 50µl de agua destilada esterilizada a 4°C hasta su total disolución. Al final se añadió 1µl de RNAsa A a una concentración de 10 mg/ml (SIGMA), se mezcló y se incubó a 37°C por 2 horas. Las muestras se almacenaron a -20°C. Posteriormente, se verificó la calidad del ADN de las muestras corriéndolas en un gel de agarosa al 0.8% (Tabla 26).

3.3.8. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Se evaluó por PCR la presencia de los genes de interés *cry7Aa1* y *cry3Ca1*, gen marcador de selección *nptII*, gen bacteriano *virD2* y se comprobó que el fragmento de ADN transferido a la planta corresponda solo al ADN - T, es decir, que no se haya transferido ADN del plásmido en sí (backbone).

Se emplearon varios juegos de primers para los análisis de PCR (Tabla 27). Los cuales se diseñaron en el programa Vector NTI (Versión 11), partiendo de la secuencia de la construcción genética. Con excepción de los primers de *virD2* los cuales fueron diseñados por Haas *et al.*, 1995.

Junto con los primeros, otros componentes como la Taq polimerasa (BIOLABS) fueron utilizados en la obtención del Master mix o mezcla de la reacción para la amplificación por PC (Tabla 28).

Después de homogenizar la reacción, se programaron (Tabla 29) los ciclos de amplificación en el termociclador (Veriti Gradient Thermal Cycler, APPLIED BIOSYSTEMS):

IV. RESULTADOS

4.1. Análisis de restricción del vector binario

Se identificó bandas idénticas al comparar la digestión del ADN del plásmido pCIP84 extraído de *Agrobacterium tumefaciens* con la endonucleasa de restricción *EcoRI*, como en la simulación realizada por el programa Vector NTI - 11 (Figura 10). En la figura 11 se pueden observar que los 3 fragmentos de restricción obtenidos tuvieron el mismo peso que los esperados (11289pb, 1858pb y 1455pb).

4.2. Transformación genética

Se transformaron 328 explantes en total (entre 46 meristemos y 282 hojas con peciolo) de *Ipomoea batatas* cv. Huachano con la construcción pCIP84 que lleva los genes de resistencia *cry7Aa1* y *cry3Ca1*, obteniéndose al final 11 regenerantes (5 de los cuales provenían del protocolo a partir de meristemos, mientras que, los 6 restantes provenían del protocolo a partir de hojas con peciolo), los cuales fueron analizados tanto a nivel *in vitro* como a nivel molecular. Presentándose pérdidas por agroinfección, sólo en 22 de los explantes transformados a partir del protocolo de hojas con peciolo (Tabla 30).

a) Embriogénesis somática a partir de meristemos

Debido a que se escogieron solamente meristemos embriogénicos para la transformación, de todos los meristemos extraídos de camote solo se transformaron 46 explantes. En la regeneración se observó los tres estados de embriogenia característicos: globular, corazón, torpedo y fase cotiledonar (Figura 12).

Tras la transformación, los explantes se transfirieron al medio de cultivo 2,4,5 - T el cual contenía acetosiringona, compuesto fenólico que induce la transferencia del ADN - T, luego los callos durante los 2 meses siguientes se colocaron en el medio de cultivo

2,4,5 - T ceka, algunos permanecieron embriogénicos creciendo y tornando un color amarillento en los estados de globular a corazón (Figura 12 A. y B.), mientras que, otros callos sufrieron un proceso de reversión tornándose no embriogénicos (de color blanquecinos y opacos) y en algunos casos incluso con inhibición de crecimiento.

En el medio de cultivo ABA ceka 10mg ocurrió la transición de los estados de embriogenia de corazón a torpedo, así la parte embriogénica de los callos se tornó de color blanquecino a verde (Figura 12 C. y D.), continuando su desarrollo en el medio de cultivo ABA ceka 25mg, desarrollándose finalmente la fase cotiledonar (Figura 12 E. y F.). Posteriormente, los callos se trasladaron al medio de cultivo AG₃ ceka, donde se convirtieron en regenerantes normales listos para su propagación (Figura 12 G.).

Finalmente, las plantas normales se propagaron en tubos de ensayo que contenían el medio MPB semisólido (Figura 12 H.).

Los primeros eventos putativamente transgénicos se obtuvieron a partir del séptimo mes hasta el doceavo mes después de la transformación.

De los 46 explantes transformados del cultivar Huachano a partir de meristemos, se obtuvieron 5 (10.87%) regenerantes normales putativamente transgénicos, sin pérdidas por agroinfección.

b) Embriogénesis somática a partir de hojas con peciolo

Los 282 explantes, tras la transformación, se transfirieron al medio de cultivo F9, observándose la formación de callos en la superficie del peciolo, generalmente desde el extremo cortado del peciolo, y en algunos casos hasta llegar a la base de la hoja (Fig. 13 A.).

Las hojas de los explantes empezaron a oxidarse luego de tres semanas de cultivo, pudiéndose diferenciar claramente los callos que tenían un color amarillento, desechándose la parte necrótica del explante se mantuvieron los callos en el medio de cultivo F9.

En el medio de cultivo G2,4 - D algunos callos presentaron el desarrollo estructuras embrionarias (Fig. 13. B., C. y D.), a diferencia de otros que fueron no embriogénicos y permanecieron verdes y compactos.

Los callos que formaron embriones se transfirieron al medio de cultivo ABA (Fig. 13 E.), los cuales fueron mantenidos en este medio hasta obtener regenerantes normales (Fig. 13 F.), los que fueron propagados en el medio MPB semisólido.

Los primeros eventos putativamente transgénicos se obtuvieron a partir del sexto mes hasta el doceavo después de la transformación.

De los 282 explantes transformados mediante este método, 22 de estos (7.8%) fueron eliminados debido a la agroinfección que presentaron. Luego de la eliminación, de los 260 callos restantes solo 6 (2.13%) regeneraron en plantas normales.

La eficiencia de regeneración (ER), calculada del número de explantes regenerados (considerando un regenerante por explante), dividido entre el total de explantes transformados por cien (Figura 8), fue de 10.87% en la transformación a partir de meristemos y de 2.13% en la transformación a partir de hojas con peciolo, con un *p-value* 0.009 se demostró que la diferencias entre ambos porcentajes de regeneración eran significativas.

La eficiencia de transformación (ET), es decir, el número de eventos transgénicos estables obtenidos a partir del total de explantes transformados por cien (Figura 8), fue de 8.70% en la transformación a partir de meristemos y de 1.42% en la transformación a partir de hojas con peciolo (Tabla 31), con un *p-value* de 0.014 se demostró que también hay diferencias significativas en la obtención de eventos transgénicos entre ambos protocolos.

4.3. Prueba de resistencia a kanamicina (prueba de callos)

La expresión del transgén *nptII* se evaluó de manera indirecta mediante la formación de callo en la prueba de resistencia a kanamicina.

En la transformación por embriogénesis somática a partir de meristemos, de los 5 regenerantes obtenidos, las hojas de 4 de ellos (regenerantes I, II, IV y V) fueron capaces de formar callos en el medio 303 con 50 mg/l de kanamicina, es decir, fueron positivos a la prueba de resistencia a kanamicina (Tabla 32), mientras que las hojas del regenerante no transformado se tornaron cloróticas y no se observó formación de callos (Figura 14 A.).

La eficiencia de selección (ES), expresada como el número de eventos transgénicos obtenidos del total de explantes regenerados multiplicados por cien (Figura 9) en el protocolo de transformación a partir de meristemos, fue de 80%, debido a que de las 5 plantas que regeneraron solo 4 incorporaron el gen *nptII* y una resultó ser un escape.

En la transformación a partir de hojas con peciolo de los 6 regenerantes obtenidos, las hojas de 5 regenerantes (2, 3, 4, 5 y 6) fueron capaces de formar callos en el medio 303 que contenía 100mg/l de kanamicina (Tabla 32), y uno de ellos fue un escape (regenerante 1), es decir, una planta no transformada capaz de crecer en los medios de selección (Figura 14 B.).

La eficiencia de selección (ES), calculada del número de eventos transgénicos obtenidos del total de explantes regenerados multiplicados por cien (Figura 9) en el protocolo de transformación a partir de hojas con peciolo, fue de 83.3%, debido a que de las 6 plantas regeneradas 5 presentaron la inserción del gen *nptII*.

4.4. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Para realizar la prueba de PCR, primero se tuvo que extraer el ADN de cada uno de los regenerantes obtenidos, el ADN plasmídico de *Escherichia coli* conteniendo la construcción pCIP84 (usado como control positivo en la detección de genes *cry7Aa1*, *cry3Ca1*, *nptII* y secuencias backbone) y el ADN genómico de *Agrobacterium tumefaciens* (usado como control positivo en la detección del gen *virD2*). A continuación, se verificó la calidad del ADN extraído (Figura 15).

De los 9 regenerantes positivos a prueba de callos (I, II, IV, V, 2, 3, 4, 5 y 6), 8 presentaron inserciones completas (I, II, IV, V, 2, 3, 4 y 5), es decir, la presencia de los genes *cry7Aa1*, *cry3Ca1* y *nptII*; mientras que un solo regenerante (evento 6) presentó una inserción incompleta, es decir, solo presentó la inserción del gen *nptII*, siendo negativo para los 2 transgenes de interés (*cry7Aa1* y *cry3Ca1*). De los 8 regenerantes con inserciones completas, solo uno fue positivo al gen *virD2* demostrando todavía tener contaminación por *Agrobacterium tumefaciens* y de estos 8 eventos transgénicos 4 fueron positivos a secuencias externas al ADN - T del plásmido “Backbone” (Tabla 33).

En la detección del gen *cry7Aa1* (Figura 16), los resultados de PCR en los regenerantes obtenidos por embriogénesis somática a partir de meristemos, muestran que, de los 5 regenerantes, 4 de ellos (I, II, IV y V) fueron positivos a la amplificación del gen *cry7Aa1*; mientras que, en los regenerantes obtenidos por embriogénesis somática a partir de hojas con peciolo, de los 6 regenerantes, 4 de ellos (2, 3, 4 y 5) fueron positivos a PCR (Tabla 33).

Para la identificación del gen *cry3Ca1* los resultados de PCR (Figura 17) en los regenerantes obtenidos mediante transformación a partir de meristemos, muestran que, de los 5 regenerantes, 4 de ellos (I, II, IV y V) fueron positivos a PCR; mientras que, en los regenerantes obtenidos a partir de hojas con peciolo, de los 6 regenerantes, 4 de ellos (2, 3, 4 y 5) fueron positivos a la amplificación del gen *cry3Ca1* (Tabla 33).

Los resultados de la prueba *in vitro* de resistencia a kanamicina coinciden con los resultados de PCR del gen *nptII* (Figura 18). En los regenerantes obtenidos por embriogénesis somática a partir de meristemos, de los 5 regenerantes, 4 de ellos (I, II, IV y V) fueron positivos a la amplificación del gen *nptII*; mientras que, en los regenerantes obtenidos por embriogénesis somática a partir de hojas con peciolo, de los 6 regenerantes, 5 de ellos (2, 3, 4, 5 y 6) fueron positivos a PCR. De estos regenerantes, solo el 20% (regenerante 6) presentó una inserción incompleta, es decir, incorporó en su genoma solo el gen *nptII* (Tabla 33).

De todas las 8 plantas que presentan inserciones completas del ADN - T, solo una (regenerante 2 obtenido mediante transformación a partir de hojas con peciolo) amplifica para el gen *virD2* “gen de virulencia” de *A. tumefaciens* (Figura 19). Mientras que, en el protocolo de transformación a partir de meristemos ninguna planta

transformada fue *virD2* positiva, lo que indica que las plantas: I, II, IV, V, 3, 4 y 5 estaban libres de la presencia de *A. tumefaciens*.

En la determinación de secuencias del vector backbone los resultados de PCR muestran que 4 de los 8 eventos con inserciones completas (50%) presentan secuencias de ADN externas a los bordes del ADN - T. En los regenerantes obtenidos por embriogénesis somática a partir de meristemos, de los 4 regenerantes con inserciones completas, 2 de ellos (II y V) fueron positivos a la amplificación de secuencias backbone; mientras que, en los regenerantes obtenidos por embriogénesis somática a partir de hojas con peciolo, de los 4 regenerantes con inserciones completas, 2 de ellos (2 y 5) también fueron positivos a PCR, asimismo los eventos I, IV, 3 y 4 demostraron estar libres de la presencia del esqueleto del vector de transformación “backbone” (Figura 20).

V. DISCUSIÓN

Previo a la transformación genética es importante verificar el plásmido a usar, para tener la seguridad de que el material genético que se transferirá al genoma de la planta sea el adecuado. Existen diversos métodos para determinar la identidad molecular del ADN recombinante como la secuenciación y el análisis de restricción del plásmido recombinante. En la presente investigación la preselección se ha llevado a cabo realizando un análisis de restricción de la construcción que se desea utilizar en la transformación.

En el resultado del análisis de restricción, tras la digestión del plásmido extraído de *A. tumefaciens* (pCIP84), el tamaño de las bandas obtenidas coincidió con el esperado según los mapas genéticos del vector realizado por el programa Vector NTI (Versión 11), lo que corroboró la identidad de la construcción que fue utilizada en los experimentos de transformación de *Ipomoea batatas* cv. Huachano. Igualmente, Samolski, 2004 reportó en su análisis de restricción la similitud entre las bandas obtenidas (a partir de la digestión del plásmido pCIP41) con las esperadas.

En la transformación por embriogénesis somática indirecta a partir de meristemas en el cultivar Huachano, la eficiencia de regeneración (ER) obtenida fue de 10.87% y la eficiencia de transformación (ET) fue de 8.70% con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, mientras que, Gama *et al.*, 1996 reportaron valores de 51.18% en la eficiencia de regeneración y 6.29% en la eficiencia de transformación de meristemas en el cultivar White star con la cepa de *A. tumefaciens* EHA101. Las diferencias entre las eficiencias anteriormente mencionadas se deben a que los procesos de transformación y regeneración de camote son genotipo-dependiente (Santa Maria *et al.*, 2009; García *et al.*, 2008). Por otro lado, la eficiencia de transformación también puede ser influenciada por el tipo de cepa de *Agrobacterium tumefaciens* empleada durante el proceso de transformación (Valderrama *et al.*, 2005; Otani *et al.*, 1998). La cepa EHA105 tiene un alto potencial de infección y ha sido reportada con altas eficiencias de transformación en diferentes cultivares (Luo *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2004; Hood *et al.*, 1993).

En la transformación por embriogénesis somática indirecta a partir de hojas con peciolo la eficiencia de regeneración (ER) obtenida con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 que contiene el vector binario pCIP84 fue de 2.13% y la eficiencia de transformación (ET) fue de 1.42%, mientras que, en la investigación realizada por Samolski, 2004 se reportaron valores entre 4.10 - 4.12% de eficiencia de regeneración y transformación con la misma cepa de *A. tumefaciens* pero con el vector binario pCIP41 en el mismo cultivar. A su vez, Watanabe *et al.*, 1998 reportaron una eficiencia de transformación de 33.6% usando el mismo protocolo de transformación en el cultivar de camote Regal con la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 que contenía el vector binario pBI121. Estas diferencias entre las eficiencias anteriormente descritas, se deben a que las eficiencias de regeneración y transformación en el cultivar Huachano se podrían ver altamente influenciadas por la edad del explante (Valderrama *et al.*, 2005). Debido a que en la presente investigación se emplearon plantas que tenían 5 semanas de propagadas a diferencia de Samolski, 2004, quien utilizó plantas de 4 semanas de propagación. Otra razón para las diferencias entre las eficiencias de regeneración y transformación obtenidas en esta investigación aun siendo el mismo cultivar, podría deberse a las diferentes construcciones utilizadas presentes en *Agrobacterium tumefaciens*. En el trabajo de Yancheva *et al.*, 2002 se hallaron diferencias significativas en la eficiencia de transformación para el mismo cultivo en función de la construcción introducida en una misma cepa de *Agrobacterium tumefaciens*. También al comparar los resultados de las investigaciones realizadas por Luo *et al.*, 2006 y Ormachea, 2011 vemos que en ambas investigaciones las eficiencias de transformación varían en 20% y 0.1 - 0.2%, respectivamente; aun usando el mismo cultivar (Jewel), la misma cepa de *A. tumefaciens* (EHA105) y el mismo protocolo de transformación pero diferentes construcciones. Por otro lado al comparar los resultados de la presente investigación con el trabajo de Watanabe *et al.*, 1998 se puede reiterar que las diferencias entre ambas eficiencias de transformación se ven influenciadas debido a los diferentes genotipos y cepas de *A. tumefaciens* utilizadas.

La eficiencia de selección (ES) en el protocolo de transformación a partir de meristemas usando 25mg/l de kanamicina fue de 80%, debido a que de las 5 plantas que regeneraron solo 4 incorporaron los genes de interés y una resultó ser un escape; mientras que, la eficiencia de selección (ES) en el protocolo de transformación a partir de hojas con peciolo usando 50mg/l de kanamicina fue de 83.3%, debido a que de las 6

plantas regeneradas 5 presentaron los genes insertados y una de ellas presentó una inserción incompleta. Sin embargo, Samolski, 2004 usando la misma concentración de kanamicina (50mg/l) obtuvo una eficiencia de selección (ES) del 100%, es decir, todos los regenerantes presentaron la inserción de los transgenes.

Comparando los dos protocolos de transformación usados (a partir de meristemos y hojas con peciolo) en la presente investigación, es posible deducir que la diferencia entre las eficiencias de regeneración y transformación entre ambos protocolos se deban principalmente a: Tipo de explante utilizado a partir del cual se inició el proceso de transformación, superficie de contacto entre los explantes y *Agrobacterium tumefaciens*, tipo de auxinas utilizadas en ambos protocolos y la concentración de los antibióticos utilizados.

Estos resultados son corroborados por autores como Alimohammadi & Bagherieh-Najjar, 2009 y Hiei *et al.*, 1994 quienes reportan que el tipo de explante es uno de los principales factores que influyen en la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Asimismo, Sivparsad & Gubba, 2012 demostraron que la presencia de tejidos meristemáticos en los brotes apicales del cv. de camote Blesbok contribuyeron a una alta obtención de regenerantes en comparación de los demás explantes analizados.

El tipo de auxinas también pudo influenciar en la regeneración de los explantes en ambos protocolos. Triqui *et al.*, 2008 y Al - Mazrooei *et al.*, 1997 compararon el uso de las auxinas 2,4,5 - T y 2,4 - D durante la inducción de callos en varios cultivares de camote, obteniendo mayor embriogénesis somática en mayor número de cultivares con el empleo de la auxina 2,4,5 - T. De esta manera, el protocolo de transformación a partir de meristemos pudo haber obtenido una mayor eficiencia de regeneración debido a la presencia de 2,4,5 - T, a diferencia del protocolo de transformación a partir de hojas con peciolo en el cual se utilizó 2,4 - D.

Otra razón por la cual el protocolo de transformación a partir de meristemos tuvo mayor eficiencia podría asumirse debido a que la concentración del antibiótico cefotaxima en el protocolo de transformación a partir de meristemos fue lo suficientemente efectivo, ya que en este protocolo no se presentaron pérdidas por contaminación con *Agrobacterium tumefaciens*, mientras que, en el protocolo de transformación a partir de hojas con peciolo, la concentración de cefotaxima pudo no haber sido la adecuada, por

ello el 7.8% de los explantes (22 hojas) tuvieron que ser eliminados debido a la agroinfección presentada. Por otro lado, la concentración de kanamicina como agente selector fue mayor en el protocolo de transformación a partir de hojas con peciolo que en el protocolo a partir de meristemos, motivo por el cual se pudo obtener una más alta eficiencia de selección (ES). Esto es debido a que, la mayor concentración del antibiótico kanamicina en el protocolo de transformación a partir de meristemos podría inhibir el proceso de embriogénesis en etapas tempranas de desarrollo. Xing *et al.*, 2008; reportaron una mayor eficiencia de viabilidad y proliferación de los callos embriogénicos de camote del cultivar Xu55-2 con 10mg/l de kanamicina debido a que usando concentraciones más altas, las frecuencias de proliferación en los callos embriogénicos disminuían.

Tras el proceso de transformación todas las plantas que regeneraron en presencia del agente selectivo correspondiente al gen marcador de selección utilizado fueron consideradas como “plantas putativamente transgénicas”, puesto que aún se desconoce si se incorporó dentro de su genoma el gen de selección que les confiere a las células transgénicas que lo expresan una ventaja con respecto a las células no transgénicas. Sin embargo, en esta etapa se pueden presentar escapes por la presencia de explantes no transformados con tolerancia natural al antibiótico, que regeneraron a plantas, lo que obliga a evaluar todos los regenerantes mediante pruebas *in vitro* y moleculares para determinar la presencia de los transgenes, considerando así a las plantas positivas en ambas pruebas como “eventos transgénicos”. En esta prueba fisiológica mediante la formación de callo se logró evaluar indirectamente la expresión del gen *nptII*, debido a que las plantas que incorporaron este gen dentro de su genoma fueron capaces de crecer y formar callos en un medio con altas concentraciones de kanamicina, normalmente tóxicas.

De esta manera, de las 5 plantas putativamente transgénicas obtenidas mediante el protocolo de transformación a partir de meristemos, 4 fueron resistentes a kanamicina, mientras que, en el protocolo de transformación a partir de hojas con peciolo, de las 6 plantas putativamente transgénicas, 5 fueron resistentes a kanamicina. Sin embargo en la investigación realizada por Samolski, 2004 se reportó que todas las plantas putativamente transgénicas que se obtuvieron fueron resistentes a kanamicina.

En la presente investigación, la inserción del gen *nptII* en 9 regenerantes putativamente transgénicos del cv. Huachano fue confirmada mediante la prueba de PCR; donde, 8 de los 9 eventos kanamicina positivos resultaron también PCR positivos para la amplificación de los transgenes de interés (*cry7Aa1* y *cry3Ca1*), y un regenerante tuvo una inserción incompleta, presentando solo la incorporación del gen de resistencia a kanamicina (*nptII*). A diferencia de Ormachea, 2011 quien reportó que las 16 plantas del cv. Jewel positivas a la prueba de kanamicina que obtuvo fueron positivas mediante PCR a la incorporación de gen *nptII* y a los genes *cry* (7 eventos contenían el transgen *cry7Aa1* y 9 el transgen *cry3Ca1*).

A través de la prueba de PCR se determinó que el 20% de los regenerantes obtenidos mediante transformación a partir de hojas con peciolo, presentó una inserción incompleta del ADN - T, incorporando en su genoma solo el gen *nptII*, lo que hace suponer que 1 de los 5 eventos transformados a partir de hojas con peciolo, al producirse una inserción errónea y una delección en el ADN - T, ingreso solo un fragmento del borde izquierdo del ADN - T, obteniéndose en la planta regenerada solo la inserción del gen de resistencia a kanamicina. Tovar *et al.*, 2009 también han reportado la transferencia incompleta en la inserción del ADN - T en el cv. Wagabolige, obteniendo un evento transgénico con 3 copias del gen *cry7Aa1* y 2 copias del gen *nptII*.

La presencia de inserciones incompletas del ADN - T en los trabajos de transformación genética mediadas por *Agrobacterium tumefaciens* también han sido reportadas por Wilson *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2003; Kohli *et al.*, 2003; Dai *et al.*, 2001; Fuertes, 1999; Cheng *et al.*, 1997; Bhattacharyya *et al.*, 1994. Incluso en las investigaciones realizadas por Nacry *et al.*, 1998; Tax & Vernon, 2001 se han reportado que en ciertos eventos de transformación el ADN - T se puede insertar por el borde izquierdo antes que el borde derecho en el genoma de la planta, y esto es debido a los rearrreglos producidos cuando las inserciones del ADN - T no son exitosas durante la transformación.

Se logró confirmar mediante PCR que solo un evento transgénico de los 4 regenerantes transformados por el protocolo a partir de hojas con peciolo fue *virD2* positivo, es decir, solo el 25% de estas plantas presentaron contaminación por *A. tumefaciens*. Mientras que, en el protocolo de transformación a partir de meristemos ninguna de las 4 plantas

transformadas resultó positiva a la presencia de *A. tumefaciens*. Obteniéndose 7 plantas de inserción completa libres del gen *virD2*. Sin embargo, Ormachea, 2011 reportó que ninguna de las 16 plantas positivas para los genes *cry7Aa1* y *cry3Ca1* del cv. Jewel amplificaban para el gen *virD2* (gen de virulencia) de *A. tumefaciens*.

En la presente investigación 4 de los 8 eventos transgénicos con inserciones completas (2 por cada protocolo de transformación) integraron secuencias fuera del ADN - T, es decir, el 50% de los eventos transgénicos fue positivo a la presencia del esqueleto del vector de transformación (backbone). Investigadores como Kononov *et al.*, 1997 reportaron que el 75% de las plantas transgénicas que obtuvieron contenían secuencias del vector binario backbone integradas en el genoma de la planta, mientras que Martineau *et al.*, 1994, encontraron una frecuencia de 20 a 30% de integración de secuencias externas al ADN - T en las plantas transformadas.

VI. CONCLUSIONES

Se obtuvieron 8 eventos transgénicos de *Ipomoea batatas* cv. Huachano de inserción completa del ADN - T con las dos metodologías de transformación y regeneración descritas, resultando 4 plantas transformadas por protocolo.

El protocolo de transformación a partir de meristemos laterales fue el más eficaz, mostrando una eficiencia de transformación de 8.70% en la inserción de ambos genes de interés, frente a una eficiencia de transformación de 1.42% obtenida en el protocolo de transformación a partir de hojas con peciolo.

Los 8 eventos transgénicos fueron resistentes a kanamicina (callo positivo) y presentaron amplificación de banda de los transgenes de interés (*cry7Aa1* y *cry3Ca1*) y del gen de resistencia a kanamicina (*nptII*).

Cuatro eventos transgénicos, dos por cada protocolo de transformación, integraron secuencias externas al ADN - T del vector binario “backbone”; uno de los cuales (de la transformación a partir de hojas con peciolo) también presentó amplificación para el gen bacteriano *virD2*.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda probar concentraciones mayores de kanamicina en el medio de cultivo AG₃ ceka, para mejorar la eficiencia de selección en el protocolo de embriogénesis somática a partir de meristemas.

Buscar una concentración adecuada de cefotaxima u otro antibiótico (timetin o carbanicilina) en el protocolo de transformación a partir de hojas con peciolo, para evitar pérdidas por agroinfección y así obtener mayor número de eventos transgénicos.

Realizar la prueba de Southern blot a cada evento transgénico de inserción completa para determinar el número de copias de cada gen presente en el ADN - T (*cry7Aa1*, *cry3Ca1* y *nptII*).

Identificar la actividad transcripcional de los transgenes de interés y detectar la expresión de las proteínas Cry7Aa1 y Cry3Ca1 en hojas y en raíces tuberosas de cada uno de los eventos transgénicos, a través de qRT - PCR y DAS - ELISA.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alam I., Sharmin S. A., Naher M. K., Alam M. J., Anisuzzaman M., Alam M.F. (2010). Effect of growth regulators on meristem culture and plantlet establishment in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. *Plant Omics Journal*. 3 (2): 35 – 39
2. Alimohammadi M. & Bagherieh-Najjar M. (2009). *Agrobacterium* - mediated transformation of plants: basic principles and influencing factors. *African Journal of Biotechnology*. 8 (20): 5142 – 5148
3. Al-Mazrooei S., Bhatti M. H., Henshaw G. G., Taylor N. J., Blakesley D. (1997). Optimisation of somatic embryogenesis in fourteen cultivars of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.)Lam.]. *Plant cell reports*. 16: 710 – 714
4. Ames T., Smit N. E. J. M., Braun A. R., O’Sullivan J. N., Skoglund L. G. (1997). Sweetpotato: Major pests, diseases, and nutritional disorders. CIP (International Potato Center). pp. 84
5. Andrade M., Barker I., Cole D., Fuentes S., Grüneberg W., Kapinga R., Kroschel J., Labarta R., Lemaga B., Loechl C., Low J., Ortiz O., Oswald A., Thiele G. (2009). Unleashing the potential of sweetpotato in Sub - Saharan Africa: current challenges and way forward. CIP (International Potato Center), Lima, Peru. Social sciences Working Paper. pp.208
6. Arrieta G., Hernández A., Espinoza A. M. (2004). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from coffee plantations infested with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *Revista de Biología Tropical*. 52 (3): 757 – 764
7. Beck E., Ludwig G., Auerswald E. A., Reiss B., Schaller H. (1982). Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene*. 19: 327 – 336
8. Bhattacharyya M. K., Stermer B. A., Dixon R. (1994). Reduced variation in transgene expression from a binary vector with selectable markers at the right and left T - DNA borders. *The Plant Journal*. 6 (6): 957 – 968

9. Burga J. L. (1987). Situación del cultivo de la Batata o Camote en el Perú. pp. 99 - 116. En: CIP (Centro Internacional de la Papa). Mejoramiento de la batata *Ipomoea batatas* en Latinoamérica. Perú. pp. 271
10. Cattaneo M. G., Yafuso C., Schmidt C., Huang C., Rahman M., Olson C., Ellers-Kirk C., Orr B. J., Marsh S. E., Antilla L., Dutilleul P., Carrière Y. (2006). Farm-scale evaluation of the impacts of transgenic cotton on biodiversity, pesticide use, and yield. 103 (20): 7571 – 7576
11. CEDIR (Centro de Documentación e Información Regional). (2005). Camote. 42 – 43
12. Cheng M., Fry J. E., Pang S., Zhou H., Hironaka C. M., Duncan D. R., Conner T. W., Wan Y. (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiology. 115: 971 – 980
13. CIP (Centro Internacional de la Papa). (2010). Datos y cifras sobre el camote. pp. 1
14. Cipriani G., Michaud D., Brunelle F., Golmirzaie A., Zhang D. P. (1999). Expression of soybean proteinase inhibitor in Sweetpotato. Program report 1997 - 1998. International Potato Center. 271 – 277
15. Citovsky V., Warnick D., Zambryski P. (1994). Nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 and VirE2 proteins in maize and tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 91: 3210 – 3214
16. Cisneros F. & Alcázar J. (2001). Manejo integrado del gorgojo del camote o Tetuán del boniato, *Cylas formicarius* (Fab.), en Cuba. CIP (Centro Internacional de la Papa). Perú. pp. 138
17. Cuellar W. J., Kreuze J. F., Rajamäki M. L., Cruzado K. R., Untiveros M., Valkonen J. P. T. (2009). Elimination of antiviral defense by viral RNASE III. Plant Biology. 1 – 5
18. Dai S., Zheng P., Marmey P., Zhang S., Tian W., Chen S., Beachy R. N., Fauquet C. (2001). Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by

Agrobacterium- mediated transformation and particle bombardment. Molecular Breeding. 7: 25 – 33

19. Deng W., Chen L., Wood D. W., Metcalfe T., Liang X., Gordon M. P., Comai L., Nester E. W. (1998). *Agrobacterium* VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95: 7040 – 7045
20. Dhir S. K., Oglesby J., Bhagsari A. S. (1998). Plant regeneration via somatic embryogenesis, and transient gene expression in sweet potato protoplasts. Plant cell reports. 17: 665 – 669
21. Dodds J. H. (1987). Manejo de germoplasma *in vitro* de batata. pp. 215 - 220. En: CIP (Centro Internacional de la Papa). Mejoramiento de la batata *Ipomoea batatas* en Latinoamérica. Perú. pp. 271
22. Doussoulin E. & Chávez R. (2002). La biotecnología y su potencial de aplicación en la agricultura moderna. IDESIA. Chile. 20 (1): 61 – 72
23. Downham M. C. A., Smit N. E. J. M., Laboke P. O., Hall D. R., Odongo B. (2001). Reduction of pre-harvest infestations of African sweetpotato weevils *Cylas brunneus* and *C. puncticollis* (Coleoptera: Apionidae) using a pheromone mating-disruption technique. Crop protection. Elsevier Science B.V. 20: 163 – 166
24. FAOSTAT. FAO Statistical Database [En línea]. Food and Agriculture Organization of the United Nations [Roma, Italia]. (2009). Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
25. Fernández O. & Vega L. (2002). Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología avances en el fomento de productos fitosanitarios no-sintéticos. (64): 110 – 115
26. Fonseca C., Zuger R., Walker T., Molina J. (2002). Estudio de impacto de la adopción de las nuevas variedades de camote liberadas por el INIA, en la costa central, Perú. Caso del valle de Cañete. CIP (Centro Internacional de la Papa). pp. 24

27. Fu X., Duc L. T., Fontana S., Bong B. B., Tinjuangjun P., Sudhakar D., Twyman R. M., Christou P., Kohli A. (2000). Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low copy number transgenics plants with simple integration patterns. *Transgenic Research*. 9: 11 – 19
28. Fuertes A. (1999). Análisis funcional de genes reguladores *R2R3-MYB* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad politécnica de Madrid. pp. 113
29. Gama M. I. C. S., Leite R. P., Cordeiro A. R., Cantliffe D. J. (1996). Transgenic sweet potato plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Plant cell, tissue and organ culture*. 46: 237 - 244
30. García R., Somonte D., Zaldúa Z., Campos J., López A., Morán R., Arencibia A. D., Quiroz K., Caligari P. D. S. (2008). Efficient regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of recalcitrant sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 16 (2): 25 – 33
31. Haas J., Moore L., Ream W., Manulis S. (1995). Universal PCR Primers for Detection of Phytopathogenic *Agrobacterium* Strains. *Applied Environmental Microbiology*. 61 (8): 2879 – 2884
32. Hansen G., Shillito R. D., Chilton M. D. (1997). T - strand integration in maize protoplast after codelivery of a T - DNA substrate and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Plant Biology*. 94: 11726 – 11730
33. Hellens R., Mullineaux P., Klee H. (2000). A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trend in Plant Science*. 5: 446 – 451
34. Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T - DNA. *The Plant Journal*. 6 (2): 271 – 282
35. Hood E., Gelvin S. B., Melchers L. S., Hoekema A. (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*. 2: 208 – 218

36. Huaman Z. (1999). Sweetpotato germplasm management (*Ipomoea batatas*) training manual. CIP (International Potato Center). pp. 218
37. Hussein E. H. A., Assem S. K., El-Itriby H. A., Abdel-Galil F. M., Madkour M. A. (2001). The competence of maize shoot meristems for transformation of Egyptian maize inbred lines. Arab Journal of Biotechnology. 4 (2): 55 – 57
38. Jansson R. K., Bryan H. H., Sorensen K. A. (1987). Within-vine distribution and damage of sweetpotato weevil, *Cylas formicarius elegantulus* (Coleoptera: Curculionidae), on four cultivars of sweet potato in southern Florida. The Florida Entomologist. 70 (4): 523 – 526
39. Kasukabe Y., He L., Watakabe Y., Otani M., Shimada T., Tachibana S. (2006). Improvement of environmental stress tolerance of sweet potato by introduction of genes for spermidine synthase. Plant Biotechnology. 23: 75 – 83
40. Kim S. R., Lee J., Jun S. H., Park S., Kang H. G., Kwon S., An G. (2003). Transgene structures in T - DNA - inserted rice plants. Plant Molecular Biology. 52: 761 – 773
41. Kimura T., Otani M., Noda T., Ideta O., Shimada T., Saito A. (2001). Absence of amylose in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) following the introduction of granule - bound starch synthase I cDNA. Plant Cell. 20: 663 – 666
42. Kohli A., Twyman R. M., Abranches R., Wegel E., Stoger E., Christou P. (2003). Transgene integration, organization and interaction in plants. Plant Molecular Biology. 52: 247 – 258
43. Kononov M. E., Bassuner B., Gelvin S. B. (1997). Integration of T - DNA binary vector backbone sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. The Plant Journal. 11 (5): 945 – 957
44. Lambert B., Hofte H., Annys K., Jansens S., Soetaert P., Peferoen M. (1992). Novel *Bacillus thuringiensis* Insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. Applied and Environmental Microbiology. 58 (8): 2536 – 2542

45. Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E., Mroginski L. (2010). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de tecnología agropecuaria. ArgenBio. pp. 650
46. Li L., Qu R., Kochko A., Fauquet C., Beachy R. N. (1993). An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Reports*. 12: 250 – 255
47. Litz R. E. & Jarret R. L. (1991). Regeneración de plantas en cultivo de tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis (7). pp 143 - 157. En: Roca W. M. & Mroginski L. A. (eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de la Agricultura Tropical. Cali, Colombia. pp. 970
48. Liu Q. C., Zhai H., Wang H., Zhang D. P. (2001). Efficient plant regeneration from embryogenic suspension cultures of sweetpotato. *In vitro cellular y developmental biology - plant*. 37: 564 – 567
49. Lizarraga R., Panta A., Espinoza N., Dodds J. H. (1992). Tissue culture of *Ipomoea batatas*: Micropropagation and maintenance. Research guide 32. CIP (International Potato Center). pp 20
50. Luo H. R., Santa Maria M., Benavides J., Zhang D. P., Zhang Y. Z., Ghislain M. (2006). Rapid genetic transformation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) via organogenesis. *African Journal of Biotechnology*. 5 (20): 1851 – 1857
51. Maes J. M. (1995). Ficha de insectos plagas N° 8. El pulgón verde. *Revista Productores*. 44: 45 – 46
52. Martineau B., Voelker T. A., Sanders R. A. (1994). On defining T - DNA. *The Plant Cell*. 1032 – 1033
53. Medina L. F. (1991). Organogénesis *in vitro* a partir de entrenudos, raíces y hojas de nueve cultivares de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.): Aspectos hormonales e histológicos. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.

54. Medina F., Wright R., Funk V., Sentz D., Barroso L., Wilkins T., Petri W., Cramer C. (2003). A non-toxic lectin for antigen delivery of plant based mucosal vaccines. *Vaccine*. 21: 997 – 1005
55. Morán R., García R., López A., Zaldúa Z., Mena J., García M., Armas R., Somonte D., Rodríguez J., Gómez M., Pimentel E. (1998). Transgenic sweet potato plants carrying the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis var. tenebrionis*. *Plant Science*. 139 (2): 175 - 184
56. Mullen M. A. (1984). Influence of Sweetpotato weevil infestation on the yields of twelve sweet potato lines. *Journal Agricultural Entomology*. 1 (3): 227 – 230
57. Muyinza H., Stevenson P., Mwangi R., Talwana H., Murumu J., Odongo B. (2007). The relationship between stem base and root damage by *Cylas spp.* On sweetpotato. *African Crop Science Conference Proceedings*. 8: 955 – 957
58. Nacry P., Camilleri C., Courtial B., Caboche M., Bouchez D. (1998). Major chromosomal rearrangements induced by T - DNA transformation in *Arabidopsis*. *Genetics*. 149: 641 – 650
59. Okada Y., Saito A., Nishiguchi M., Kimura T., Mori M., Hanada K., Sakai J., Miyazaki C., Matsuda Y., Murata T. (2001). Virus resistance in transgenic sweetpotato (*Ipomoea batatas* L. (Lam)) expressing the coat protein gene of sweet potato feathery mottle virus. *Theoretical and Applied Genetics*. 103: 743 – 751
60. Okamoto J. K., W. den Boer B. G., Lotys-Prass C., Szeto W., Jofuku K. D. (1996). Flowers into shoots: Photo and hormonal control of a meristem identity switch *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 13831 – 13836
61. Ooms G., Bakker A., Molendijk L., Wullems G. J., Gordon M. P., Nester E. W., Schilperoort R. A. (1982). T - DNA organization in homogeneous and heterogeneous octopine- type crown gall tissues of *Nicotiana tabacum*. *Cell*. 30: 589 – 597

62. Ormachea M. (2011). Transformación genética de “camote” (*Ipomoea batatas* (L.) Lamarck, 1793) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1*. CIP (Centro Internacional de la Papa). pp. 101
63. Otani M., Hamada T., Katayama K., Kitahara K., Kim S. H., Takahata Y., Suganuma T., Shimada T. (2007). Inhibition of the gene expression for granule - bound starch synthase I by RNA interference in sweet potato plants. *Plant Cell*. 26: 1801 – 1807
64. Otani M., Hamada T., Kitahara K., Kim S. H., Suganuma T., Shimada T. (2010). Increase of amylose content of sweetpotato starch by inhibition of SBEII. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 18 (1): 97 – 98
65. Otani M., Shimada T., Kimura T., Saito A. (1998). Transgenic plant production from embryogenic callus of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology*. 15 (1): 11 – 16
66. Porobo Dessai A., Gosukonda R. M., Blay E., Korsi Dumenyo C., Medina- Bolivar F., Prakash C. S. (1995). Plant regeneration of sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) from leaf explants in vitro using a two-stage protocol. *Scientia Horticulturae*. 62: 217 – 224
67. Prentice K. (2012). Transformación de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. “camote” cv. Jewel con el gen Bt *ET 33 - 34* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. CIP (Centro Internacional de la Papa). pp. 97
68. Raman K. V. (1987). Principales plagas de la batata y selección para resistencia al gorgojo *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire). pp. 233 - 242. En: CIP (Centro Internacional de la Papa). Mejoramiento de la batata *Ipomoea batatas* en Latinoamérica. Perú. pp. 271
69. Ramanathan V. & Veluthambi K. (1995). Transfer of non - TDNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of T1 - DNA. *Plant Molecular Biology*. 28: 1149 – 1154

70. Santa Maria M., Pecota K. V., Yencho C. G., Allen G., Sosinski B. (2009). Rapid shooto regeneration in industrial “high starch” sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 97:109 – 117
71. Samolski I. (2004). Evaluación de la resistencia al complejo viral del camote inducida por silenciamiento post - transcripcional de genes en plantas transgénicas de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) transformadas vía *Agrobacterium tumefaciens*. CIP (Centro Internacional de la Papa). pp. 159
72. Sato K., Uritani I., Saito T. (1982). Properties of terpene - inducing factor extracted from adults of the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* FABRICIUS (Coleoptera: Brentidae). *Applied Entomology and Zoology*. 17 (3): 368 – 374
73. Sevilla R. & Holle M. (2004). Recursos genéticos vegetales. Perú. pp 445
74. Sheng-Jun J., Qing-Chang L., Hong Z., Li-Sha W., Yu-Ping W. (2004). Regeneration of sweet potato transgenic plants with *oryzacystatin - I* (OCI) gene. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*. 1(2): 99 – 102
75. Sivparsad B. J. & Gubba A. (2012). Development of an efficient plant regeneration protocol for sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cv. Blesbok. *African Journal of Biotechnology*. 11(84): 14982 – 14987
76. Skoglund L. G. & Smit N. E. J. M. (1994). Diseases and pests of sweetpotato in eastern Africa. CIP (International Potato Center). pp 68 Smit N. E. J. M., Downham M. C. A., Laboke P. O., Hall D. R., Odongo B. (2001). Mass-trapping male *Cylas* spp. With sex pheromones: a potential IPM component in Sweetpotato production in Uganda. *Crop Protection*. 20: 643 – 651
77. Smit N. E. J. & Van Huis A. (1999). Biology of the african sweetpotato weevil species *Cylas Puncticollis* (Boheman) and *C. brunneus* (Fabricius) (Coleoptera:Apionidae). *The Journal of Food Technology in Africa*. 4(3): 103 – 107
78. Soberón M. & Bravo A. (2008). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. (27): 303 - 313. En: López A. una ventana al quehacer científico. Instituto de biotecnología de la UNAM. México. 14: pp 399

79. Song G. Q., Honda H., Yamaguchi K. I. (2004). Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) from stem explants using a two - step Kanamycin - Hygromycin selection method. *In vitro cellular and developmental biology*. 40 (4): 359 – 365
80. Stathers T. E., Rees D., Kabi S., Mbilinyi L., Smit N., Kiozya H., Jeremiah S., Nyango A., Jeffriest D. (2003). Sweetpotato infestation by *Cylas* spp. In East Africa: I. Cultivar differences in field infestation and the role of plant factors. *International Journal of Pest Management*. 49 (2): 131 – 140
81. Tabares E., Fory L., Duque L., Angel F., Delgado G., Lentini Z. (1998). Análisis comparativo de la eficiencia en la transformación genética de arroz utilizando el bombardeo de partículas y *Agrobacterium tumefaciens*. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). pp 1
82. Talekar N. S. (1987). Feasibility of the use of resistant cultivar in sweetpotato weevil control. *International Journal of Tropical Insect Science*. 4 (5): 815 – 817
83. Tax F. E. & Vernon D. M. (2001). T - DNA associated duplication/translocations in *Arabidopsis*. Implications for mutant analysis and functional genomics. *Plant Physiology*. 126: 1527 – 1538
84. Tovar J. C., Prentice K., Ormachea M., Wamalwa N. L., Mwanga R. O. M., Moar W. J., Machuka J., Ghislain M. (2009). Transfer of sweetpotato- like genes expressing Cry proteins into sweetpotato varieties. International Potato Center (CIP). pp 4
85. Triqui Z. E. A., Guedira A., Chlyah B., Chlyah H., Souvannavong V., Haicour R., Sihachakr D. (2008) . Effect of genotype, gelling agent, and auxin on the induction of somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). *C R Biol*. 331:198 – 205
86. Tzfira T. & Citovsky V. (2003). The *Agrobacterium* - plant cell interaction. Taking Biology Lesson from a Bug. *En: Plant Physiology*. 133 (3): 943 – 947

87. Tzfira T. & Citovsky V. (2006). *Agrobacterium* - mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Plant biotechnology: Current Opinion in Biotechnology. Elsevier Science B.V. 17: 147 – 154
88. Valderrama A. M., Arango R., Afanador L. (2005). Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: “Ingeniería genética natural aplicada”. Revista Facultad de Ciencias Agropecuarias de Medellín. 58 (1): 2569 – 2585
89. Van de Fliert E. & Braun A. R. (2001). Escuela de campo de agricultores para el manejo integrado del cultivo de camote. Guía de campo y manual técnico. Centro Internacional de la Papa. pp. 289
90. Villalobos V. M. & Thorpe T. A. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados (6): 127-141. En: Roca W. M. & Mroginski L. A. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de la Agricultura Tropical. Cali, Colombia. pp. 970
91. Walker T. & Prain G. (2003). Desarrollo de productos de camote en América Latina. Informe Técnico Final del Proyecto de FONTAGRO. pp. 106
92. Watanabe K. N., Buitron F., Benavides J., Panta A., Sigüeñas C., Medina Bolivar F., Dodds J. H. (1998). Genetic transformation of sweetpotato via *Agrobacterium tumefaciens*. International Potato Center (CIP). 1: 26 – 30
93. Wilson A., Latham J., Steinbrecher R. (2004). Genome scrambling - Myth or Reality? Transformation - Induced mutations in transgenic crop plants. EcoNexus Technical Report. pp. 40
94. Wilson K. (1987). Preparation and Analysis of DNA. (2): pp. 160. En: Current protocols in molecular biology. Wiley. New York.
95. Xing Y. J., Ji Q., Yang Q., Luo Y. M., Li Q., Wang X. (2008). Studies on *Agrobacterium* - mediated genetic transformation of embryogenic suspension cultures of sweet potato. African Journal of Biotechnology. 7 (5): 534 – 540
96. Yancheva S. D., Druart P. H., Watillon B. (2002). *Agrobacterium* - mediated transformation of plum (*Prunus domestica* L.) Acta Horticulturae. 577: 215 – 217

97. Yasuda H., Nakajima M., Masuda H., Ohwada T. (2000). Direct formation of heart - shaped embryos from differentiated single carrot cells in culture. *Plant Science*. 152: 1 - 6

IX. ANEXOS

9.1. Figuras

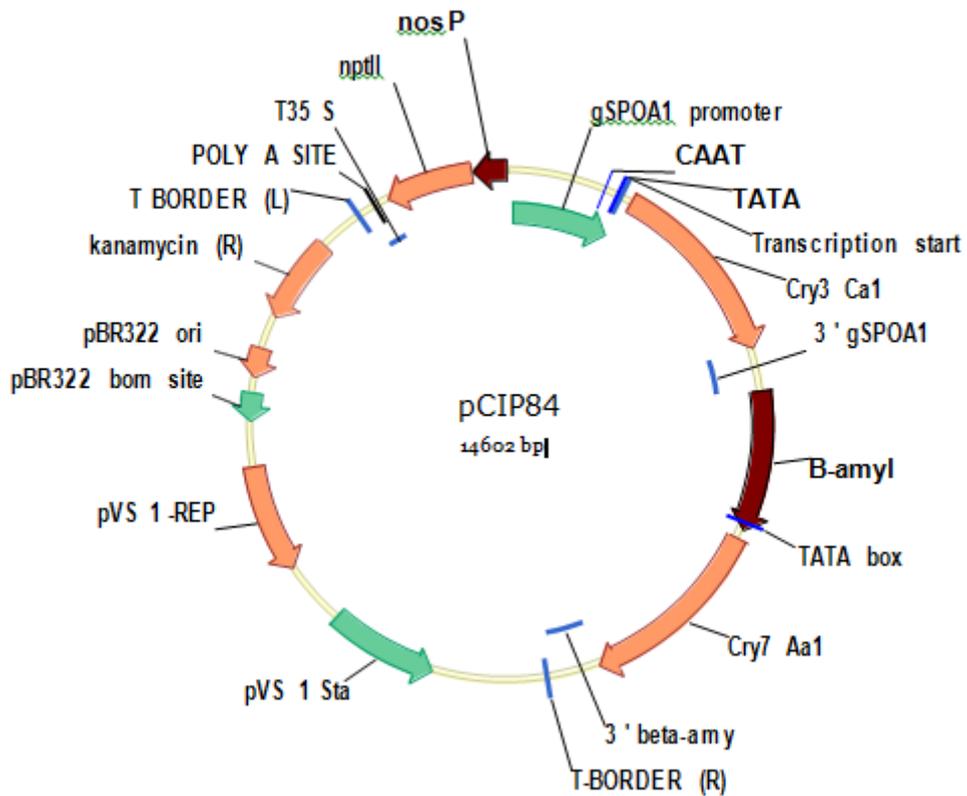


Figura 1. Construcción pCIP84 formada por el vector binario pCAMBIA2305.2 que porta en su ADN - T los genes quiméricos *cry7Aa1* (1746pb) y *cry3Ca1* (1794pb), que expresan las toxinas Cry7Aa1 y Cry3Ca1, gobernados por promotores y terminadores del gen β - *amy* de β - amilasa y del gen *gSPOA1* de esporamina respectivamente. Así como el gen *nptII* (792pb), cerca del borde izquierdo usado como marcador de selección por conferir resistencia al antibiótico kanamicina.



Figura 2. Propagación *in vitro* de *Ipomoea batatas* cv. Huachano.

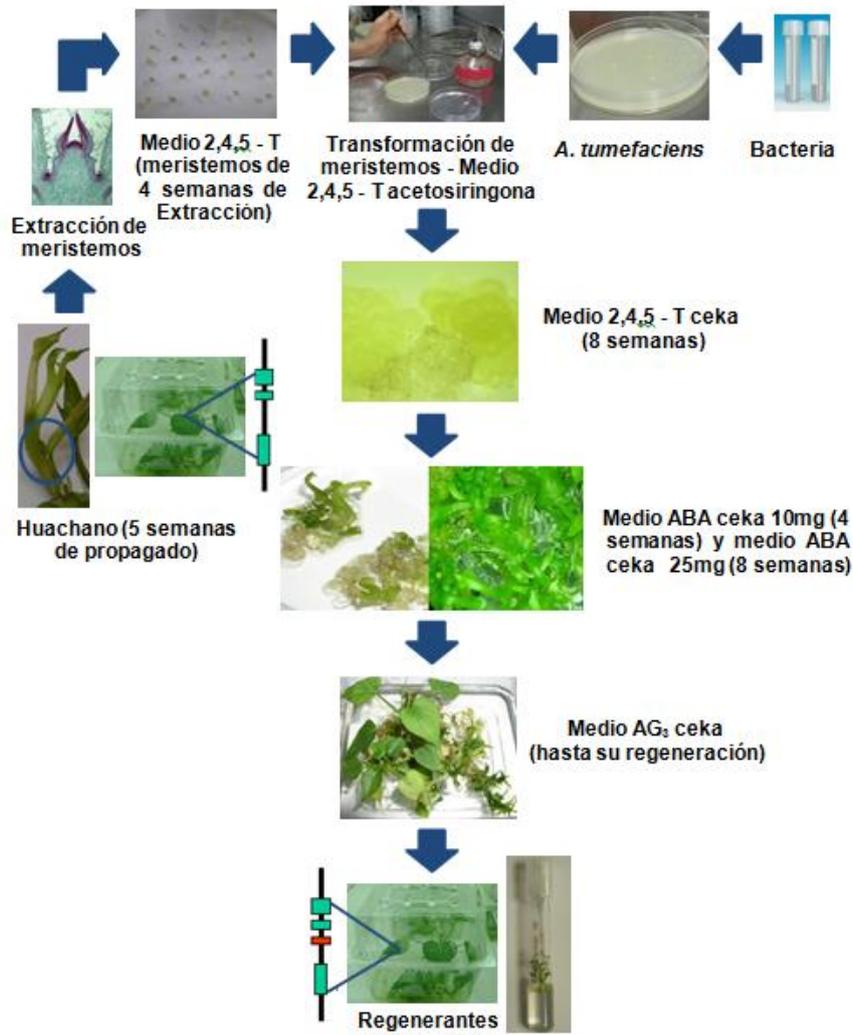


Figura 3. Esquema de transformación genética por embriogénesis somática de *Ipomoea batatas* cv. Huachano a partir de meristemos.

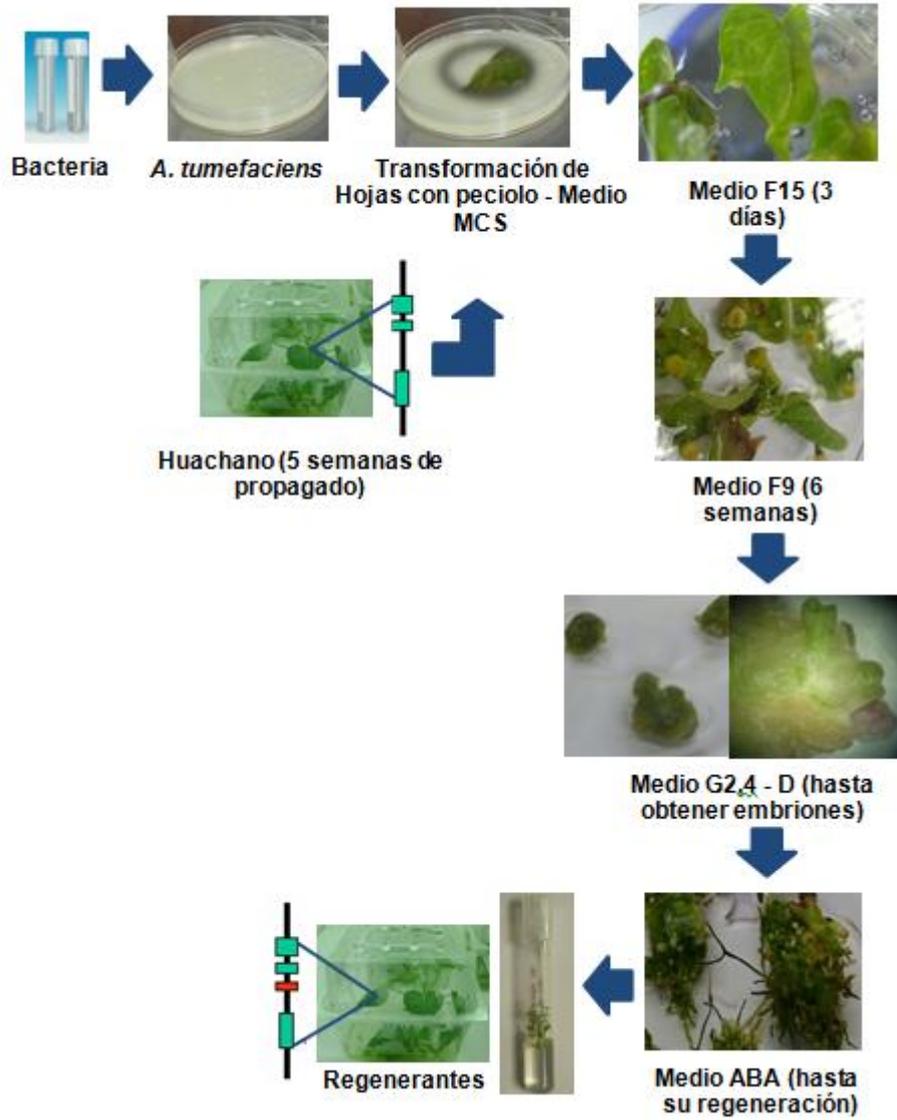


Figura 4. Esquema de transformación genética por embriogénesis somática de *Ipomoea batatas* cv. Huachano a partir de hojas con peciolo.

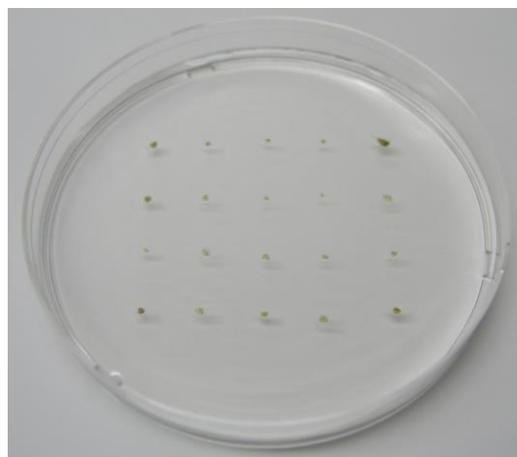


Figura 5. Meristemas de camote, 1 semana después de la extracción o aislamiento.



Figura 6. Transformación de meristemos.



Figura 7. Explantes de *Ipomoea batatas* en el medio F9.

$$\text{Eficiencia de Regeneración (ER)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ explantes regenerados}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de explantes transformados}} \times 100$$

$$\text{Eficiencia de Transformación (ET)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ eventos transgénicos}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de explantes transformados}} \times 100$$

Figura 8. Eficiencias de Regeneración (ER) y Transformación (ET).

$$\text{Eficiencia de Selección (ES)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ eventos transgénicos}}{\text{N}^{\circ} \text{ explantes regenerados}} \times 100$$

Figura 9. Eficiencia de Selección (ES).

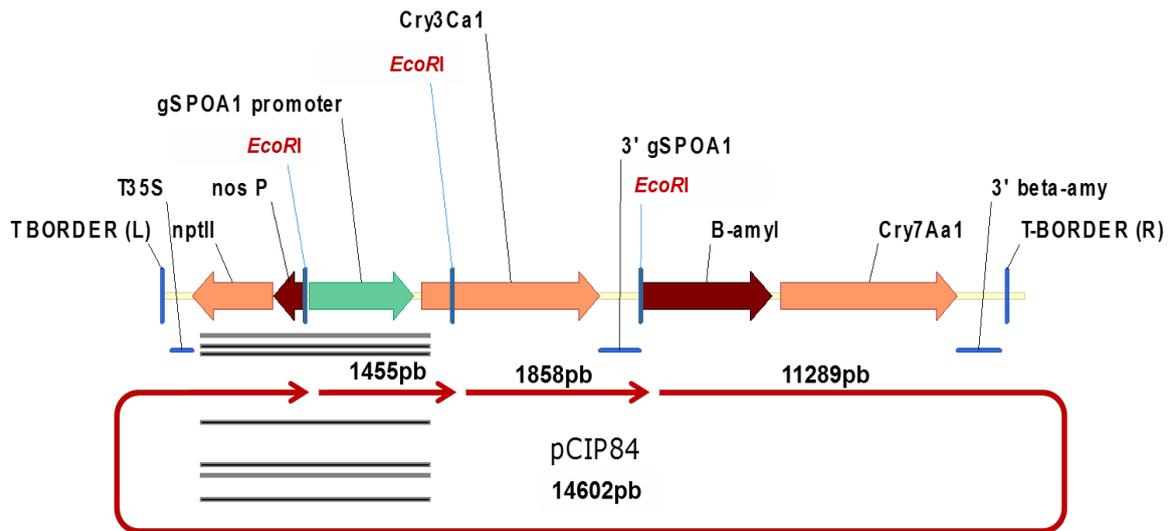


Figura 10. Esquema del ADN - T del vector binario pCIP84 con los sitios de restricción de *EcoRI* y el tamaño de las bandas esperadas.

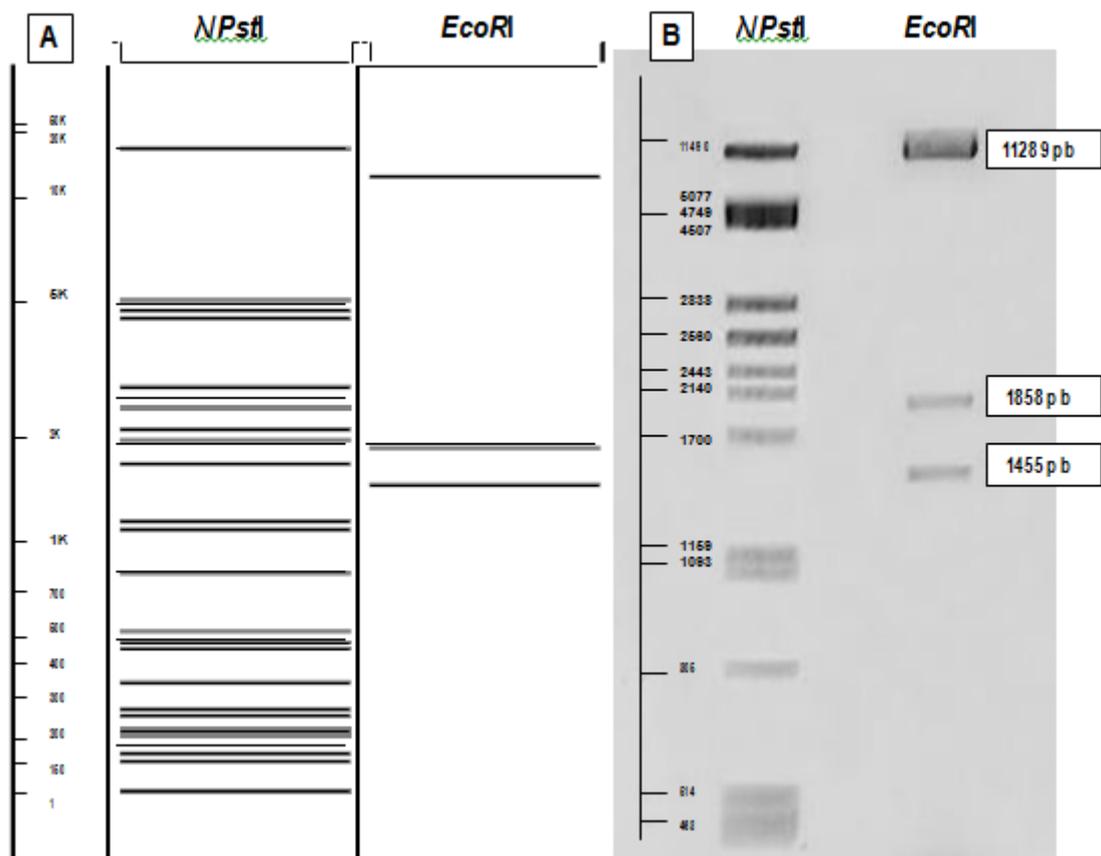
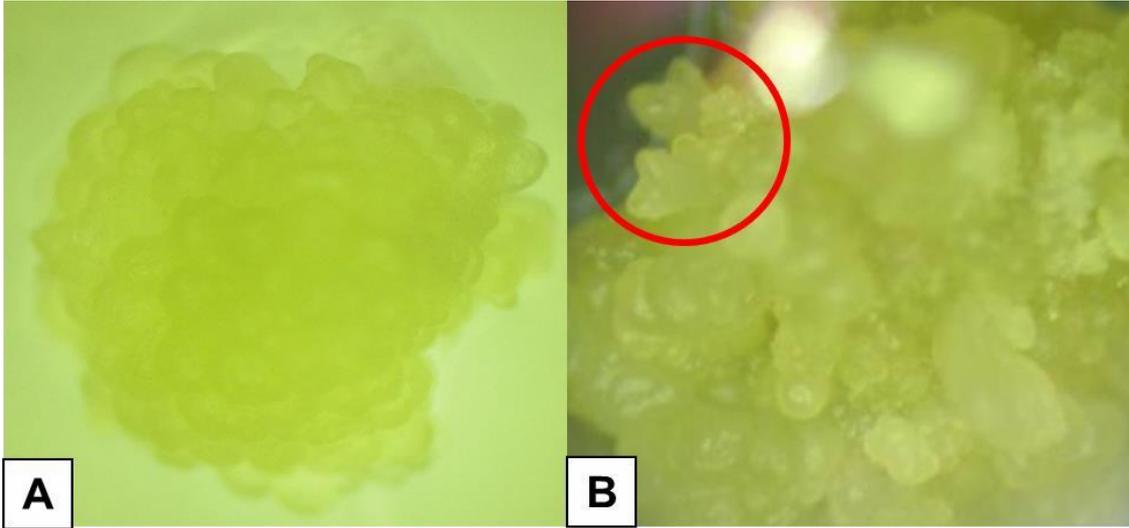


Figura 11. Análisis de restricción: A. Simulación de la digestión del plásmido pCIP84 realizada en el programa Vector NTI - 11. B. Fragmentos de restricción del plásmido pCIP84 en *A. tumefaciens* digerido con *EcoRI*.



A

B

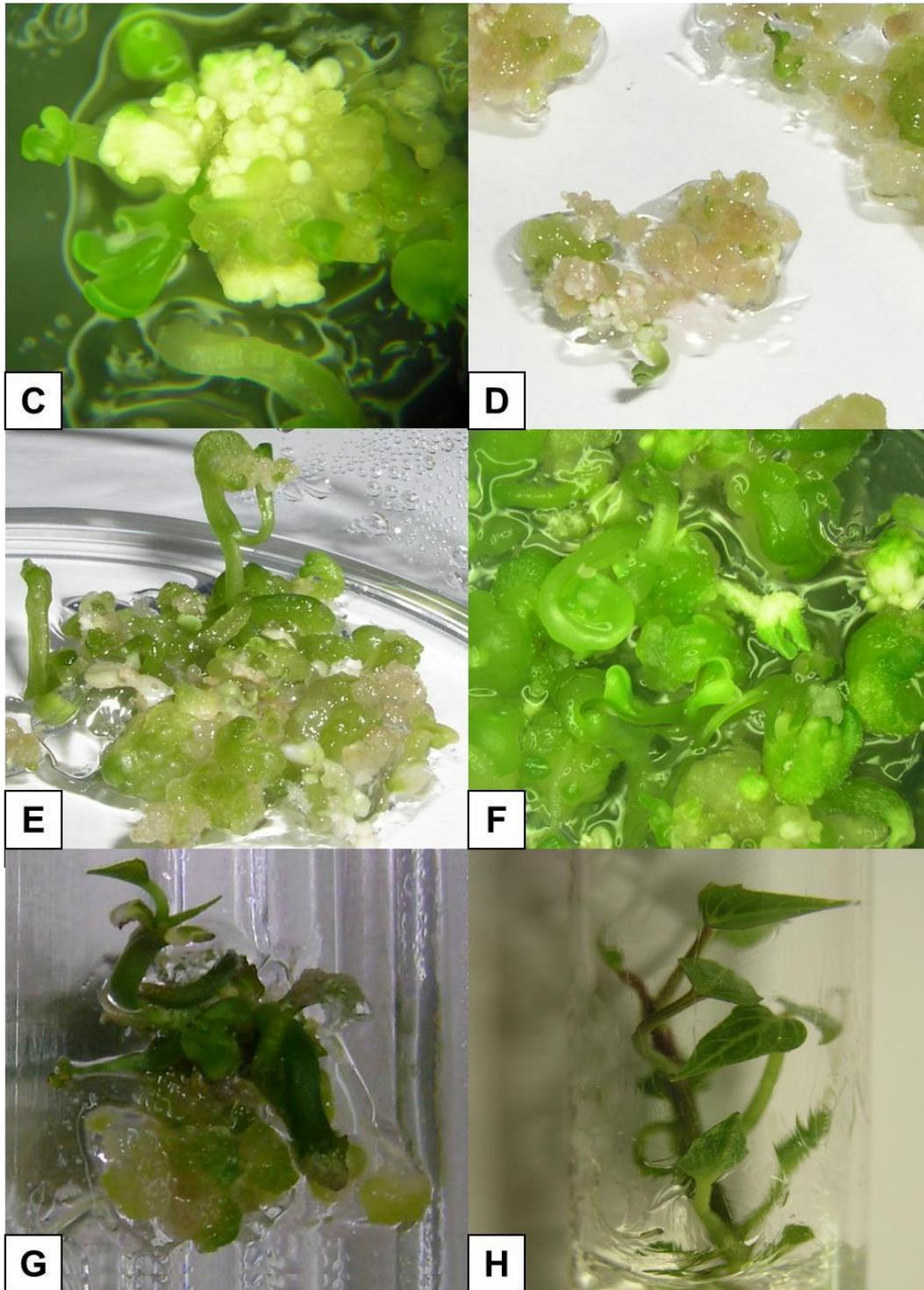


Figura 12. Estados morfológicos de embriogenia durante la regeneración de *Ipomoea batatas* cv. Huachano a partir de meristemos. A. Globular (medio 2,4,5 - T ceka); B. Globular - corazón (medio 2,4,5 - T ceka); C. y D. Torpedo (medio ABA ceka 10mg); E. y F. Fase cotiledonar (medio ABA ceka 25mg); G. Regenerante anormal (medio AG₃ ceka) y H. Regenerante normal (medio MPB semisólido).

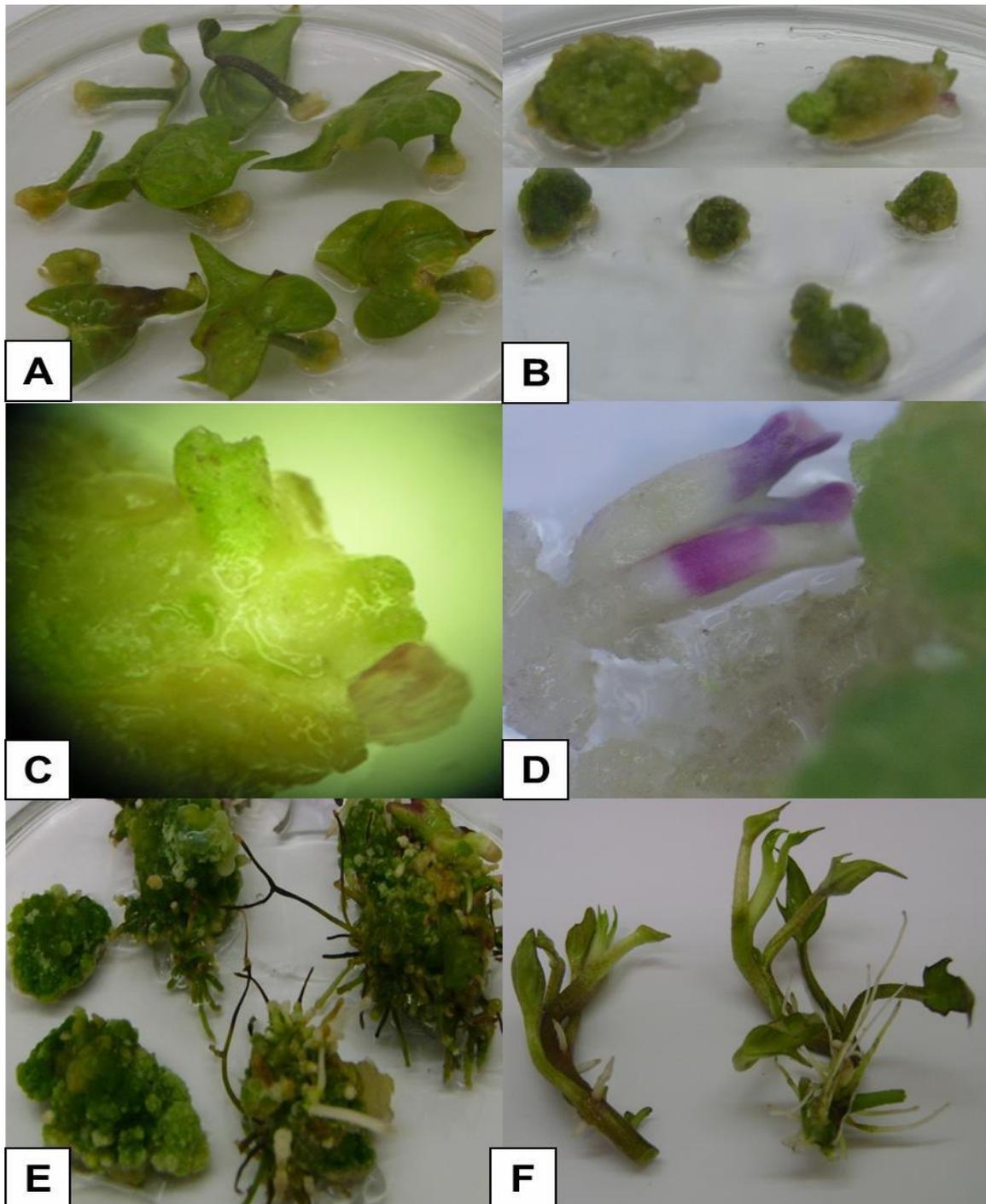


Figura 13. Evolución de los callos de *Ipomoea batatas* cv. Huachano a partir de hojas con peciolo. A. Explantes transformados (medio F9); B. Callos (medio G2,4 - D); C. Acercamiento de uno de los callos de la figura 13B.; D. Formación de embriones (medio G2,4 - D); E. Embriones (medio ABA) y F. Regenerantes.

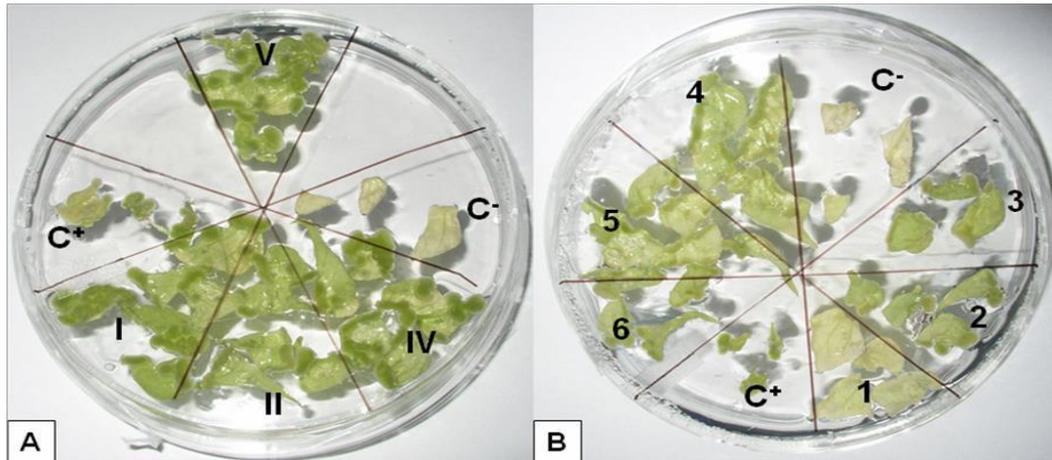


Figura 14. Prueba de resistencia a kanamicina de los regenerantes de *Ipomoea batatas* cv. Huachano en el medio 303. C⁺: Control positivo, hojas de una planta transformada C⁻: Control negativo, hojas de una planta de Huachano no transformada. A. Hojas de los regenerantes obtenidos a partir de meristemos (I, II, IV, V); B. Hojas de los regenerantes obtenidos a partir de hojas con peciolo (1, 2, 3, 4, 5 y 6).

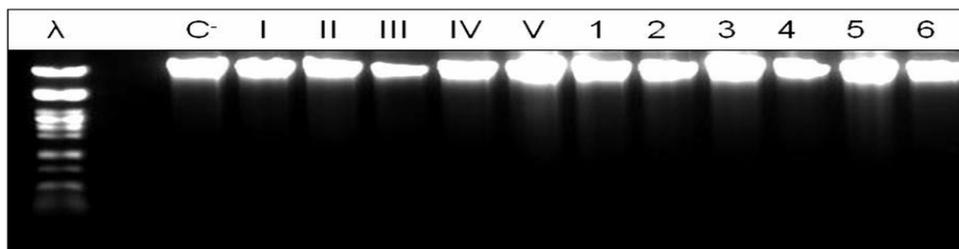


Figura 15. Calidad de la extracción de ADN de los regenerantes a pequeña escala. λ: ADN del fago lambda digerido con la enzima *Pst*I, C⁻: ADN de una planta del cv. Huachano no transformado. I - V: ADN de regenerantes obtenidos a partir de meristemos. 1 - 6: ADN de regenerantes obtenidos a partir de hojas con peciolo.

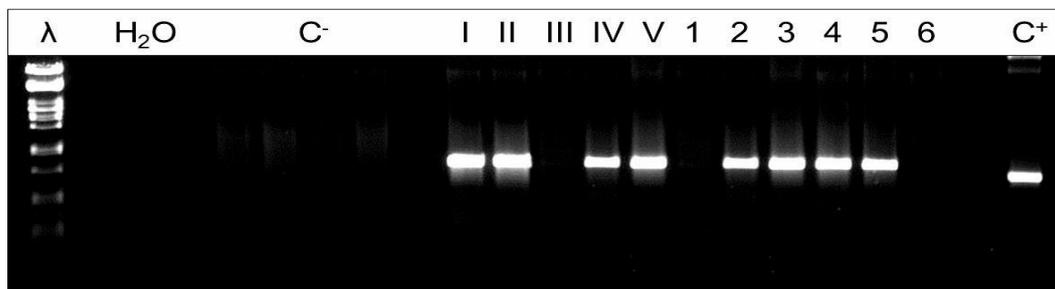


Figura 16. Amplificación del gen *cry7Aa1* (608pb). λ: ADN del fago lambda digerido con la enzima *Pst*I. H₂O: Agua. C⁻: Control negativo, 4 carriles de ADN de una planta del cv. Huachano no transformado. I - V: ADN de regenerantes obtenidos a partir de meristemos. 1 - 6: ADN de regenerantes obtenidos a partir de hojas con peciolo. C⁺: Control positivo, ADN plasmídico de *E. coli* conteniendo la construcción pCIP84.

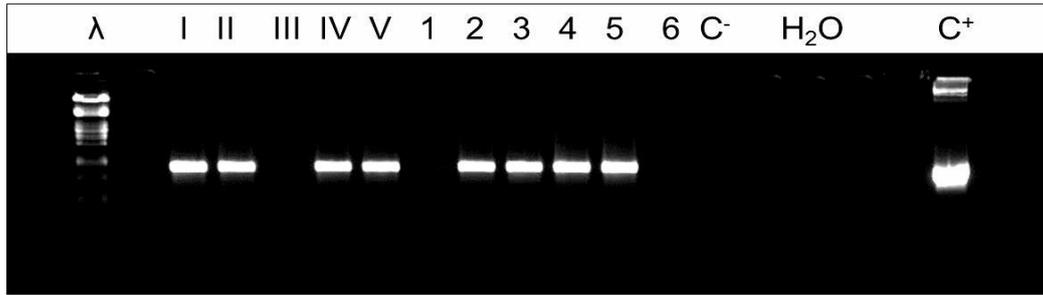


Figura 17. Amplificación del gen *cry3Ca1* (530pb). λ: ADN del fago lambda digerido con la enzima *PstI*. H₂O: Agua. C⁻: Control negativo, ADN de una planta del cv. Huachano no transformado. I - V: ADN de regenerantes obtenidos a partir de meristemos. 1 - 6: ADN de regenerantes obtenidos a partir de hojas con peciolo. C⁺: Control positivo, ADN plasmídico de *E. coli* conteniendo la construcción pCIP84.

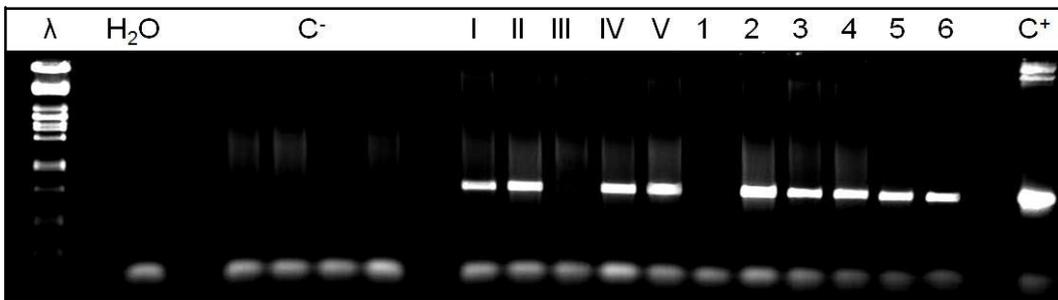


Figura 18. Amplificación del gen *nptII* (636pb). λ: ADN del fago lambda digerido con la enzima *PstI*. H₂O: Agua. C⁻: Control negativo, 4 carriles de ADN de una planta del cv. Huachano no transformado. I - V: ADN de regenerantes obtenidos a partir de meristemos. 1 - 6: ADN de regenerantes obtenidos a partir de hojas con peciolo. C⁺: Control positivo, ADN plasmídico de *E. coli* conteniendo la construcción pCIP84.

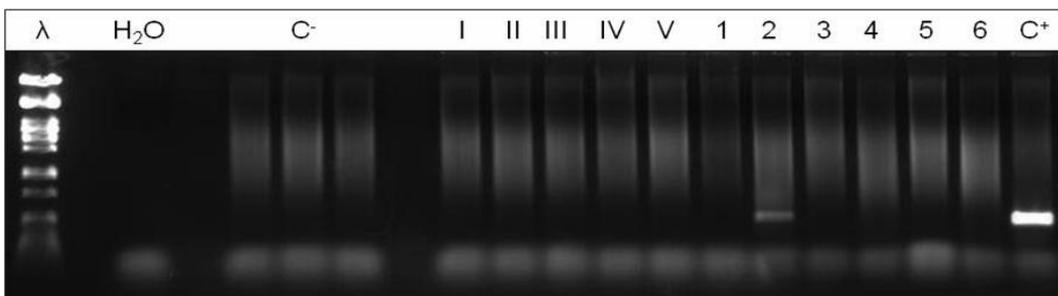


Figura 19. Amplificación del gen bacteriano *virD2* (338pb). λ: ADN del fago lambda digerido con la enzima *PstI*. H₂O: Agua. C⁻: Control negativo, 3 carriles de ADN de una planta del cv. Huachano no transformado. I - V: ADN de regenerantes obtenidos a partir de meristemos. 1 - 6: ADN de regenerantes obtenidos a partir de hojas con peciolo. C⁺: Control positivo, ADN genómico de *A. tumefaciens*.

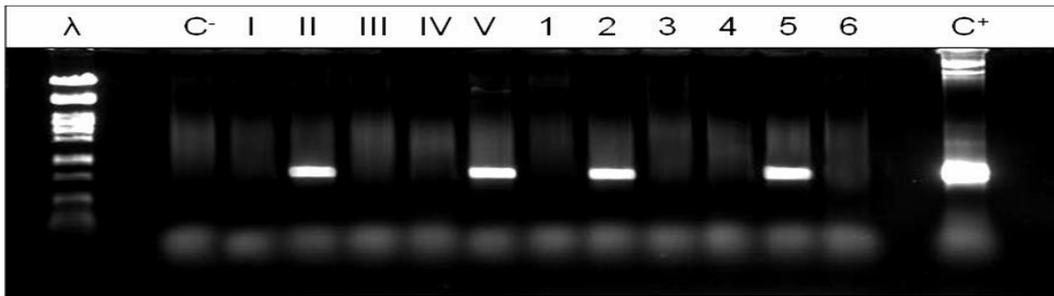


Figura 20. Amplificación de secuencias del vector backbone (561pb). λ : ADN del fago lambda digerido con la enzima *Pst*I. C⁻: Control negativo, ADN de una planta del cv. Huachano no transformado. I - V: ADN de regenerantes obtenidos a partir de meristemas. 1 - 6: ADN de regenerantes obtenidos a partir de hojas con peciolo. C⁺: Control positivo, ADN plasmídico de *E. coli* conteniendo la construcción pCIP84.

Tablas

Tabla 1. Bacterias utilizadas

Bacteria	Código	Cepa	Plásmido	Construcción	Marcador de selección
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AT131	EHA105	pCIP84	β -amy: cry7Aa1; gSPOA1: cry3Ca1	<i>nptII</i>
<i>Escherichia coli</i>	EC194	DH5 α	pCIP84	β -amy: cry7Aa1; gSPOA1: cry3Ca1	<i>nptII</i>

Tabla 2. MPB Store

Reactivos	1L
Ácido Ascórbico	40g
L - Arginina	20g
Putrescina	4g
Ácido Giberélico (AG ₃)	4g
Pantotenato de Calcio	0.4g
Agua	enrazar hasta 1L

Tabla 3. Medio de propagación en *I. batatas*: MPB Líquido

Reactivos	1L
Sales MS	4.43g
Sacarosa	30g
MPB Store	5ml
Agua	enrazar hasta 1L pH 5.8

Tabla 4. Medio Luria Bertani: LB Líquido

Reactivos	1L
Luria Bertani (LB)	25g
*Kanamicina	100mg
Agua	enrazar hasta 1L

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio.

Tabla 5. Medio Luria Bertani: LB Sólido

Reactivos	1L
Luria Bertani (LB)	25g
Agar	15g
*Kanamicina	100mg
Agua	enrazar hasta 1L

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio.

Tabla 6. Digestión simple del ADN plasmídico de *Agrobacterium tumefaciens*

Componentes	Volumen
Agua	15.5µl
ADN plasmídico <i>A. tumefaciens</i> (500ng/µl)	2µl
10X Buffer	2µl
Enzima <i>EcoRI</i>	0.5µl
Volumen Final	20µl

La reacción de digestión se incubó a 37°C por una hora.

Tabla 7. Gel de agarosa al 1%

Componentes	100ml
Agarosa	1g
Buffer TBE 1X	100ml

Tabla 8. Buffer TBE 10X

Componentes	1L
Tris Base	108g
Ácido Bórico	55g
EDTA 0.5M pH 8	40ml
Agua	enrazar hasta 1L

Tabla 9. Buffer TBE 1X

Componentes	1L
Buffer TBE 10X	10ml
Agua estéril	90ml

Tabla 10. Fago Lambda

Componentes	Cantidad
Agua	591µl
λ - DNA (BIOLABS)	200µl
10X Buffer	90µl
Enzima <i>Pst</i> I (10 U/µl)	10µl
BSA 100X	9µl
Volumen Final	900µl

Tabla 11. Medio de cultivo 2,4,5 - T

Reactivos	1L
Sales MS	4.43g
Sacarosa	30g
* 2,4,5 - T	1.3mg
Gelrite	2g
Agua	enrazar hasta 1L pH 5.8

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio.

Tabla 12. Medio de cultivo 2,4,5 - T acetosiringona

Reactivos	1L
Sales MS	4.43g
Sacarosa	30g
* 2,4,5 - T	1.3mg
* Acetosiringona	20mg
Gelrite	2g
Agua	enrazar hasta 1L pH 5.5

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio.

Tabla 13. Medio de cultivo 2,4,5 - T ceka

Reactivos	1L
Sales MS	4.43g
Sacarosa	30g
* 2,4,5 -T	1.3mg
* Kanamicina	10mg
* Cefotaxima	200mg
Gelrite	2g
Agua	enrazar hasta 1L pH 5.8

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio.

Tabla 14. Medio de cultivo ABA ceka 10mg

Reactivos	1L
Sales MS	4.43g
Sacarosa	30g
Ácido Abscísico (ABA)	1mg
* Kanamicina	10mg
* Cefotaxima	200mg
Gelrite	2g
Agua	enrazar hasta 1L pH 5.8

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio.

Tabla 15. Medio de cultivo ABA ceka 25mg

Reactivos	1L
Sales MS	4.43g
Sacarosa	30g
Ácido Abscísico (ABA)	1mg
* Kanamicina	25mg
* Cefotaxima	200mg
Gelrite	2g
Agua	enrazar hasta 1L pH 5.8

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio.

Tabla 16. Medio de cultivo AG₃ ceka

Reactivos	1L
Sales MS	4.43g
Sacarosa	30g
* Ácido Giberélico (AG₃)	0.424mg
* Kanamicina	25mg
* Cefotaxima	200mg
Gelrite	2g
Agua	enrazar hasta 1L pH 5.8

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio.

Tabla 17. Medio de propagación en *I. batatas*: MPB semisólido

Reactivos	1L
Sales MS	4.43g
Sacarosa	30g
MPB Store	5ml
Gelrite	2g
Agua	enrazar hasta 1L pH 5.8

Tabla 18. Medio de cocultivo semisólido: MCS

Reactivos	1L
Dextrosa	20g
Sales MS	4.43g
MES	0.5g
* Glicina	2mg
* BAP	1mg
* AG₃	2mg
* ANA	10mg
* Acetosiringona	0.2mg
Agar	7g
Agua	enrazar hasta 1L pH 5.5

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio.

Tabla 19. Medio de cultivo F15

Reactivos	1L
Sales MS	4.43g
Sacarosa	30g
* Glicina	2mg
* Zeatina	0.2mg
* 2,4 - D	0.05mg
* Kanamicina	50mg
* Cefotaxima	200mg
Phytigel	3g
Agua	enrazar hasta 1L pH 5.8

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio.

Tabla 20. Medio de cultivo F9

Reactivos	1L
Sales MS	4.43g
Sacarosa	30g
* Glicina	2mg
* Zeatina	0.2mg
* Kanamicina	50mg
* Cefotaxima	200mg
Phytigel	3g
Agua	enrazar hasta 1L pH 5.8

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio.

Tabla 21. Medio de cultivo G2,4 - D

Reactivos	1L
Sales MS	4.43g
Sacarosa	30g
* Glicina	2mg
* AG₃	0.1mg
* 2,4 - D	0.05mg
* Kanamicina	50mg
* Cefotaxima	200mg
Phytigel	3g
Agua	enrazar hasta 1L pH 5.8

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio.

Tabla 22. Medio de cultivo ABA

Reactivos	1L
Sales MS	4.43g
Sacarosa	30g
* Glicina	2mg
* Ácido Abscísico (ABA)	1mg
* Kanamicina	50mg
* Cefotaxima	200mg
Phytigel	3g
Agua	enrazar hasta 1L pH 5.8

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio.

Tabla 23. Medio 303 con kanamicina

Reactivos	1L
Sales MS	4.43g
Dextrosa	20g
Manitol	20g
MES	0.5g
PVP 40	0.5g
Glutamina	200mg
Adenina hemisulfato	40mg
* ANA	1mg
* BAP	0.1mg
* Glicina	2g
* Piridoxina	500mg
* Ácido Nicotínico	500mg
* Kanamicina	50mg / 100mg
Phytigel	3g
Agua	enrazar hasta 1L pH 5.8

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio Km: 50mg (protocolo de meristemas) y 100mg (protocolo de hojas con peciolo).

Tabla 24. Medio 303 control (sin kanamicina)

Reactivos	1L
Sales MS	4.43g
Dextrosa	20g
Manitol	20g
MES	0.5g
PVP 40	0.5g
Glutamina	200mg
Adenina hemisulfato	40mg
* ANA	1mg
* BAP	0.1mg
* Glicina	2g
* Piridoxina	500mg
* Acido Nicotínico	500mg
Phytigel	3g
Agua	enrazar hasta 1L pH 5.8

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio.

Tabla 25. CTAB 2X

Componentes	1L	Concentración Final
CTAB	20g	2%
NaCl 1M	81.81g	1.4%
EDTA 0.5M pH 8.0	40ml	20mM
Tris HCL 1M pH 8.0	100ml	100mM
PVP	10g	1%
Agua	enrazar hasta 1L	

El CTAB y el PVP se agregaron al final de todos los demás componentes, con la solución caliente.

Tabla 26. Gel de agarosa al 0.8%

Componentes	100ml
Agarosa	0.8g
Buffer TBE 1X	100ml

Tabla 27. Secuencias de los primers usados en la reacción de PCR para la amplificación y reconocimiento de los genes de interés *cry7Aa1* y *cry3Ca1*, del gen marcador de selección *nptII*, gen bacteriano *virD2* y de secuencias del plásmido externas al ADN - T (backbone)

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño de la amplificación
<i>cry7Aa1</i>	Sentido	5' ACAACTCATCACCATACCAAAC 3'	608pb
	Antisentido	5' AAGAGCAAGATGCAAGTTTG 3'	
<i>cry3Ca1</i>	Sentido	5' CACCTATAGTAAAACCATGGACAC 3'	530pb
	Antisentido	5' TGCATGAAAGCCTTAAGAGG 3'	
<i>nptII</i>	Sentido	5' CAGCAATATCACGGGTAGCCA 3'	636pb
	Antisentido	5' GGCTATTCGGCTATGACTGGG 3'	
<i>VirD2</i>	Sentido	5' ATGCCGATCGAGCTCAAGT 3'	338pb
	Antisentido	5' CCTGACCCAAACATCTCGGCT 3'	
<i>Backbone</i>	Sentido	5' TGCAGTCGGCTTCTGACGTT 3'	561pb
	Antisentido	5' GTGCGGTCGATGATTAGGGA 3'	

Tabla 28. Master mix o mezcla de componentes en la amplificación por PCR

Componente	Volumen para 1 Rx (μ l)
Agua (libre de nucleasas)	8.6625 μ l
10X PCR Buffer (con MgCl ₂)	1.5 μ l
dNTPs (10mM)	0.3 μ l
Primer sentido (5 μ M)	0.75 μ l
Primer antisentido (5 μ M)	0.75 μ l
Taq polimerasa (5U/ml)	0.0375 μ l
ADN (50ng/ μ l)	3 μ l
Volumen Final	15 μ l

Tabla 29. Programación para la amplificación de los genes *cry7Aa1*, *cry3Ca1*, *virD2*, *nptII* y la secuencia del vector “backbone”

Ciclos de amplificación	Temperatura	Tiempo de duración	Nº Ciclos
Denaturación inicial	94°C	2'	1
Denaturación	94°C	30"	28 a 30
Hibridación	*°C	30"	
Extensión	72°C	30"	
Extensión Final	72°C	10'	1

La temperatura de hibridación fue de 59°C para los primers que amplifican los genes *cry7Aa1*, *cry3Ca1*, y *virD2*; de 60.3°C para los que amplifican el gen *nptII*; y de 68°C para los que amplifican la secuencia externa al ADN - T “backbone”.

Tabla 30. Explantes totales transformados de *Ipomoea batatas* cv. Huachano

Ciclos de amplificación	Temperatura	Tiempo de duración	Nº Ciclos
Denaturación inicial	94°C	2'	1
Denaturación	94°C	30"	28 a 30
Hibridación	*°C	30"	
Extensión	72°C	30"	
Extensión Final	72°C	10'	1

Tabla 31. Eficiencia de regeneración (ER) y Eficiencia de Transformación (ET) en ambos protocolos de transformación

Tipo de explante transformado	Nº transformados	Eficiencia de regeneración (ER)	Eficiencia de transformación (ET)
Meristemos	46	(5/46) x100 = 10.87%	*(4/46) x100 = 8.70%
Hojas con peciolo	282	(6/282) x100 = 2.13%	*(4/282) x100 = 1.42%
	<i>p-value</i>	0.009	0.014

De los 5 regenerantes obtenidos por el método de transformación a partir de meristemos solo se obtuvieron 4 eventos transgénicos, mientras que, de los 6 regenerantes obtenidos a partir de hojas con peciolo, solo 4 fueron eventos transgénicos con inserciones completas, uno presentó solo la inserción del gen *nptII* con ausencia de los genes *cry7Aa1* y *cry3Ca1* y el último fue negativo.

Tabla 32. Resultados de la prueba *in vitro* de los Regenerantes

Tipo de explante transformado	Regenerantes Obtenidos	Callo +	Callo -	Total
Meristemos	5	4	1	5
Hojas con peciolo	6	5	1	6

Tabla 33. Resultados de PCR para la detección de los genes introducidos (*nptII*, *cry7Aa1*, *cry3Ca1* y *virD2*) y de la secuencia del vector backbone en cada regenerante analizado

Tipo de explante transformado	Nombre de los Regenerantes	Km (<i>nptII</i>)	pCIP78 (<i>cry7Aa1</i>)	pCIP79 (<i>cry3Ca1</i>)	<i>virD2</i>	backbone
Meristemos	I	+	+	+	-	-
	II	+	+	+	-	+
	III	-	-	-	-	-
	IV	+	+	+	-	-
	V	+	+	+	-	+
Total	5	4	4	4	0	2
Hojas con peciolo	1	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	-	-
	4	+	+	+	-	-
	5	+	+	+	-	+
	6	+	-	-	-	-
Total	6	5	4	4	1	2