

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Ciencias y Filosofía



Introducción del gen optimizado *Avr3a* de *Phytophthora infestans* mediante un vector binario de *Agrobacterium* en *Solanum tuberosum* var. *Pentland Ace* para inducir resistencia a tizón tardío

María Lupe Román Horna

Tesis para optar el Título de Licenciado en Ciencias con Mención en

Biología

Lima – Perú

2013

JURADO DE TESIS

PhD. Luis Destéfano	Presidente
PhD. Cristina Guerra	Vocal
M. Sc. Rocío Inga	secretaria

*A mis pequeños hijos con todo mi amor y cariño:
María Fernanda y Miguel Eduardo Orrego Román,
Gracias por enseñarme algo nuevo cada día.*

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Internacional de la Papa liderado por el PhD. Marc Ghislain gracias por su confianza y apoyo brindado para realizar este trabajo.

Al PhD. José Condori, gracias por tus excelentes consejos, apoyo incondicional y críticas constructivas para el presente trabajo.

Al Master José Tovar, gracias por tu apoyo en todo momento para realizar este trabajo especialmente en la parte experimental y también por tus acertados consejos.

Al PhD. Daniel Clark por la paciencia y buenos consejos en la corrección de mi tesis.

A mis jurados asignados: PhD. Cristina Guerra, PhD. Luis Destéfano y M. Sc. Roció Inga por sus críticas, consejos y apoyo en la corrección final de mi tesis.

A todos mis compañeros del Centro Internacional de la Papa que me apoyaron en el presente trabajo en especial a Sofía Tejada, gracias por tu ayuda en la animación querida amiga y Ada Sumi por alentarme en seguir adelante.

De una manera muy especial a Dios y a mi familia porque sin ustedes y sin su gran apoyo no lograría mis objetivos.

RESUMEN

El gen *Avr3a* de *Phytophthora infestans* codifica la proteína AVR3a. Esta proteína es reconocida por los productos del gen *R3a*, el cual se encuentra en el genoma de *Solanum tuberosum* var. Pentland Ace. Como consecuencia de este reconocimiento, se desencadena una muerte celular programada denominada respuesta hipersensible (HR). Este mecanismo natural puede ser aprovechado para conferirle a la papa resistencia a distintas razas de *Phytophthora infestans* a través del uso de la transgénesis.

Para lograr dicha resistencia, se desarrolló una construcción quimérica usando la secuencia optimizada del gen *Avr3a*. Este fue optimizado para lograr una mejor expresión en papa, bajo el control del promotor inducible *GstI*. El promotor *GstI* es inducible por el ataque de patógenos, por lo que se anticipa su activación en presencia de *Phytophthora infestans* y la inducción de mecanismos de resistencia en las plantas que posean esta construcción.

El gen *Avr3a* bajo el control del promotor *GstI* fue clonado en el vector binario pBIN20. Se usó la técnica de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para transferir el constructo *Avr3a* en la variedad de papa Pentland Ace. Se generaron plantas transformadas y la inserción del transgén fue confirmada mediante técnicas moleculares (por ejemplo PCR, Southern blot).

ABSTRACT

The *Avr3a* gene from the pathogen *Phytophthora infestans*, codifies the AVR3a protein. *Solanum tuberosum* var. Pentland Ace harbors in its genome the *R3a* gene. AVR3 forms a complex with R3a and, as a result of this recognition, triggers a programmed cell death called hypersensitive response (HR). This natural mechanism can be employed to confer resistance to potato against various races of *Phytophthora infestans* through the use of transgenesis.

In order to achieve this goal, we developed a chimeric construct using an optimized *Avr3a* gene sequence. This was optimized for better expression in potato under the control of the *Gst1* inducible promoter. *Gst1* promoter is inducible by pathogen attack, so that can anticipate activation in the presence of *Phytophthora infestans* and induce mechanisms of resistance in plants having this construction.

Avr3a gene driven by *Gst1* promoter was cloned into the binary vector pBIN20. *Agrobacterium*-mediated transformation was used to transfer *Avr3a* construct in potato variety Pentland Ace. Transformed plants were generated and insertion of the transgene was confirmed using molecular techniques (e.g. PCR, Southern blot).

ABREVIATURAS

ADN-T	ácido desoxirribonucleico de transferencia
Amp	ampicilina
<i>Avr</i>	gen de avirulencia
CIP	Centro Internacional de la Papa
EDTA	ácido etilen diamino tetra acético
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano sulfónico
Km	kanamicina
pb	pares de bases
<i>GstI</i>	promotor del gen <i>glutación-S-transferasa</i>
PIPES	ácido 1,4-piperazina dietano sulfónico
<i>R</i>	gen de resistencia
RH	respuesta hipersensible
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
TBE	Tris-Borato-EDTA
Tris®-HCL	tris hidroximetil aminometano

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Phytophthora infestans</i> , agente causal del tizón tardío	2
1.2 Interacción planta - patógeno y respuesta hipersensible	4
1.3 El gen de avirulencia <i>Avr3a</i>	9
1.4 Estrategias para la obtención de resistencia a <i>P. infestans</i>	10
1.5 Elementos para la introducción de transgenes en <i>Solanum tuberosum</i> por transformación con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	13
1.5.1 Vectores de clonación	13
1.5.1.1 Vectores cointegrados	14
1.5.1.2 Vectores binarios	15
1.5.1.2.1 Vector pBIN20	16
1.5.2 Promotores	17
1.5.2.1 Promotor endógeno inducible <i>GstI</i>	17
1.5.3 Secuencia terminadora del gen de la nopalina sintasa.	20
1.5.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa EHA105	19
1.6 Transformación genética en plantas mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
1.6.1. Sistema de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
1.6.2. Genes marcadores de selección	24
1.7 <i>Solanum tuberosum</i> var. Pentland Ace	25
1.8 Planteamiento del problema	25
II. OBJETIVOS	27
III. MATERIALES	28
3.1 Materiales	28
3.1.1 Material bacteriano	28
3.1.1.1 Cepas bacterianas	28
3.1.1.2 Plásmidos	28
3.1.2 Material vegetal	29
IV. MÉTODOS	30
4.1 Construcción del vector pCIP65	32
4.1.1 Cultivo bacteriano	32
4.1.2 Extracción de plásmido (<i>E. coli</i>)	32
4.1.3 Extracción de plásmido (<i>A. tumefaciens</i>)	33
4.1.4 Cuantificación del ADN	34

4.1.5 Digestión por endonucleasas de restricción	35
4.1.6 Aislamiento y purificación de los fragmentos de ADN	35
4.1.7 Ligación vector – inserto	36
4.1.8 Transformación de bacterias	37
4.1.8.1 Quimiotransformación de bacterias	37
4.1.8.2 Electrotransformación de bacterias	38
4.1.9 Selección de colonias transformadas	38
4.1.10 Digestión de comprobación	39
4.1.11 Verificación de la adecuada recombinación de los genes quiméricos	39
4.2 Transformación genética de <i>S. tuberosum</i> var. Pentland Ace con el vector pCIP65	40
4.2.1 Propagación <i>in vitro</i> de <i>S. tuberosum</i> var. Pentland Ace	40
4.2.2 Cultivo de bacteria <i>A. tumefaciens</i>	40
4.2.3 Transformación genética de <i>S. tuberosum</i> L var. Pentland Ace	40
4.2.4 Cosecha y propagación de las líneas potencialmente transformadas	43
4.2.5 Prueba de resistencia a kanamicina	43
4.2.6 Análisis moleculares	44
4.2.6.1 Prueba de PCR	44
4.2.6.1.1 Extracción de ADN a pequeña escala	44
4.2.6.1.2 Diseño y estandarización de cebadores específicos para el transgén <i>Avr3a</i>	46
4.2.6.1.3 Reacción de PCR	48
4.2.6.1.4 Condiciones de amplificación de la PCR	48
4.2.6.2 Prueba de Southern blot	49
4.2.6.2.1 Extracción de ADN vegetal a mediana escala	49
4.2.6.2.2 Digestión del ADN vegetal	50
4.2.6.2.3 Preparación de la sonda	51
4.2.6.2.3.1 Reacción de PCR	51
4.2.6.2.3.2 Condiciones de amplificación de la PCR	52
4.2.6.2.4 Corrida electroforética del gel	53
4.2.6.2.5 Transferencia del ADN	53
4.2.6.2.6 Hibridación de la membrana	55
4.2.6.2.7 Detección de la sonda	56
4.2.6.2.8 Revelado	57
V. RESULTADOS	58
5.1 Construcción del vector pCIP65	59
5.2 Transformación genética en <i>S. tuberosum</i> var. Pentland Ace con el vector pCIP65	77
5.2.1 Prueba de resistencia a kanamicina	79
5.2.2 Prueba de reacción en cadena de la polimerasa: PCR	80
5.2.3 Prueba de Southern blot	82
VI. DISCUSIÓN	84

VII. CONCLUSIONES	91
VIII. RECOMENDACIONES	92
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
X. ANEXO	109

I. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.), de origen peruano, representa el 50% de la producción mundial de tubérculos y es el cuarto cultivo alimentario del mundo después del maíz, trigo y arroz ¹. Este recurso alimenticio posee el mayor contenido de proteínas (aprox. 2,1% del peso fresco) entre los cultivos de raíces y tubérculos andinos y es importante por su contenido de aminoácidos adecuados a las necesidades humanas. A su vez, la papa contiene niveles elevados de vitamina C: una papa de tamaño medio contiene casi la mitad de la ingesta diaria recomendada ².

La papa es susceptible a varias enfermedades ocasionadas por plagas de bacterias, virus, hongos, oomicetos y nemátodos. El principal patógeno que ataca a este cultivo es el oomiceto *Phytophthora infestans*, causante del tizón tardío de la papa ³.

Solo en los países en vías de desarrollo, el tizón tardío afecta a 3 millones de hectáreas de tierras productoras de papa y las pérdidas agrícolas se estiman en 2 750 mil millones de dólares al año ⁴. A nivel mundial, este patógeno causa el 10-15% de la pérdida de la producción global por año. El valor económico de la pérdida y el costo de protección de la cosecha se estima en 5 mil millones de dólares al año ⁵.

La principal medida para contrarrestar estas pérdidas es la aplicación de productos fitosanitarios de origen químico. Su principal desventaja es su difícil acceso y costo elevado para los agricultores de escasos recursos, quienes cultivan la papa muchas veces en zonas alejadas de los centros comerciales ⁶.

1.1 *Phytophthora infestans*, agente causal del Tizón tardío.

Considerado el patógeno más destructivo del cultivo de papa, *Phytophthora infestans* pertenece al reino protista y se le clasifica como un oomiceto relacionado a las algas pardas. Las plantas hospederas más importantes de *Phytophthora* son la papa (*Solanum tuberosum* L.), el pepino (*S. muricatum* Ait.) y el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), aunque ocasionalmente afecta también a la berenjena (*S. melongena*) y a muchas especies de la familia Solanaceae ⁷. Este patógeno ocasionó la hambruna irlandesa en el siglo IXX y la migración de la población a EEUU ⁸.

P. infestans se caracteriza por presentar dos tipos reproductivos denominados A1 y A2, y posee dos formas de reproducción: una asexual y otra sexual (FIGURA 1). La reproducción asexual solo requiere uno de los tipos reproductivos, ya sea el A1 (presente en todas las zonas paperas del mundo) o el A2. La reproducción sexual, por su parte, necesita obligatoriamente la presencia de los dos tipos reproductivos A1 y A2, los cuales representan a los gametos sexuales (anteridio y oogonio) presentes en dos hifas separadas ⁹.

La infección se produce al descender las temperaturas entre 12 y 15°C, e incrementarse la humedad aproximadamente hasta 100%. El patógeno penetra en el tubérculo o en las hojas a través de heridas, lenticelas o por penetración directa a través de la epidermis ¹⁰. Una vez en el interior de la planta, se generan filamentos miceliales dentro de la célula o en los espacios intercelulares que producen esporangios como parte de la reproducción asexual. Los esporangios se diseminan para dar lugar al tubo germinativo, en caso de germinación directa, o generar zoosporas en caso de germinación indirecta. Las zoosporas forman quistes que luego germinan y permiten la formación del apresorio y de haustorios, causando unas

manchas necróticas en la epidermis del hospedero llamadas lesiones esporulantes. Estas últimas son el síntoma más común de la infección por *Phytophthora* ¹¹.

En la reproducción sexual los gametos se fusionan para originar primero a las oosporas, que luego germinan directamente como esporangios para continuar con los otros estadios del ciclo asexual. En comparación con la forma asexual de propagación, la forma sexual tiene la ventaja de generar una alta variabilidad genética que puede dar lugar a la aparición de razas más agresivas ¹².

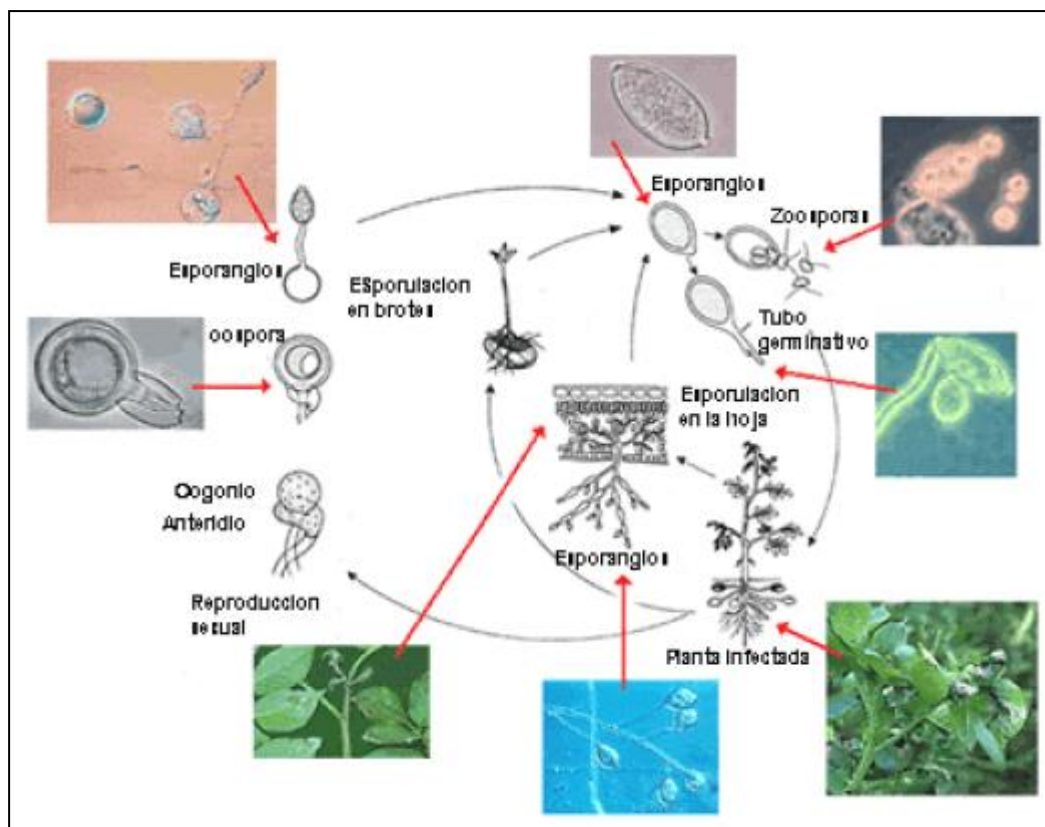


FIGURA 1. Ciclo de vida de *Phytophthora infestans*. Fuente: Adaptado de Hooker, 1980.

P. infestans es considerado un patógeno con alto potencial evolutivo ¹³ y de neutralización de las respuestas determinadas por los genes de resistencia *R* que poseen las plantas hospederas ¹⁴. Como otros patógenos, *P. infestans* secreta unas proteínas efectoras del haustorio que alteran la fisiología del huésped y facilitan la colonización implicada en la patogénesis ¹⁵.

El genoma de *P. infestans* tiene un tamaño de 240 Mb, particularmente grande si es comparado con otros patógenos de este género, y esto se debe a que está compuesto en su mayoría (~74%) de regiones con secuencias altamente repetitivas, las cuales presentan características muy dinámicas ¹⁴. El secuenciamiento de este genoma demostró que los genes que codifican a los efectores y otros genes que son inducidos durante la infección se encuentran localizados en las regiones con secuencias altamente repetitivas y escasas en genes, en contraste con los genes esenciales o “housekeeping” que se encuentran en regiones no repetitivas y densas en genes. Las regiones con secuencias altamente repetitivas promueven la plasticidad evolutiva al aumentar la variación genética del grupo de genes efectores que determinan la patogenicidad ¹⁶.

1.2 Interacción planta - patógeno y respuesta hipersensible.

Todas las plantas tienen una primera línea de defensa contra patógenos denominada defensa pasiva, que incluye la pared celular, capas de cera y otras barreras químicas. Si el patógeno supera esta primera línea de obstáculos, se activa una segunda línea de defensa que está constituida por múltiples reacciones que van desde reacciones generales, no específicas contra el patógeno, hasta reacciones específicas contra un patógeno o una raza particular del patógeno. Dentro de las últimas está la reacción de defensa por los genes de resistencia (*R*) ¹⁷. Para que se

desencadene este mecanismo se requiere la presencia de ciertas proteínas del patógeno denominadas efectores, definidas, en principio, como moléculas que pueden facilitar la infección. Estas comprenden las toxinas o factores de virulencia, que son moléculas que alteran de manera efectiva la señalización celular y facilitan la colonización del hospedero, y factores de avirulencia o elicitores, que al ser reconocido a nivel molecular por el hospedero, desencadenan respuestas de defensa que resultan en una resistencia parcial o total al patógeno. Dentro del grupo de los elicitores se hallan las proteínas de avirulencia (*Avr*), identificadas en organismos entre los que se encuentran varias clases de *Phytophthora*^{15, 18}.

La mayoría de los genes de avirulencia (*Avr*) y resistencia (*R*) tienen un carácter dominante. En el concepto del “gen por gen” (FIGURA 2), la planta porta alelos dominantes (*R*) sobre los alelos de susceptibilidad (*r*), de igual modo que el patógeno porta alelos de avirulencia (*Avr*) sobre los alelos de virulencia (*avr*). Las proteínas sintetizadas por los genes *Avr*, denominadas elicitores, pueden interactuar de manera directa con los productos de los genes *R* correspondientes, o de manera indirecta involucrando un tercer componente denominado blanco de virulencia¹⁹.

Existen dos tipos de interacción entre la planta hospedera y el patógeno: incompatible y compatible. En la interacción incompatible el patógeno no logra infectar la planta porque posee el alelo de avirulencia *Avr* mientras la planta posee el alelo de resistencia correspondiente *R*. En cambio, en la interacción compatible, el patógeno logra infectar la planta porque no posee ningún alelo de avirulencia correspondiente a los alelos de resistencia de la planta o porque la planta no posee ningún alelo de resistencia *R*^{20, 21}.

La interacción incompatible desencadena la resistencia a la enfermedad activando rápidamente una vía de señales de transducción denominada respuesta de

hipersensibilidad (RH) ^{19,22}. La RH se caracteriza principalmente por presentar una muerte celular programada en el mismo sitio de la infección en la planta, observándose una zona necrótica en la epidermis. Por el contrario, en la interacción compatible se desarrolla la enfermedad ante el ataque de un patógeno debido a que no se activa tempranamente la RH, permitiendo que éste se desarrolle y colonice el tejido ^{21,23}.

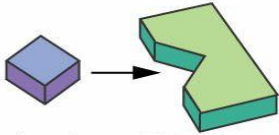
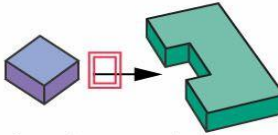
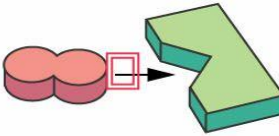
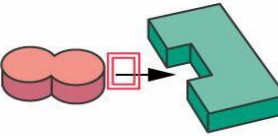
Pathogen genotype	Host plant genotype	
	<i>R1</i>	<i>r1</i>
<i>Avr1</i>	 <p>Avr1 R1 protein</p> <p>No disease (Plant and pathogen are incompatible.)</p>	 <p>Avr1 r1 protein</p> <p>Disease (Plant and pathogen are compatible.)</p>
<i>avr1</i>	 <p>avr1 R1 protein</p> <p>Disease (Plant and pathogen are compatible.)</p>	 <p>avr1 r1 protein</p> <p>Disease (Plant and pathogen are compatible.)</p>

FIGURA 2. Hipótesis: “gen por gen”. Fuente: B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L Jones (Eds.), 2000. ASPP Press, Rockville, MD, 1367 pp.

La resistencia manifestada en las plantas se ha clasificado en dos categorías:

1.-Resistencia vertical- Tiene carácter cualitativo, es monogénica u oligogénica y específica. Debido al reducido número de genes participantes, determina una clara incompatibilidad entre el hospedero y el patógeno, haciendo que la reacción incompatible sea limitada a razas específicas. Con el tiempo, al aparecer una raza nueva del patógeno con genes de virulencia diferentes, se rompe la resistencia, volviendo vulnerable la población de plantas. Como ejemplos de genes de resistencia vertical podemos mencionar el grupo de genes que incluyen desde el gen R1 hasta el gen R11 de *Solanum demissum*²⁴.

2.-Resistencia horizontal- Tiene carácter cuantitativo, es poligénica, no específica, lo que la hace duradera en campo ya que actúan diversos genes en conjunto. Esto previene que se rompa la resistencia, ya que el patógeno tendría que mutar numerosos genes al mismo tiempo para ello. Esta resistencia horizontal suele ser parcial y dirigida contra todas las razas de un patógeno determinado, permitiendo daños leves en la planta que no amenazan su desarrollo. Ejemplo de estos genes son: *RB*, *Blb2* y *Blb3* de *Solanum bulbocastanum*.

Los efectores que producen los patógenos como *Phytophthora infestans* son sustancias encargadas de reprogramar, permitir la infección y promover la enfermedad en las células que llegan a parasitar. Estas moléculas proteicas se clasifican en:

- Efectores apoplasmáticos: Son secretados dentro del espacio extracelular de la planta, donde interactúan con los objetivos extracelulares y los receptores de membrana.
- Efectores citoplasmáticos: Se introducen en la célula vegetal, aparentemente por estructuras especializadas como vesículas de infección y haustorios¹⁵.

Un grupo importante de efectores (entre ellos proteínas *Avr* que provienen de oomicetos) pertenecen a la familia RXLR, que agrupa proteínas que llevan consigo el patrón conservado RXLR (arginina, cualquier aminoácido, leucina, arginina). Se ha sugerido que el patrón RXLR funciona como señal para mediar el paso de la proteína desde el haustorio hacia el interior de la célula vegetal ²⁵. La forma como la proteína encuentra luego sus blancos en la célula vegetal es aún materia de investigación.

Las proteínas *Avr* de los oomicetos poseen en el extremo N-terminal un péptido señal de secreción tipo II seguido de la secuencia patrón ya mencionada, RXLR; la cual está relacionado a la virulencia del patógeno y activa el dominio NB-LRR de las proteínas citosólicas R, desencadenando la respuesta de hipersensibilidad ²⁶. En el extremo C-terminal se encuentra una secuencia patrón W, la cual es requerida para las funciones del efector y que se ha demostrado también que es reconocida por los genes *RB* de resistencia horizontal, entre otros ²⁷.

El gen *Avr* de *P. infestans* que se ha estudiado con mayor profundidad es *Avr3a*, que tiene como contraparte al gen de resistencia *R3a* de *Solanum demissum*. Este gen posee dos alelos, uno virulento y el otro avirulento, que se diferencian en solo dos aminoácidos. Además de *Avr3a*, también se ha descrito el gen *Avr4*, el cual interactúa con el gen de resistencia *R4* de *Solanum demissum*. *Avr4* tiene un alelo “virulento” que, a diferencia del alelo virulento de gen *Avr3a*, posee mutaciones en el marco de lectura y no produce una proteína efectora ²⁸.

Recientemente se ha reportado la identificación de otros genes de avirulencia de *P. infestans* conocidos como *ipiO* (in planta-induced gene) que también están presentes en las especies *P. andina*, *P. ipomoeae*, *P. phaseoli* y *P. mirabilis*. La expresión de los genes *ipiO* es inducida en la planta durante los primeros estadios del ciclo infeccioso de *P. infestans*. Las variantes de IPI-O se han dividido en tres clases,

de acuerdo a las secuencias aminoacídicas. La clase I (variantes IPI-O1 y IPI-O2) y clase II (variante IPI-O3) se encuentran en la mayoría de los aislamientos de *P. infestans*. El locus *ipiO* es extremadamente variable entre los aislamientos de *P. infestans*, encontrándose la mayor cantidad de polimorfismos en la secuencia patrón W, así como presencia o ausencia de alelos específicos y variaciones en el número de copias^{27,29}.

1.3 El gen de avirulencia *Avr3a*.

El gen de avirulencia *Avr3a* presenta dos alelos que codifican dos proteínas con tan solo tres residuos diferentes, dos de los cuales están presentes en la proteína madura. El alelo dominante avirulento *Avr3a* codifica AVR3A^{KI} (C¹⁹, K⁸⁰ y I¹⁰³) y puede desencadenar la inmunidad en la planta al activar a la proteína de resistencia R3a; el alelo recesivo virulento *avr3a* codifica AVR3a^{EM} (S¹⁹, E⁸⁰ y M¹⁰³)^{32,33} y está presente en las razas más patogénicas de *P. infestans*.

Estas proteínas son efectores citoplasmáticos de la familia RXLR, donde R es arginina, X cualquier aminoácido y L leucina; son secretadas dentro del citoplasma de las células hospederas durante la infección, lo cual ocurre cuando los esporangios de *P. infestans* liberan zoosporas que germinan en la superficie de la hoja³⁴.

Dentro del citoplasma, la proteína *Avr3a* es reconocida en forma directa o indirecta por la proteína R3a de la planta de papa que es codificada por el gen de resistencia *R3a*, desencadenando la RH. La RH incluye una muerte celular programada, así como la producción de compuestos antimicrobianos (fitoalexinas), flujo de iones, compartimentalización de la célula e inducción de proteínas relacionadas a la patogénesis (glucanasas entre otros), y el incremento de la

biosíntesis de etileno.^{35,36} La producción de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroperoxilo (HO₂⁻¹)³⁷ ha sido observada también como parte de la respuesta inducida por el mecanismo RH.

1.4 Estrategias para la obtención de resistencia a *P. infestans*.

En los últimos 75 años se han introducido, mediante mejoramiento genético convencional, varios genes mayores de resistencia (*R*) a tizón tardío, como los genes *R1* al *R11* provenientes de la especie silvestre *Solanum demissum*³⁸. Estos genes han permitido obtener cultivares resistentes solo a un número determinado de razas del patógeno; además, esta resistencia demostró ser poco duradera en campo debido a la existencia de otras razas de *P. infestans* que no poseen los alelos de avirulencia correspondientes³⁹. Otros genes de resistencia menores del tipo *R* que se han descubierto y se han localizado en un mapa son *R12* y *R13*, los cuales provienen de *S. berthaulti*⁴⁰, *Rpi1* de *S. pinnatisectum*⁴¹, *Rpi-moc1* de *S. mochiquense*⁴² y *Rpi-blb3* de *S. bulbocastanum*⁴³. Los genes que ya han sido introgresados en cultivares de papa son dos genes mayores *R1*⁴⁴, el gen *R3a* del locus *R3*⁴⁵ y los genes *Rpi-blb1*^{46,47,48}, *Rpi-blb2* y *Rpi-blb3* de *S. bulbocastanum*⁴⁹.

El gen *Rpi-blb1*, también conocido como gen *RB*, y el gen *Rpi-blb2* poseen un amplio espectro de resistencia contra las todas las razas de este patógeno y se mantienen en campo⁴⁶. La principal desventaja de este tipo de mejoramiento es que las variedades comerciales de papa son tetraploides y altamente heterocigotas, desarrollándose más lentamente que los otros cultivos importantes. En un estudio de caso, la variedad Canchan-INIAA demoró 11 años en ser liberada desde el primer cruzamiento y 18 años para ocupar hoy el 30% del mercado de papa fresca^{50,51}. Por lo tanto, la producción de una nueva variedad de papa con resistencia a tizón tardío

podría demorar hasta 30 años antes de llegar a ser una variedad importante. En cambio, la transferencia directa de genes de resistencia resulta atractiva porque en un periodo de tres años, aproximadamente, se podría obtener una nueva planta transgénica con resistencia al tizón tardío (1 año en laboratorio, 1 año en invernadero, 1 año en campo).

Antes de llegar al mercado y convertirse en una variedad comercial, las plantas transgénicas obtenidas deben pasar por una serie de evaluaciones rigurosas sobre su inocuidad para la salud humana y el ambiente, de modo que se pueda garantizar que son aptas para cultivarlas y consumirlas ⁵².

En la actualidad hay 23 países industrializados y en vías de desarrollo, entre ellos EEUU, Canadá, España, Argentina, India, China y Brasil, que cultivan y exportan cultivos obtenidos por la transferencia directa de genes (llamados cultivos transgénicos), tales como el maíz Bt, la soya RR, el algodón Bt, observándose una rápida aceptación de estos productos por los agricultores. Argentina es uno de los primeros países en cultivar plantas transgénicas y el segundo país productor de cultivos transgénicos en el mundo con 19.1 millones de hectáreas en el 2007, lo que representa el 19% de la superficie global de transgénicos. El principal cultivo que comercializa es la soya RR desde 1996, la cual abarca en la actualidad el 99% de la producción de soya en ese país. Ello ha ocurrido en solo 11 años desde su liberación comercial, lo cual significó para el país ingresos de hasta US\$20 mil millones en la década de 1996 al 2005 ⁵³.

Por lo tanto, la alternativa más conveniente para desarrollar nuevas variedades con resistencia a patógenos podría ser la transformación genética, ya que se realiza de una manera más rápida y más certera, e involucra la transferencia de genes específicos. En particular, la ingeniería genética puede contrarrestar las

amenazas de las plagas y enfermedades que afectan a la producción agrícola, mejorando rápidamente sus rendimientos ⁵⁴.

Trabajos anteriores para conferir resistencia a tizón tardío han desarrollado papas transgénicas que expresan genes de proteínas antimicrobianas tales como osmotina ⁵⁵, lizosima ⁵⁶, glucanasa ⁵⁷. Varios reportes han demostrado cierto grado de resistencia a *P. Infestans*, pero ninguna ha logrado ser suficiente para una liberación comercial.

A la fecha hay dos estrategias de ingeniería genética promisorias para incrementar la resistencia al tizón tardío y que involucran la generación de plantas de papa transgénicas: la transferencia de genes de resistencia *R*, con amplio espectro de resistencia a razas de *P. infestans*, y la inducción de muerte celular programada por presencia de *P. infestans* ⁵⁸. Esta última estrategia tiene como precedente un estudio realizado en tomate con la finalidad de contrarrestar la infección contra *Cladosporium fulvum* y que se basó en el desarrollo de vectores que portaban el gen de avirulencia *Avr9* bajo el control del promotor constitutivo *CaMV35s* o del promotor inducible *GstI*. Los vectores fueron introducidos en la variedad de tomate Sonatina, que tiene el gen de resistencia *Cf9*. En la transformación con el primer promotor no se obtuvo ninguna planta transgénica debido a que este es constitutivamente activo en el material transformado, necrotizando desde un inicio los tejidos. Por el contrario, con el promotor *GstI* sí se obtuvieron plantas transgénicas debido a que este promotor tiene una expresión inducible. Por tal motivo no se observaron efectos adversos en la capacidad de crecimiento y regeneración del material transformado; sin embargo, cuando su expresión fue inducida, se observó el desarrollo de RH, lo cual indica la validez del sistema de resistencia ⁵⁹.

1.5 Elementos para la introducción de transgenes en *Solanum tuberosum* por transformación con *Agrobacterium tumefaciens*.

1.5.1 Vectores de clonación

Los vectores naturales de transformación vegetal son plásmidos de gran tamaño (aproximadamente 200 kb), provenientes de la bacteria *A. tumefaciens*. Llevan por nombre Ti (inductor de tumores) y transfieren una parte de su ADN, el llamado ADN de transferencia (ADN-T), a las células vegetales que infectan, induciendo la formación de tumores en la planta. Esta enfermedad se denomina “agalla de la corona”⁶⁰.

Este plásmido Ti posee dos componentes genéticos importantes: el ADN-T y la región de virulencia, codificada por el grupo de genes *vir*. El ADN-T contiene dos tipos de genes: (1) genes que se expresan eficientemente en la célula vegetal e inducen la síntesis de hormonas vegetales, denominados oncogenes, debido a que inducen la formación de tumores y (2) genes que sintetizan las hormonas opinas y octopinas. Esta región está delimitada por el borde derecho e izquierdo, con 25 pb cada uno. La región *vir*, de 35 kb, posee un operón con 8 genes principales: *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* y *virH*. Estos genes actúan en conjunto para transferir el ADN-T de la bacteria al núcleo de la célula vegetal como ADN de una sola hebra^{61, 62}.

El conocimiento sobre el mecanismo de transferencia del ADN-T ha permitido el desarrollo de vectores para la introducción de genes foráneos en plantas cultivadas. Para esto, se han eliminado los genes que codifican enzimas para la síntesis de opinas y oncogenes del ADN-T, obteniéndose plásmidos llamados “vectores desarmados”. Existen dos tipos de vectores desarmados usados en la actualidad: vectores cointegrados y vectores binarios.

1.5.1.1 Vectores cointegrados

Estos vectores son construidos por la recombinación entre un plásmido Ti desarmado que contiene el borde izquierdo del ADN-T, el grupo de operones *vir* y un origen de replicación en *A. tumefaciens*, y un segundo plásmido intermedio que contiene el gen de interés, un gen marcador de selección para células vegetales transformadas, otro gen marcador de selección que puede ser usado tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*, el borde derecho del ADN-T, origen de replicación de *E. coli* y una región homóloga respecto a un segmento del plásmido Ti desarmado (FIGURA 3). La recombinación se lleva a cabo por un evento de entrecruzamiento de regiones homólogas de los dos plásmidos. Una vez cointegrado, el plásmido es estable en *Agrobacterium*⁶³. El problema en el uso de estos vectores es su gran tamaño, que dificulta su manipulación *in vitro*.

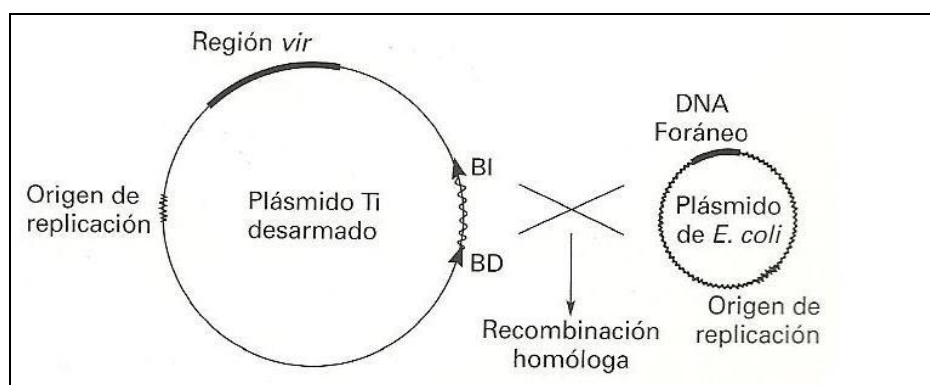


FIGURA 3. Vector cointegrado de transformación genética con *A. tumefaciens*.
BD: borde derecho, BI: borde izquierdo.

1.5.1.2 Vectores binarios

Estos son los vectores más usados en transformación de plantas y son de una gran variedad. El gran tamaño de los vectores Ti de 200kb ha forzado el desarrollo

de nuevas estrategias como colocar los genes *vir* y el ADN-T en dos plásmidos separados (FIGURA 4). En este sistema *Agrobacterium* tiene dos vectores:

1) Un plásmido Ti desarmado, llamado ayudante, de mayor tamaño, que se encuentra dentro de *A. tumefaciens* y que contiene la región *vir*. Esta región actúa en *trans* sobre el ADN-T⁶⁴.

2) Un plásmido binario que contiene el gen de interés y el gen marcador para células transformadas insertados entre los bordes derecho e izquierdo del ADN-T. Además contiene al gen marcador de selección tanto para *E. coli* como para *A. tumefaciens* y los orígenes de replicación para ambas bacterias. Este vector es el más pequeño.

Los diferentes vectores binarios usados en la actualidad tienen la ventaja de poseer un tamaño pequeño (11 kb), el cual resulta manejable para una eficiente clonación de genes y transformación; un abundante número de sitios de restricción del ADN-T, lo que facilita la clonación; orígenes de replicación diseñados para obtener un alto número de copias y el gen de selección en bacterias y plantas⁶⁵.

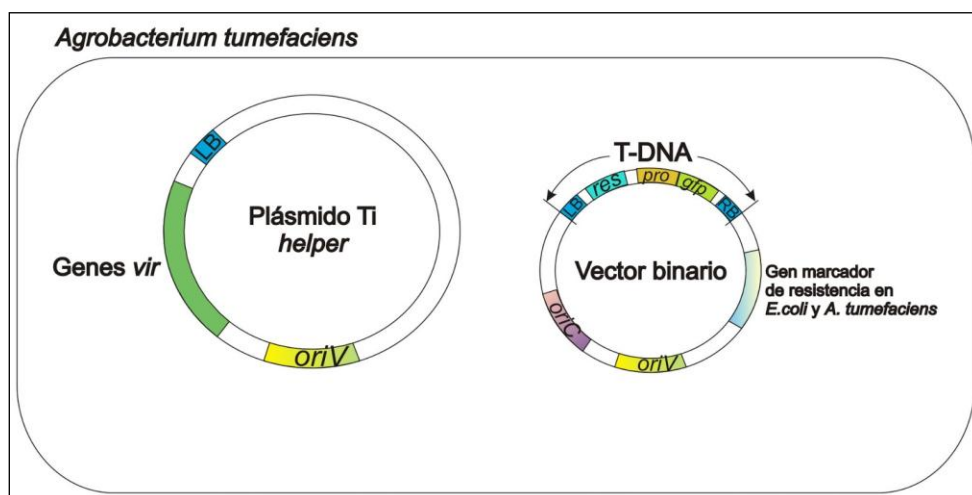


FIGURA 4. Vector binario de transformación genética con *A. tumefaciens*. LB: borde derecho, LB: borde izquierdo, oriV: origen en *A. tumefaciens*, oriC: origen en *E. coli*, res: gen de resistencia, pro: proteína de interés, gfp: proteína de fluorescencia verde (gen reportero-opcional).

1.5.1.2.1 Vector pBIN20

Este vector binario contiene 18 sitios únicos de restricción (sitio de clonación múltiple SCM), lo cual facilita la inserción de transgenes. Este SCM proviene del vector pSL301. El pBIN20 también contiene el gen de resistencia a kanamicina (*nptII*) entre los bordes del ADN-T ⁶⁶.

El progenitor plasmídico de pBIN20 es el vector pBI121, un derivado del pBIN19 ⁶⁴, ⁶⁷ que contiene el gen de la β -glucuronidasa (*gus*) bajo el control de promotor *CaMV35s* y el sitio de poliadenilación del gen de la nopalina sintasa (*nos*). Este vector ha sido utilizado en diversos trabajos de transformación genética en papa, camote con resultados favorables ^{68,69}.

1.5.2 Promotores

La elección de un promotor adecuado es de gran importancia para los trabajos de transformación genética, dado que éstos guiarán la expresión del transgén. Entre los diferentes promotores que se ha reportado hasta la fecha, se distinguen aquellos constitutivos, que permiten la expresión del gen en toda la planta en forma continua; los promotores inducibles, que responden a factores ambientales; y finalmente los promotores específicos, que permiten la transcripción en determinados órganos, tejidos y estadio de la planta ⁷⁰.

1.5.2.1 Promotor endógeno inducible *GstI*

El promotor *GstI*, presente en todos los eucariotes, controla la expresión del gen que tiene como producto final a la enzima glutatión S-transferasa. Dicha enzima actúa en la detoxificación celular en presencia de xenobióticos, protegiendo a las plantas del ataque de patógenos ⁷¹. El promotor de papa se denominó originalmente

pprp1-1, y se demostró una activación transcripcional rápida y local en respuesta a interacciones entre diferentes tipos de patógenos y sus hospederos⁷². Asimismo, se cree que la transcripción por este promotor no es inducida por estímulos abióticos ambientales como heridas o choque térmico⁷³.

Mediante ensayos de expresión con una construcción quimérica que acoplaba el promotor *Gst1* al gen de la β -glucoronidasa (*gus*), se identificaron elementos regulatorios *cis* del promotor *Gst1*. Una secuencia de 273 pb entre las posiciones -402 y -130 del promotor fue suficiente para una rápida activación transcripcional localizada en los sitios de infección con *P. infestans* en plantas transgénicas de papa (cv Desiree) transformadas con esta construcción quimérica. Asimismo, se encontró que este promotor inducía la expresión del gen *gus* en hojas senescentes y en los ápices de las raíces⁷².

La infección con otros patógenos de diversa naturaleza permitió verificar la inducción de este promotor en diferentes interacciones planta-microbio. Hojas de plantas transgénicas de papa (cv Bintje) transformadas con la misma construcción quimérica fueron inoculadas por separado con los virus PVY (potato virus Y) y PLRV (potato leaf roll virus). En la infección con PVY, se pudo observar puntos azules en las hojas en los sitios de inoculación, indicador de actividad enzimática de *gus* mediante el ensayo histoquímico, al tercer día post-infección; con el virus PLRV la infección de las plantas fue total, incluidos los tubérculos. Estos fueron sembrados para obtener plantas con infección secundaria, y se observaron síntomas de infección en las hojas inferiores de la planta. Mediante el ensayo histoquímico se analizaron las hojas sintomáticas y se encontró coloración azul en el área vascular de las hojas, zona donde se multiplica el virus. Asimismo se detectó actividad de *gus* en las hojas senescentes y los ápices de las raíces⁷⁴.

En otro modelo planta-patógeno, se utilizaron los entrenudos de plantas de papa transgénicas (cv Desiree) transformadas con la construcción quimérica para generar raíces *in vitro* e inocularlas con larvas del nemátodo *Globodera pallida*. El ensayo histoquímico en el tejido radicular reveló un máximo nivel de coloración azul a la semana post-infección en las regiones en las que se localizaban las larvas del nemátodo. Estos estudios confirmaron que la actividad del fragmento de 273 pb del promotor *Gst1* se limita al área del tejido donde se produce la infección con los patógenos, las hojas senescentes y los ápices de las raíces⁷⁴.

Los elementos regulatorios *cis* pueden mediar la expresión local de un gen de defensa después del ataque de un patógeno en la planta. Hay varios grupos de estos elementos regulatorios *cis* que son secuencias patrón: las cajas GCC (AGCCGCC) relacionadas con la expresión de genes de defensa; las cajas S (AGCCACC), similares a las cajas GCC e identificadas en la expresión directa mediada por elicitores fúngicos, son sitios de unión de la familia de factores de transcripción AP2/ERF; la caja W ((T)TGAC(C/T)) es el sitio de unión de diversos factores de transcripción pertenecientes a la familia WRKY. Esto último evidenciaría que las cajas W están entre los elementos regulatorios *cis* de mayor importancia en la expresión de genes de defensa de la planta inducidos por patógenos^{72, 75}.

En el promotor del gen *Gst1* de papa, el elemento regulatorio ha sido denominado caja *Gst1* (TTCTAGCCACCAGATTTGACCAAAAC), y está compuesto de una caja S y una caja W separadas por 4 pb. Esta es la región del promotor que media la activación transcripcional en respuesta a patógenos y durante la senescencia de hojas y ápices de las raíces. Esta secuencia patrón, o caja *Gst1*,

posee sitios de unión para dos de las tres grandes familias de factores de transcripción presentes en plantas⁷⁵.

1.5.3 Secuencia terminadora del gen de la nopalina sintasa.

La secuencia terminadora *nos* es parte del gen de la nopalina sintasa, la enzima que sintetiza la opina nopalina, dentro del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta secuencia es rica en motivos AT y además posee una señal de poliadenilación 5' AAUAAA, frecuentemente presente en terminadores vegetales. Los vectores de transformación para *Agrobacterium* incorporan esta secuencia en el gen de interés debido a su eficiente funcionamiento en la adición de la señal poli (A), la cual es importante en sistemas eucariotas para el procesamiento del ARNm maduro⁷⁶.

Esta secuencia tiene una longitud de 253 pb. Su corta longitud puede incrementar la eficiencia de transformación al reducir el tamaño del ADN-T y hacer más fácil su transferencia a la planta. Este terminador ya ha sido usado en numerosos trabajos de transformación genética en vegetales con resultados favorables^{77,78}.

1.5.4 *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105.

La cepa desarmada hipervirulenta EHA105 de *A. tumefaciens* posee un plásmido ayudante derivado del plásmido inductor de tumores pTiBo542 de la cepa natural A281 de *A. tumefaciens*, cuyo ADN-T permite la síntesis de la opina L, L-succinamopina. Se demostró en un estudio en el que se compararon las cepas de *A. tumefaciens* MOG301, de naturaleza nopalina, MOG101, de naturaleza octopina, y EHA105, de naturaleza L, L-succinamopina, que esta última presentaba una alta eficiencia de transformación en hojas de tabaco, tomate, papa y col. Ello se puede

deber a que la cepa A281 de *A. tumefaciens*, de donde proviene la cepa EHA105, es hipervirulenta en solanáceas y virulenta en un amplio rango de plantas ⁷⁹.

Asimismo, la cepa hipervirulenta EHA105 tuvo una alta eficiencia de transformación en monocotiledóneas (por ejemplo, embriones inmaduros de *Zea mays*), en contraste con las cepas LBA4404 de naturaleza octopina y GV3101 de naturaleza nopalina ⁸⁰.

1.6 Transformación genética en plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens*

1.6.1. Sistema de *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria que es usada exitosamente para transformación genética en numerosas plantas dicotiledóneas en las que induce la formación de tumores conocidos como “agallas” o “tumores del cuello” ⁸¹. Es una bacteria Gram negativa que habita en el suelo, y es considerada una proteobacteria alfa de la familia Rhizobiaceae ⁸². El proceso de infección es guiado por las sustancias que la planta excreta en heridas pequeñas por las que la bacteria se introduce. La bacteria se ubica entonces en los espacios intercelulares y desde allí transfiere a las células de la planta un fragmento de su material genético denominado ADN-T (ADN de transferencia), que se integra en el genoma de la planta ⁸³.

Este ADN-T es parte del plásmido Ti (del inglés “Tumor inducing”) y contiene genes que provocan la producción de reguladores de crecimiento vegetal que, a su vez, determinan el desarrollo del tumor. El ADN-T también contiene genes codificadores de enzimas que causan que la planta produzca aminoácidos especializados llamados opinas. Estos son una fuente de energía, específica para *A. tumefaciens*, pero no para otros organismos ⁸⁴. El análisis genético de diferentes

plásmidos Ti (inductor de tumores) demostró la existencia de dos elementos indispensables para la transferencia e integración de ADN-T en el genoma de plantas infectadas: la región *vir* y las secuencias bordes del ADN-T ⁸⁵.

Los plásmidos Ti silvestres de *Agrobacterium* son capaces de transferir genes a las células vegetales que codifican la biosíntesis de hormonas. Sin embargo, las células que sintetizan altos niveles de auxinas y citoquininas no regeneran plantas completas ⁸⁶. Esto ha llevado al desarrollo de plásmidos Ti desarmados en los cuales los genes para la biosíntesis de fitohormonas son reemplazados en el ADN-T por otros genes de interés. Como resultado, las células de plantas transformadas tienen morfogénesis normal y es posible regenerar plantas completas a través de cultivo de tejidos. *Agrobacterium* tiene la capacidad de insertar una sola copia o pocas en comparación con el bombardeo de partículas, otro método utilizado con frecuencia para la transformación de plantas. La ventaja es que con solo una copia de integración se tiene menor riesgo de inactivar genes esenciales ⁸⁷. La eficiencia de transformación se ve influenciada no sólo por el genotipo de la planta, sino por la cepa de *A. tumefaciens*, el plásmido, los componentes que inducen los genes (*vir*), la composición de los medios (fuente de sucrosa), factores propios del tejido y la temperatura. En algunos casos, una temperatura de 20-22°C permite un evento estable de transformación ⁸⁸.

Las concentraciones muy altas o bajas de *A. tumefaciens* pueden dañar las células de la planta, lo que reduce la frecuencia de transformación. Otro parámetro importante es el tiempo de inoculación y la adición de bactericida en el proceso de selección ⁸⁹.

La inserción de genes de interés mediante la transformación con *Agrobacterium* tiene como finalidad la obtención de plantas con características

específicas, siendo necesario establecer una adecuada estrategia de regeneración *in vitro*. Entre los sistemas de regeneración de plantas más utilizados se encuentran la regeneración vía embriogénesis somática, cultivo de protoplastos y organogénesis. La organogénesis induce la formación de centros meristemáticos, dando lugar a primordios radiculares o caulinares, dependiendo del estímulo de las fitohormonas exógenas y la capacidad del tejido de responder a la presencia de las mismas. Puede ocurrir de manera directa o indirecta, es decir, sin la presencia de la fase callosa previa a la regeneración o con ella, respectivamente ⁹⁰.

La organogénesis indirecta es el sistema de regeneración más utilizado para fines de modificación genética, debido a que la formación de callos permite la selección de células y, posteriormente, la obtención de plantas genéticamente modificadas. Sin embargo, el sistema de regeneración indirecto tiene la desventaja de presentar una mayor tendencia de sufrir variación somaclonal; por este motivo, se recomienda contar con un buen sistema de selección de los regenerantes estables. La organogénesis indirecta se prefiere por razones prácticas de disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad, baja contaminación con microorganismos y rápida respuesta *in vitro* ⁹¹.

1.6.2. Genes marcadores de selección

El proceso de selección depende de una correcta concentración de antibióticos en el medio de cultivo y del contacto entre la superficie del explante y el medio de cultivo. Cuando la concentración de antibióticos no es la apropiada, se pueden producir escapes debido a un cierto grado de resistencia natural en las células vegetales⁹².

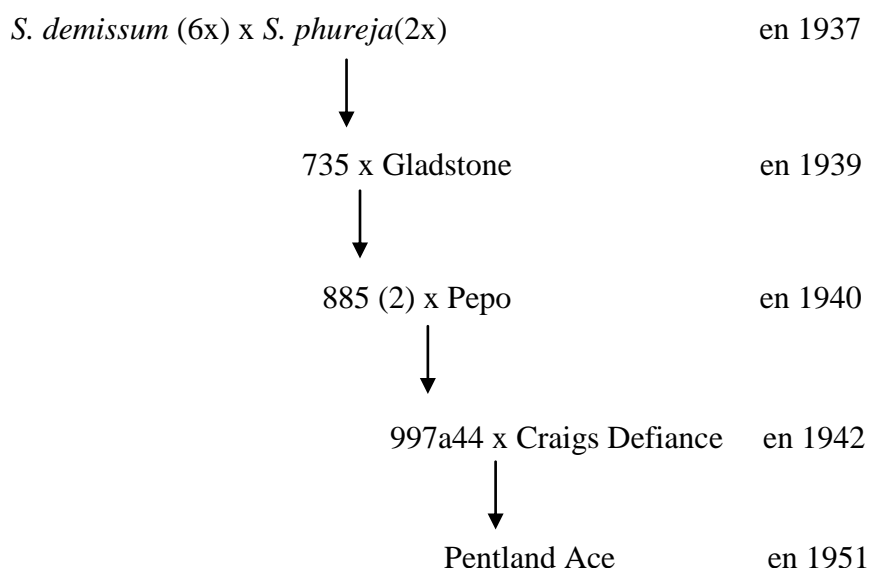
En el caso de la regeneración se suele utilizar el gen *nptII* para permitir una clara selección. Este gen, aislado del transposón procariota Tn5, codifica la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) y confiere resistencia frente a antibióticos aminoglicósidos como kanamicina, gentamicina y neomicina ⁹³. En nuestro caso los dos vectores binarios para transformación genética poseen el gen *nptII*. Este marcador de selección es uno de los más usados actualmente porque ha sido reconocido como inocuo para la salud humana ⁹⁴. La concentración mínima de antibiótico que inhibe la producción de escapes, debidos a cierta resistencia natural al antibiótico presente en el medio, es el utilizado para la preparación de medios de regeneración en transformación genética en plantas.

La proteína codificada por *nptII* es inocua para los humanos; esto se concluyó ya que no se encontró evidencia de alergias o toxicidad a la proteína. Las bacterias resistentes a la kanamicina son comunes en la naturaleza y muchas de estas son consumidas por los humanos cada día, principalmente en verduras frescas. Por lo tanto, el gen *nptII* ha sido usado extensivamente como marcador de selección en proyectos de transformación genética en diferentes organismos ^{95,96}.

1.7 *Solanum tuberosum* var. Pentland Ace

Es una variedad de papa cultivada originaria de Gran Bretaña. Se desarrolló durante la década de 1940 y fue liberada en 1951. Esta variedad produce tubérculos de color amarillo pálido de forma alargada y ovalada. Esta variedad posee el gen *R3a* proveniente de la especie silvestre *Solanum demissum* de México. Tiene una resistencia media a baja a *P. infestans* y al hongo *Fusarium coeruleum* ⁹⁷.

Esta variedad se originó mediante cruces de la siguiente manera:



1.8 Planteamiento del problema

La mejor opción para el control del tizón tardío en papa sigue siendo la mejora genética para desarrollar nuevas variedades con resistencia a *Phytophthora infestans*. La alternativa al largo proceso involucrado en los protocolos de mejoramiento genético tradicional es la transferencia directa de genes vía sistemas de transformación como el mediado por *Agrobacterium tumefaciens*.

Como se mencionó anteriormente, hay dos estrategias de ingeniería genética para incrementar la resistencia a tizón tardío, ambas basadas en la inducción y el desencadenamiento de una respuesta hipersensible (RH): (1) la acumulación de proteínas R, que permite cubrir un amplio espectro de resistencia a razas de *P. infestans* a partir de la suma de resistencias específicas; y (2) la inducción artificial de RH vía un mecanismo único de percepción de *P. infestans* de amplio espectro ⁹⁸. El presente trabajo se enmarca dentro de la última estrategia.

Para aprovechar la RH, se introdujo en la variedad Pentland Ace, que posee el gen de resistencia *R3a*, el alelo dominante del gen *Avr3a* de *Phytophthora infestans*, bajo el control de un promotor inducible por estrés biótico. En este sistema, la

expresión del gen *Avr3a* se debe activar cuando *P. infestans* ataca a la planta, desencadenando así la RH, entre otras vías de defensa. De esta manera se espera obtener un cultivar resistente a cualquier raza de este patógeno.

Agrobacterium tumefaciens es el sistema más usado en la actualidad para lograr la transferencia e integración de nuevos genes al genoma de plantas. En el presente trabajo se construyó un vector de transformación para realizar la introducción en papa del gen *Avr3a* bajo el control del promotor *Gst1*. Al provenir evolutivamente de un organismo distanciado, se utilizó una secuencia del gen *Avr3a* optimizada *in silico* en el Centro Internacional de la Papa (CIP) para que este pueda ser expresado de manera eficiente por esta especie vegetal. Se verificó la presencia del gen en un grupo de transformantes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Southern blot.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

- Obtener líneas transgénicas de la variedad Pentland Ace de *Solanum tuberosum* que posean una versión optimizada del gen *Avr3a*.

2.2 Objetivos específicos:

- Desarrollar una construcción quimérica con el promotor *Gst1* que controle la expresión del gen sintético optimizado *Avr3a*.
- Caracterizar las líneas transgénicas obtenidas mediante la prueba de resistencia a kanamicina, y pruebas moleculares de PCR y Southern blot.

III. MATERIALES

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada (Clonamiento Genético y Transformación Vegetal de Papa) del Centro Internacional de la Papa (CIP, Lima).

3.1 Materiales

3.1.1 Material bacteriano

3.1.1.1 Cepas bacterianas

Se usaron dos tipos de células competentes para la transformación, que se encuentran criopreservadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:

a) Bacterias electrocompetentes de la cepa DH5 α de *Escherichia coli* y de la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

b) Bacterias quimiocompetentes de la cepa DH5 α de *E. coli*.

3.1.1.2 Plásmidos

Se utilizaron fragmentos de ADN de distintos plásmidos que se encuentran en bacterias criopreservadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, todas pertenecientes a la colección de bacterias del Centro Internacional de la Papa. La descripción de los fragmentos se encuentra en la siguiente tabla.

Plásmido	Código CIP	Secuencia a usar	Agente selector
pPCR- Script Amp-Avr3a	-	Gen optimizado <i>Avr3a</i> .	Ampicilina
pBI121	EC054	Terminador del gen de la Nopalina sintasa	Kanamicina
pUC19	EC044	Sitio de clonación múltiple	Ampicilina
pCIP12	EC097	Promotor <i>Gst1</i>	Kanamicina
pBIN20	EC084	Sitio de clonación múltiple	Kanamicina

TABLA 1. Resumen de las secuencias utilizadas en el presente trabajo.

3.1.2 Material vegetal

Se utilizó plántulas de *S. tuberosum* L. var. Pentland Ace de tres semanas de edad (FIGURA 5). Esta variedad pertenece al Banco de Germoplasma *in vitro* del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro Internacional de la Papa (CIP). Está codificada con el número CIP 801041.



FIGURA 5. *S. tuberosum* L var. Pentland Ace

IV. MÉTODOS

Metodología de la construcción del vector pCIP65

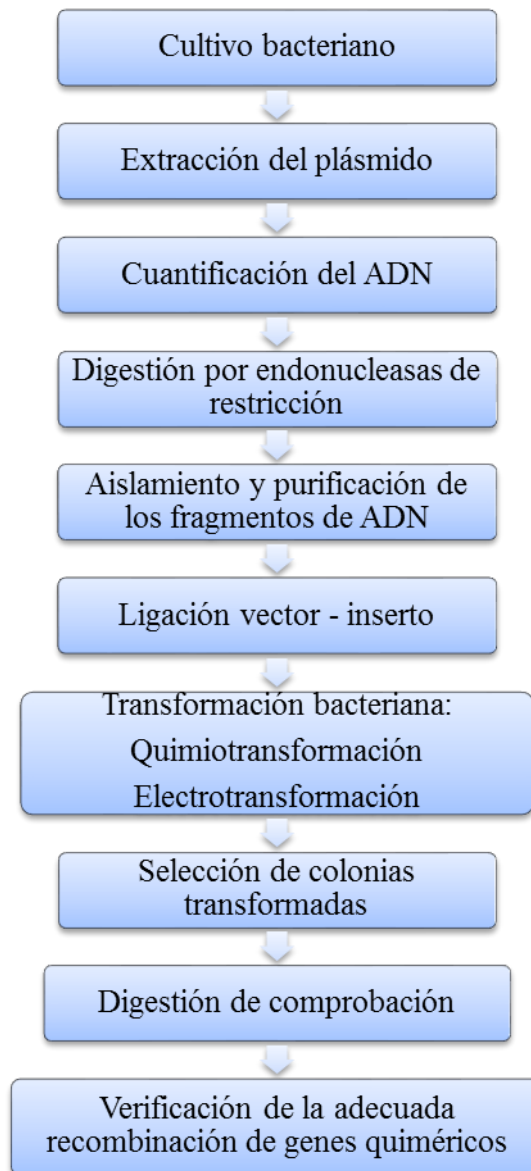


FIGURA 6. Resumen de la metodología utilizada en la construcción del vector de transformación pCIP65.

Metodología de la transformación genética en *S. tuberosum* var.

Pentland Ace con el vector pCIP65

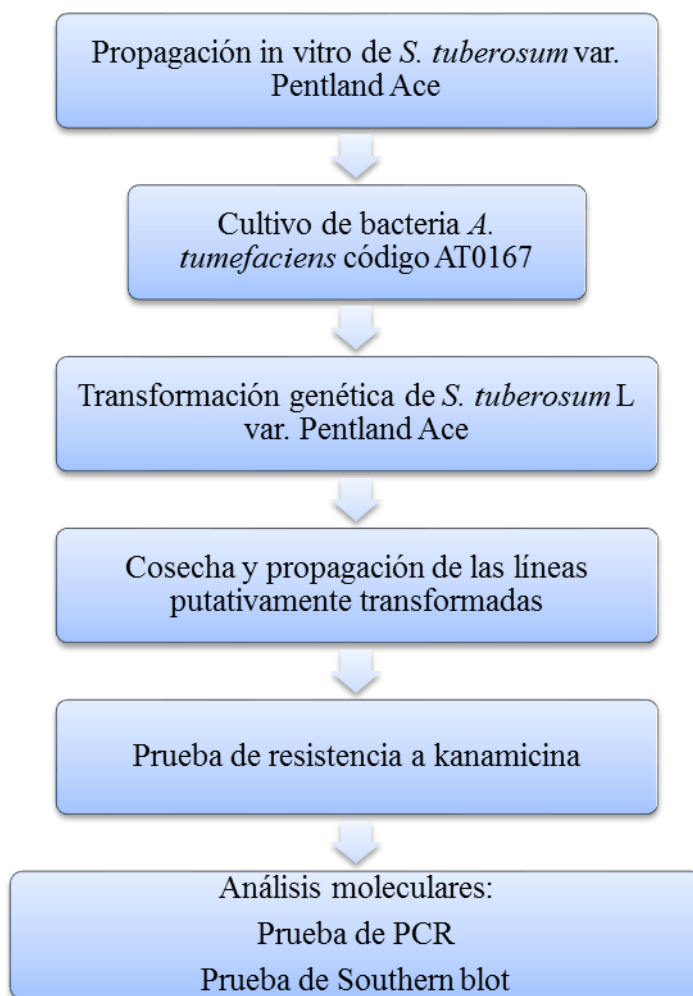


FIGURA 7. Resumen de la metodología utilizada en la transformación genética en *S. tuberosum* var. Pentland Ace con el vector pCIP65.

4.1 Construcción del vector pCIP65

4.1.1 Cultivo bacteriano

En el caso de *E. coli*, las bacterias fueron sembradas en medio Luria Bertani (LB) semisólido y medio LB líquido (Anexo 10.1) con su antibiótico correspondiente para la selección y se mantuvieron por 16 horas en movimiento a 200 rpm; en el caso de *A. tumefaciens*, estas fueron sembradas en medio semisólido y líquido suplementado con 100 mg/L de kanamicina (Sigma, St. Louis, MO), (Anexo 10.2) y cultivadas por 48 horas a 28 °C en movimiento a 200 rpm.

4.1.2 Extracción de plásmido (*E. Coli*)

Se sacaron muestras de bacterias criopreservadas a -70 °C pertenecientes a la colección de bacterias del CIP y se sembraron en placas petri de poliestireno de 100 x 15 mm (American Precision Plastics) con medio LB semisólido (Anexo 10.1) y el antibiótico correspondiente a una concentración de 100 mg/L (Anexo 10.2). Después de 16 horas, se repicó una colonia y se sembró en medio LB líquido (Sigma, St. Louis, MO) con su correspondiente antibiótico. Se dejó incubando en agitación por 16 horas a 37 °C en movimiento 200 rpm.

La extracción se llevó a cabo con el kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI) (Anexo 10.7). Se guardó la muestra a -20 °C hasta su uso.

4.1.3 Extracción de plásmido (*A. tumefaciens*)

Esta extracción se llevó a cabo mediante el protocolo de lisis alcalina del Manual de Protocolos de Biología Molecular del CIP⁹⁹. Se sacaron las muestras

requeridas de bacterias criopreservadas a -70°C pertenecientes a la colección de bacterias del CIP y se sembraron en placas petri de poliestireno de 100 x 15 mm (American Precision Plastics) con medio Yeast Maltose (YM) semisólido suplementado con 100 mg/L de kanamicina (Sigma, St. Louis, MO). Las placas se incubaron por 48 horas a 28°C . Pasado este tiempo se repicó una colonia, se sembró en medio YM líquido igualmente suplementado con kanamicina, y se dejó incubando en agitación por 48 horas a 28°C en movimiento a 200 rpm.

Se pasó el contenido a un microtubo de 2 mL (Eppendorf, Hauppauge, NY) y se centrifugó a 13 200 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante repitiendo este paso hasta eliminar todo el medio. Se suspendió el pellet en 200 μL de la solución P1 (Anexo 10.3) fría y se adicionó también lisozima; se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 200 μL de la solución P2 fresca (Anexo 10.3), se mezcló invirtiendo los microtubos y nuevamente se dejó incubando por 10 minutos a temperatura ambiente; inmediatamente después, se agregaron 30 μL de fenol (Merck, Whitehouse Station, NJ) alcalino (Anexo 10.3) y se mezcló brevemente en el vortex.

Posteriormente se adicionaron 150 μL de la solución P3 o Acetato de sodio (Sigma, St. Louis, MO) 3 M, pH 4.8 (Anexo 10.3), se mezcló por inversión y se dejó a -70°C por 20 minutos para que precipite el ADN. Se centrifugó a 13 200 rpm o a máxima velocidad por 10 minutos y se recolectó la fase superior en otro microtubo de 1.5 mL (Eppendorf, Hauppauge, NY).

Inmediatamente después se le agregaron 400 μL de fenol: cloroformo (Merck, Whitehouse Station, NJ) 1:1, se mezcló por inversión y nuevamente se centrifugó por 10 minutos a 13 200 rpm recolectando la fase superior en otro microtubo de 1.5 mL donde se agregó 1 mL de etanol absoluto (Merck, Whitehouse

Station, NJ) previamente enfriado. Se mezcló manualmente y se dejó a -70°C por 30 minutos.

Pasado este tiempo, se llevó a centrifugar a 13 200 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 μL de etanol al 70%. Nuevamente se centrifugó a 13 200 rpm, pero esta vez por 5 minutos, luego se descartó el sobrenadante. Se liofilizó el pellet por 5 minutos. Finalmente, se resuspendió el pellet en 30 μL de agua DEPC (Sigma, St. Louis, MO) más 5 μL de ARNasa (Sigma, St. Louis, MO). Se incubó 1 hora a 37°C y luego se guardó la muestra a -20°C hasta su uso.

4.1.4 Cuantificación del ADN

Para tal fin, se corrieron las muestras de ADN en un gel de agarosa, el cual se preparó utilizando tampón TBE 1X (Anexo 10.4), agarosa al 1% y gelred 1:4 (Anexo 10.4). Se cargó una mezcla de 1 μL de muestra con 9 μL de colorante de corrida SALB 1X (Anexo 10.4), además de un marcador de pesos y concentraciones conocidas (ADN del fago Lambda digerido con la enzima *Pst*I) (Anexo 10.4).

El gel se sumergió en el mismo tampón TBE 1X dentro de una cámara horizontal y se le aplicó un voltaje de 80-100 V. De acuerdo a la intensidad de las bandas dadas por las muestras y comparadas con las intensidades del patrón, se estimó la cantidad de ADN extraído. Se visualizaron los geles y se les tomó fotos con el transiluminador de UV EpiChemi3 Darkroom.

4.1.5 Digestión por endonucleasas de restricción

Las hidrólisis de las dos cadenas de doble hélice de ADN por las enzimas de restricción se llevaron a cabo durante 2 horas. El volumen final dependió de la concentración de ADN y de si se trataba de una digestión simple o doble, pero generalmente se usó un volumen de 100 μL (ADN 80 μL , 1° enzima 5 μL , 2° enzima 5 μL y tampón 10 μL).

La temperatura y los tampones se utilizaron de acuerdo a las condiciones señaladas por el fabricante de dichas enzimas (Invitrogen, Carlsbad, CA). Con este procedimiento se obtuvieron las secuencias deseadas.

4.1.6 Aislamiento y purificación de los fragmentos de ADN

Para este procedimiento se utilizó el Kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean Up System (Promega, Madison, WI) siguiendo su protocolo, el cual se basa en recuperar muestras de ADN de un gel disuelto de agarosa en presencia de una membrana de sílica y sales caotrópicas como isotiocianato de guanidina. El procedimiento se detalla a continuación:

El fragmento de ADN fue cortado del gel de agarosa y colocado en un microtubo de 1.5 mL (Eppendorf, Hauppauge, NY). Se le adicionaron 10 μL de Membrane Binding Solution por 10 mg de gel disuelto, se mezcló en el vortex y se dejó incubando en un incubador baño seco a 65°C hasta su total disolución.

Se insertó la minicolumna dentro del microtubo colector y se transfirió ahí la mezcla del gel disuelto, dejándose incubar por 1 minuto a temperatura ambiente. Inmediatamente después se agregaron 700 μL de Membrane Wash Solution, se dejó centrifugando por un minuto a 13 200 rpm. Se descartó el flujo del tubo colector, volviéndose a insertar la minicolumna dentro de éste. Se realizó un segundo lavado

con 400 μL de Membrane Wash Solution y se centrifugó por 5 minutos a 13 200 rpm.

Finalmente, se colocó cuidadosamente la minicolumna dentro de un microtubo estéril de 1.5 mL. Se adicionaron 50 μL de agua DEPC y se dejó centrifugando por un minuto a 13 200 rpm. Se descartó la minicolumna, se corrió una fracción de las muestras en un gel de agarosa como se describe en 3.2.4 para una cuantificación adecuada y el resto se guardó a -20°C .

4.1.7 Ligación vector – inserto

Para ligar el vector con el fragmento de ADN deseado, se utilizó la enzima T4 ADN ligasa (Promega, Madison, WI), la cual, en presencia de ATP como cofactor, cataliza la unión de cadenas de ADN de doble hebra en los sitios de restricción, tanto con extremos romos como cohesivos. La mayor probabilidad de ligación ocurre con una relación molar entre el vector plasmídico y el inserto de aproximadamente 1:3.

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

El volumen final de cada ligación fue de 10 μL : vector 1 μL , inserto 7 μL , tampón de ligación 1 μL y T4 ligasa 1 μL . Esta reacción se llevó a cabo a 16°C en baño maría por 4 horas, o toda la noche a 4°C .

4.1.8 Transformación de bacterias

Una vez ligado el vector al fragmento, se procedió a introducir este nuevo plásmido en la bacteria respectiva.

4.1.8.1 Quimiotransformación de bacterias

Un método para transformar bacterias es el choque térmico. Consiste en añadir la reacción de ligación a las bacterias tratadas con CaCl_2 o quimiocompetentes y someterlas a un breve choque térmico. Se siguió el protocolo descrito en el Manual de Protocolos de Biología Molecular del CIP⁹⁹ que se detalla a continuación:

Se mezclaron las células quimiocompetentes de *E. coli* (100 μL) (Anexo 10.6) con la ligación (800 ng en 10 μL) y se incubaron en hielo por 30 minutos. Luego se llevaron a 42°C en baño maría por un minuto, e inmediatamente después se volvieron a colocar en hielo por 2 minutos.

Se adicionaron 400 μL de medio SOC líquido (Anexo 10.1) y se incubó a 37°C por una hora a 250 rpm. Pasado este tiempo, se sembró el contenido del tubo en 2 placas petri de poliestireno de 100 x 15 mm con medio LB semisólido (Anexo 10.1) suplementado con el respectivo antibiótico a una concentración de 100 mg/L por 16 horas para seleccionar las colonias transformadas.

4.1.8.2 Electrotransformación de bacterias

Se utilizó un electroporador *E. coli* pulser (Laboratorio Bio-Rad) siguiendo el Manual de Protocolos de Biología Molecular del CIP⁹⁷, el cual se resume de la siguiente manera: las bacterias electrocompetentes de *A. tumefaciens* EHA105 (40 μL) (Anexo 10.5) y el plásmido (100 ng en 1 μL) fueron colocadas en una cubeta con electrodos laterales (Electroporation cuvette, 0.2 cm gap, USA Scientific). Se introdujo la cubeta en el electroporador para someter a las bacterias a un pulso

eléctrico de alto voltaje (2.5 KV) por 5 ms. Luego se añadió 1 mL de medio SOC líquido (Anexo 10.1) y se transfirió el contenido de la cubeta con una pipeta pasteur a un tubo de 1.5 mL (Fisher Scientific, Hampton, N.H), incubándose por 2 horas a 28°C a 250 rpm. Pasado ese tiempo se sembró el contenido del tubo en 2 placas petri (Polystrene Size 100 x 15mm, American Precision Plastics) con medio LB semisólido (Anexo 10.1), a 28°C, suplementado con 100 mg/L de kanamicina (Sigma, St. Louis, MO), para seleccionar las colonias transformadas.

4.1.9 Selección de colonias transformadas

Las colonias de *E. coli* transformadas fueron sembradas en medio LB líquido (Anexo 10.1) con 100 mg/L del antibiótico correspondiente y mantenidas por 16 horas a 37 °C en agitación a 200 rpm. En el caso de *A. tumefaciens*, el crecimiento fue por 48 horas a 28 °C en agitación a 200 rpm. Luego de esto, se procedió a realizar una extracción de ADN plasmídico según se indicó en la sección 4.1.2.

4.1.10 Digestión de comprobación

Los vectores binarios extraídos se digirieron con enzimas de restricción para obtener fragmentos de tamaños esperados y comprobar que realmente llevaban el gen *Avr3a*. La reacción se llevó a cabo según lo descrito en la sección 4.1.5.

4.1.11 Verificación de la adecuada recombinación de los genes quiméricos

La muestra del vector que contiene la construcción con el gen *Avr3a* (pCIP59) se envió liofilizada a MacroGen para su secuenciación (Seul, Korea). Los

resultados de esta secuencia se analizaron empleando el programa Vector NTI10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las secuencias recibidas de MacroGen (Seul, Korea), fueron alineadas con las predichas *in silico* mediante el programa AlignX (Invitrogen, Carlsbad, CA) con la finalidad de determinar su correcta clonación en los vectores (Anexo 10.10 y 10.11).

4.2 Transformación genética de *S. tuberosum* var. Pentland Ace con el vector pCIP65

4.2.1 Propagación *in vitro* de *S. tuberosum* var. Pentland Ace

La variedad Pentland Ace de *S. tuberosum* fue obtenida del banco de germoplasma del Centro Internacional de la Papa con el código 801041. A cada plántula se le retiró las hojas y un tercio de la parte superior, y fueron colocadas en cajas de plástico o magentas (Phytatray II, SIGMA) conteniendo 100 mL de medio líquido MSA estéril (Anexo 10.8) e incubadas por 3 semanas en agitación suave en cámaras de crecimiento con las siguientes condiciones: 20 a 22°C de temperatura, 16 horas de fotoperíodo, 3 000 lux de intensidad lumínica y 60 a 70 % de humedad relativa.

4.2.2 Cultivo de bacteria *A. tumefaciens*

La bacteria *A. tumefaciens* cepa EHA105 código AT0167 se cultivó en placas petri de poliestireno de 100 x 15 mm con medio LB semisólido (Anexo 10.1) conteniendo el agente selector, el antibiótico kanamicina a 100 mg/L (Sigma, St. Louis, MO). Las placas fueron incubadas a 28 °C por 48 horas.

4.2.3 Transformación genética de *S. tuberosum* L. var. Pentland Ace

Para la transformación genética, se utilizó el método de Medina-Bolívar y Cramer¹⁰⁰ (FIGURA 8). Los explantes (entrenudos) se obtuvieron a partir de plantas propagadas en magentas plásticas (Phytatray II, SIGMA) con 21 a 25 días de cultivo en medio líquido MSA (Anexo 10.8), suplementado con MSA store (Anexo 10.8). Las magentas plásticas se mantuvieron a una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas luz a 3000 lux ($40 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg}$).

Los entrenudos fueron cortados con un bisturí SMIC N°10 y se co-incubaron con la bacteria *A. tumefaciens* cepa EHA105. Esta última lleva el vector pCIP65 y había sido previamente sembrada en placas petri de poliestireno de 100 x 15 mm con medio LB (Anexo 10.1) semisólido conteniendo 100 mg/L del agente selector kanamicina. La co-incubación se llevó a cabo a 28°C por 48 horas. Luego los entrenudos se transfirieron a placas petri de poliestireno de 100 x 15 mm con medio MS (Anexo 10.8), permaneciendo en oscuridad hasta el día siguiente.

Posteriormente, se transfirieron grupos de 10 explantes a placas petri con medio 3.1 para callo (Anexo 10.8), el cual se caracteriza por inducir la formación de callos debido a la presencia de la auxina ácido diclorofenoxiacético (Sigma, St. Louis, MO), con el agente selector kanamicina a una concentración de 100 mg/L y con el bactericida carbenicilina (250 mg/L; Sigma, St. Louis, MO). Los explantes transformados se mantuvieron en este medio por un mes, renovándose éste cada 15 días.

Pasado aproximadamente un mes, cuando se pudo apreciar los callos formados, estos últimos fueron transferidos al medio 3.1 para brotes (Anexo 10.8), también con los correspondientes antibióticos (kanamicina a una concentración de 100 mg/L y carbenicilina a 250 mg/L) y hormonas. Aquí el ácido giberélico a 5 mg/L

(Sigma, St. Louis, MO) juega un rol muy importante en la elongación del brote. De la misma manera, el medio fue cambiado cada 15 días. Después de 6 a 8 semanas, se cosecharon los regenerantes, de aproximadamente 1 cm, que brotaron de los cortes o heridas producidos por el bisturí SMIC N°10.

La eficiencia de regeneración (ER) se calculó dividiendo el número de explantes que regeneraron brotes entre el número total de explantes transformados, multiplicando el resultado por 100; mientras que la eficiencia de transformación (ET) se calculó dividiendo el número de regenerantes que fueron verificados como transgénicos entre el número total de regenerantes obtenidos, multiplicando el resultado por 100.

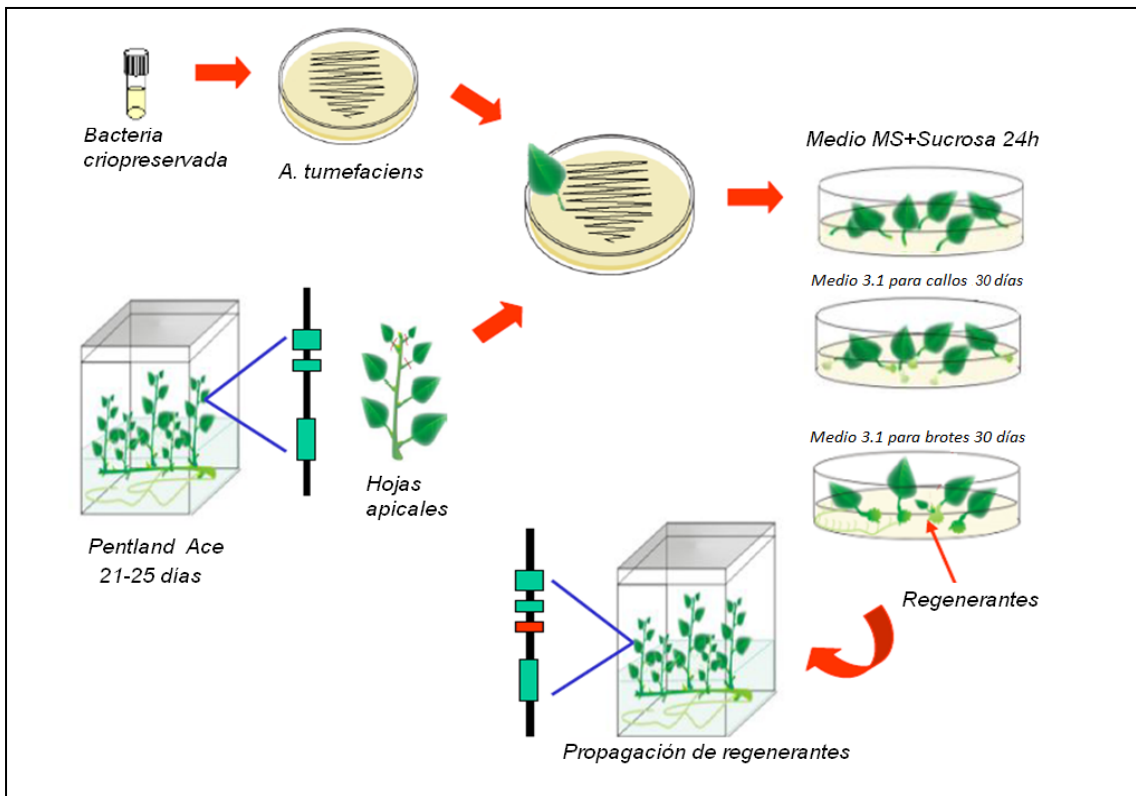


FIGURA 8. Esquema de la Metodología de Transformación Genética utilizada en *Solanum tuberosum* var. Pentland Ace, basado en el método de Medina-Bolívar¹⁰⁰.

4.2.4 Cosecha y propagación de las líneas potencialmente transformadas

Los brotes fueron cortados y transferidos a tubos de vidrio de 18 x 150 mm, conteniendo 5 mL del medio MSA (Anexo 10.8) semisólido suplementado con 250 mg/L de carbenicilina (Sigma, St. Louis, MO). Se incubó bajo las condiciones de propagación antes descritas por un periodo de 1 mes, con cambios periódicos de medio cada 30 días, con la finalidad de eliminar las bacterias de *Agrobacterium tumefaciens* que hubiesen podido sobrevivir.

Luego de 3 semanas se multiplicó nuevamente el material con la finalidad de evaluar la presencia de los genes *Avr3a* y *nptII*. A cada planta cosechada de cada explante transformado se le considero como línea potencialmente transformada.

4.2.5 Prueba de Resistencia a kanamicina

Esta prueba consiste en evaluar de manera indirecta la expresión del gen *nptII*.

- Se prepararon placas petri de poliestireno de 100 x 15 mm conteniendo el medio 303 semisólido ⁹⁷ estéril (Anexo 10.8), al cual se le adicionó 200 mg/L del antibiótico kanamicina.
- Se cortaron segmentos de hojas del tercio superior de la líneas potencialmente transformadas y no transformadas, estas últimas para usarlas como control negativo, y, como control positivo, hojas de una planta transformada comprobada que tenía incorporado el gen marcador *nptII*.
- Los segmentos de las hojas fueron colocados de tal manera que el envés estuviera sobre el medio 303 y se los incubó por cuatro semanas a las siguientes condiciones: 20 a 22 °C de temperatura, 16 horas de fotoperíodo, 3 000 lux de intensidad lumínica y 60 a 70 % de humedad relativa.

- Pasadas las cuatro semanas, se evaluó la formación de callo solo en la zona de corte del segmento de la hoja, considerándose la muestra con callo en dicha zona como positiva. De esta manera, se determinó preliminarmente cuáles eran las líneas transformadas según esta prueba.

4.2.6 Análisis moleculares

4.2.6.1 Prueba de PCR

Para identificar y caracterizar las líneas que presentaran el gen *Avr3a* y el gen *nptII*, se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

4.2.6.1.1 Extracción de ADN a pequeña escala

- Se cortaron dos hojas de plántulas de un mes de crecimiento y se las colocó en microtubos de 1.5 mL (Eppendorf, Hauppauge, NY). Se colocó una perlitita de cerámica autoclavada por microtubo y se añadieron 700 μ L de tampón CTAB 2X (Anexo 10.9) y 2 μ L de 2-mercaptoetanol (Merck, Whitehouse Station, NJ).
- Los microtubos se colocaron en un triturador Savant Fast Preps por 20 segundos a una velocidad de 4 m/s.
- Luego se retiraron las muestras del triturador y se las incubó en baño maría a 65°C por 30 minutos, agitando los microtubos cada 10 minutos. Pasado el tiempo, se retiraron los microtubos y se les mantuvo a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Se adicionaron 900 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (Merck, Whitehouse Station, NJ) en una proporción de 24:1 y se mezcló suavemente por inversión. Luego se centrifugó a 14 rpm por 5 minutos.

- Se transfirió el sobrenadante a un microtubo estéril de 1.5 mL (Eppendorf, Hauppauge, NY) usando puntas de boca ancha y se adicionó 0.6 volúmenes de isopropanol frío (Merck, Whitehouse Station, NJ), mezclándolo suavemente y dejándolo incubar a -20°C por 20 minutos para precipitar el ADN. Luego se centrifugó a 14 000 rpm por 20 minutos.
- Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el ADN precipitado mediante inversión de los microtubos sobre papel absorbente por 15 minutos.
- Se lavó el ADN precipitado adicionándole 1 mL de alcohol al 95% y se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos.
- Se descartó el etanol y se procedió nuevamente a secar el ADN precipitado descrito anteriormente. Una vez seco, el ADN se resuspendió en 80 µL de agua DEPC (Anexo 10.4).
- Se adicionó finalmente 1.5 µL de RNasa (Sigma, St. Louis, MO) y se incubó a 37 °C por 1 hora. Se guardó a -20°C hasta su uso.
- Se verificó la calidad del ADN extraído por electroforesis en gel de agarosa. Se cargó 1 µL de las muestras con 9 µL del tampón de carga SALB 1X (Anexo 10.4) y gelred (Anexo 10.4) en un gel de agarosa con tampón TBE al 1% (Anexo 10.4), y se corrió a 70 V por 30 minutos. Se verificó el estado del ADN y se guardó a -20 °C hasta su uso.

Una vez verificada la calidad de ADN, se procedió a realizar las pruebas de PCR.

4.2.6.1.2 Diseño y estandarización de cebadores específicos para el transgén *Avr3a*

Para el diseño de los cebadores se usó el programa vector NTI10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se seleccionó un par de cebadores y las condiciones de amplificación fueron estandarizadas en el termociclador de gradiente Labnet. Se amplificó usando 10 ng de ADN del vector pCIP65 en reacciones a diferentes temperaturas (50°C-60°C) para encontrar la temperatura adecuada de hibridación y optimizar la prueba de reacción en cadena de la polimerasa.

El par de cebadores seleccionado con el programa bioinformático vector NTI10 para amplificar el gen *Avr3a* fue el siguiente:

GEN	CEBADOR	SECUENCIA	TAMAÑO AMPLICON
<i>Avr3a</i>	Sentido	CGCGCGATAATTATCCTAGTTTGCG	529 pb (FIG. 9)
	Antisentido	TCTGAAGAGCGAGCCCCAAA	

TABLA 2. Características del par de cebadores *Avr3a-tnos*.

Para corroborar la presencia del gen *nptII*, se amplificó mediante la prueba de la PCR con el siguiente par de cebadores¹⁰⁰:

GEN	CEBADOR	SECUENCIA	TAMAÑO AMPLICON
<i>nptII</i>	Sentido	ACGATTCCGAAGCCCAACC	597 pb (FIG. 10)
	Antisentido	TCCTGTCATCTCACCTTGCTCC	

TABLA 3. Características del par de cebadores *nptII*.

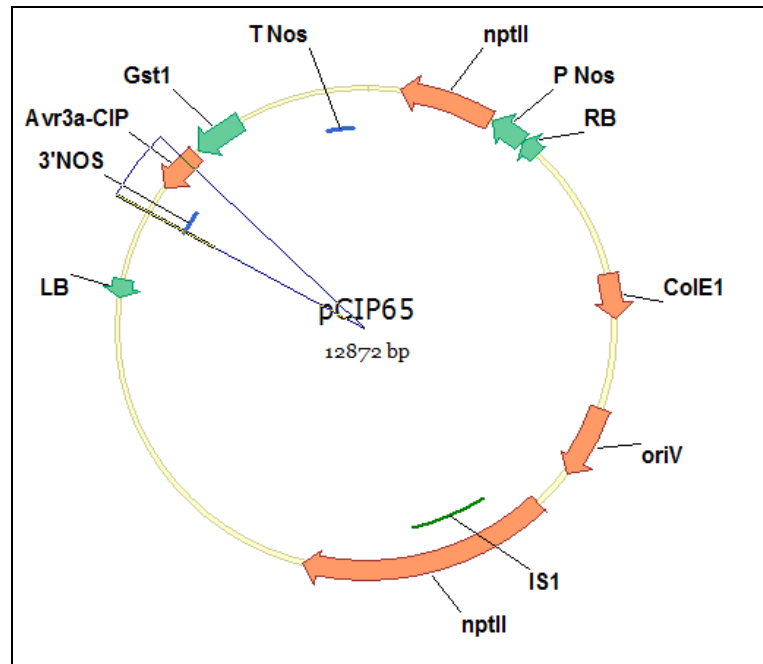


FIGURA 9. Gráfica del amplicón obtenido con los cebadores *Avr3a*. 529 pb.

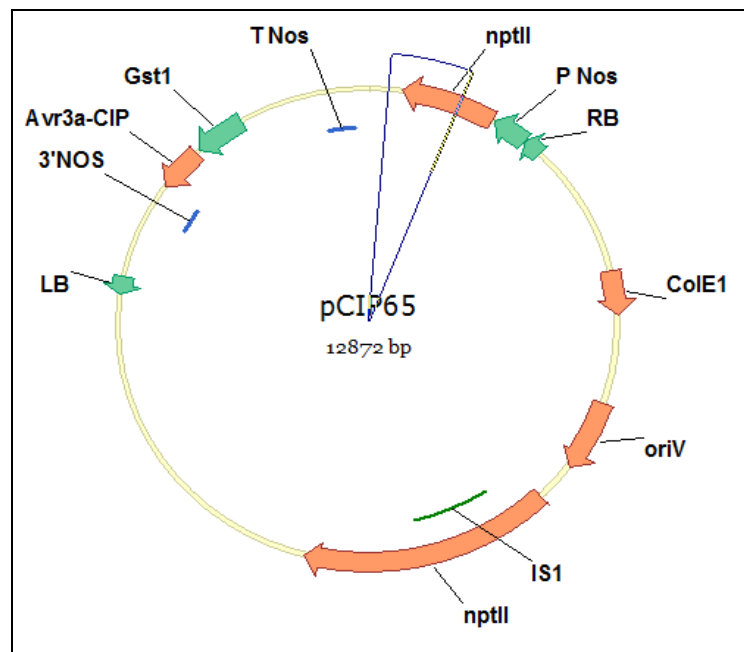


FIGURA 10. Gráfica del amplicón obtenido con los cebadores *nptII*. 597 pb.

4.2.6.1.3 Reacción de PCR

En la siguiente tabla se aprecian los componentes utilizados y sus respectivas concentraciones en un volumen final de 15 μL por reacción.

Componentes	Concentración del Stock	Volumen (μL)	Concentración final
Agua		10.6	
Tampón de PCR 10X*		1.5	1.5 mM
Mezcla dNTPs	10 mM cada uno	0.3	0.2 mM cada uno
Cebador sentido	5 μM	0.75	0.1 μM
Cebador antisentido	5 μM	0.75	0.1 μM
Taq*	5 U/ μL	0.0375	0.0075 U
ADN molde		1	50 ng/15 μL
Volumen final		15	

TABLA 4. Compuestos y concentraciones de la reacción de la PCR. *(NEB, Ipswich, MA)

4.2.6.1.4 Condiciones de amplificación de la PCR

Se usó el termociclador de gradiente Labnet para realizar las amplificaciones de ambas parejas de cebadores (*nptII* y *Avr3a*) bajo las condiciones siguientes:

	Pasos	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	Tiempo en minutos
Denaturación inicial		94	3
35 ciclos	{ denaturación hibridación extensión	94	1
		55	1
		72	1
Extensión final		72	10
		4	α

TABLA 5. Condiciones de la amplificación por PCR.

4.2.6.2 Prueba de Southern blot

Una vez identificadas las líneas transformadas, se analizó el número de copias del inserto del ADN-T, donde se encuentran el gen *Avr3a* y el gen *nptII*, por Southern Blot. Se extrajo ADN genómico a mediana escala de las líneas transformadas, de acuerdo al protocolo de Extracción de ADN vegetal a mediana escala descrito por Ñopo y Ghislain⁹⁹.

Posteriormente, el ADN fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI* (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se utilizó como sonda la secuencia del gen *Avr3a* amplificada con los cebadores *Avr3a* para determinar el número de copias del ADN-T.

4.2.6.2.1 Extracción de ADN vegetal a mediana escala

- Se agregaron 20 mL de tampón de extracción CTAB 2X (Anexo 10.9) y 200 µL de 2-mercaptoetanol (Merck, Whitehouse Station, NJ) a un tubo de 50 mL (Fisher Scientific, Hampton, N.H). Se molió aproximadamente 6 g de tejido vegetal de las líneas transformadas con nitrógeno líquido y se transfirió a los tubos preparados anteriormente.
- Se incubaron los tubos a 65 °C por 20 minutos y luego se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Se agregaron 20 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (Merck, Whitehouse Station, NJ) en una proporción de 24:1 y se mezcló suavemente por inversión durante 5 minutos. Se procedió a centrifugar a 6 000 rpm por 15 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo de 50 mL. Se repitió este paso dos veces.

- Posteriormente, se adicionaron 15 mL de isopropanol frío (Merck, Whitehouse Station, NJ) a cada tubo, mezclándose bien por inversión y dejándolo incubar a -20°C por 1 hora. Pasado este tiempo, se centrifugó a 5 000 rpm por 20 minutos a 4°C.
- Se transfirió el ADN precipitado a un microtubo de 1.5 mL (Eppendorf, Hauppauge, NY) y lavó con 800 µL de la solución de lavado #1 (Anexo 10.9) a temperatura ambiente por 10 minutos. Nuevamente se transfirió el ADN precipitado y se adicionaron 800 µL de la solución de lavado #2 (Anexo 10.9) a temperatura ambiente por un minuto.
- Finalmente, se transfirió por última vez el ADN precipitado a un microtubo 1.5 mL, agregándole 300 µL de agua DEPC (Sigma, St. Louis, MO) y 5 µL de ARNasa (Sigma, St. Louis, MO) para dejarlo incubar a 37 °C por 1 hora.
- Se cargó 1 µL de las muestras con 9 µL del tampón de carga SALB 1X (Anexo 10.4) en un gel de agarosa con tampón TBE al 1% (Anexo 10.4) y se corrió a 70 V por 30 minutos. Se verificó el estado del ADN y se guardó a -20 °C hasta su uso.

4.2.6.2.2 Digestión del ADN vegetal

Después de haber extraído y purificado el ADN de las muestras, se prepararon las digestiones con la enzima *EcoRI* (Invitrogen, Carlsbad, CA), la cual corta una sola vez el vector pCIP65 y no corta el gen *Avr3a* ni el terminador *nos*, secuencias a partir de las cuales se sintetizó la sonda (FIGURA 11).

Componentes	Volumen (μL)	Concentración Final
Agua	X	-
ADN	X	30 μg
Tampón de la enzima 10X	25	1X
Enzima (10 U/ μL)	1	10 U
Volumen total	250	

TABLA 6. Componentes y concentraciones utilizados en la digestión con la enzima *EcoRI*.

Las digestiones se incubaron a 37 °C por toda la noche. Se corrió una alícuota de 1 μL en un gel de agarosa al 1% con tampón TBE 1X (Anexo 10.4) para verificar la digestión total de la muestra. Se precipitó el ADN digerido en cada tubo adicionando 1/10 de volumen de Acetato de sodio 3 M (Anexo 10.3) y 2.5 volúmenes de etanol al 95%. Se incubó a -20 °C por 30 minutos y luego se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el ADN precipitado.

Al final se resuspendió en 80 μL de agua DEPC (Sigma, St. Louis, MO). Se guardó a -20°C hasta su uso.

4.2.6.2.3 Preparación de la sonda

La sonda fue sintetizada usando el kit de Roche PCR DIG Probe Synthesis (Roche, Madison, WI). Se utilizaron los cebadores *Avr3a* y el vector pCIP65 como ADN molde.

4.2.6.2.3.1 Reacción de PCR

En la siguiente tabla se aprecia los componentes y las concentraciones utilizadas en un volumen final de 15 μL por reacción.

Componentes	Sonda+DIG (μL)	Control negativo no marcado (μL)
Agua	14.75	14.75
Tampón de PCR	2.5	2.5
DIG PCR	1.25	-
Stock dNTPS	-	1.25
Cebador sentido (10 μM)	2.5	2.5
Cebador antisentido (10 μM)	2.5	2.5
Taq	0.5	0.5
ADN	1	1
Volumen total	25	25

TABLA 7. Compuestos y concentraciones de la reacción de la PCR.

4.2.6.2.3.2 Condiciones de amplificación de la PCR:

	Pasos	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	Tiempo en minutos
Denaturación inicial		95	5
35 ciclos	{ denaturación	95	0.5
	{ hibridación	55	0.5
	{ extensión	72	1
Extensión final		72	5
		4	α

TABLA 8. Condiciones de la amplificación de PCR.

Se comprobó el marcaje de la sonda con Digoxigenina (DIG) mediante una corrida electroforética de 1 μL de los productos de amplificación con y sin DIG.

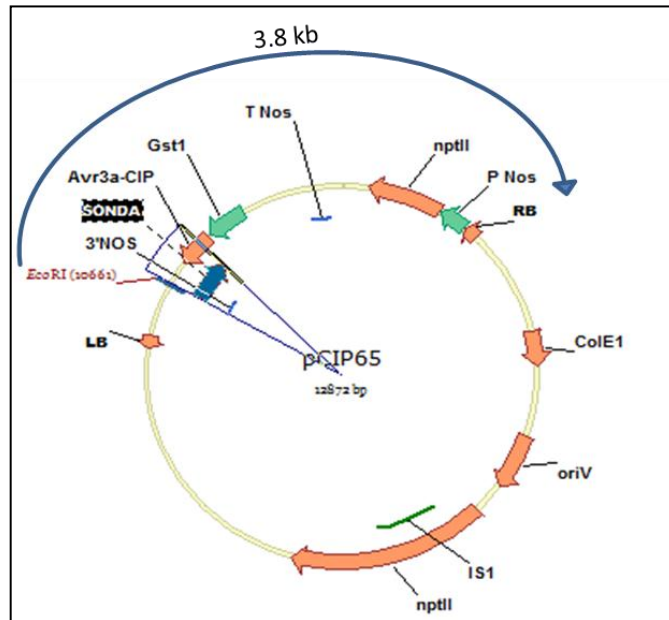


FIGURA 11. Mapa físico del vector pCIP65 mostrando la sonda y el sitio de restricción *EcoRI* utilizados en las prueba de Southern blot. Asimismo, se muestra el tamaño desde el sitio de restricción *EcoRI* hasta el borde derecho (RB) del vector con 3.8 kb.

4.2.6.2.4 Corrida electroforética del gel

- Se cargaron las muestras que contienen aproximadamente 20 μg de ADN con 8 μL de tampón de carga SALB10X con gelred 1:4 (Anexo 10.4) en un gel de agarosa al 0.8% con tampón TBE 1X (Anexo 10.4) preparado con un peine de dientes gruesos.
- Se dejó correr toda la noche a 20 V y luego se verificó en el transiluminador UV EpiChemi3 Darkroom que se hubiesen separado adecuadamente los fragmentos.

4.2.6.2.5 Transferencia del ADN

- Verificada la separación de los fragmentos de ADN, se colocó el gel con mucho cuidado en un contenedor con 300 mL de HCl 0.25N (Anexo 10.9) sobre un agitador horizontal con movimientos suaves por 15 minutos.

- Se retiró el HCl 0.25N (Anexo 10.9) y se lavó cuidadosamente el gel con agua destilada.
- Se colocó el gel sobre el contenedor con 300 mL de solución de denaturación (Anexo 10.9) y se mantuvo en movimiento suave en el agitador horizontal por 15 minutos. Este paso se repitió dos veces.
- Se retiró la solución previa y se colocó 100 mL del tampón de neutralización (Anexo 10.9) y se mantuvo en movimiento suave en el agitador horizontal por 15 minutos. Este paso se repitió igualmente dos veces.
- Se cortó un pedazo de membrana de nylon y dos pedazos de papel filtro grueso Whatman 3MM del mismo tamaño del gel.
- Se remojó la membrana de nylon y las papeles filtros gruesos Whatman 3MM en solución SSC 5X (Anexo 10.9).
- Se montó el sistema de transferencia (FIGURA 12) y se dejó la transferencia del ADN toda la noche.
- Al día siguiente, se marcó con lápiz los pocillos del gel sobre la membrana nylon para saber la posición de las muestras de ADN. Se retiró con pinzas la membrana con la cara del ADN hacia arriba y se dejó secar a temperatura ambiente sobre papel absorbente por 20 minutos.
- Para fijar el ADN a la membrana, ésta fue expuesta a rayos UV en el crosslinker por 10 segundos dos veces.

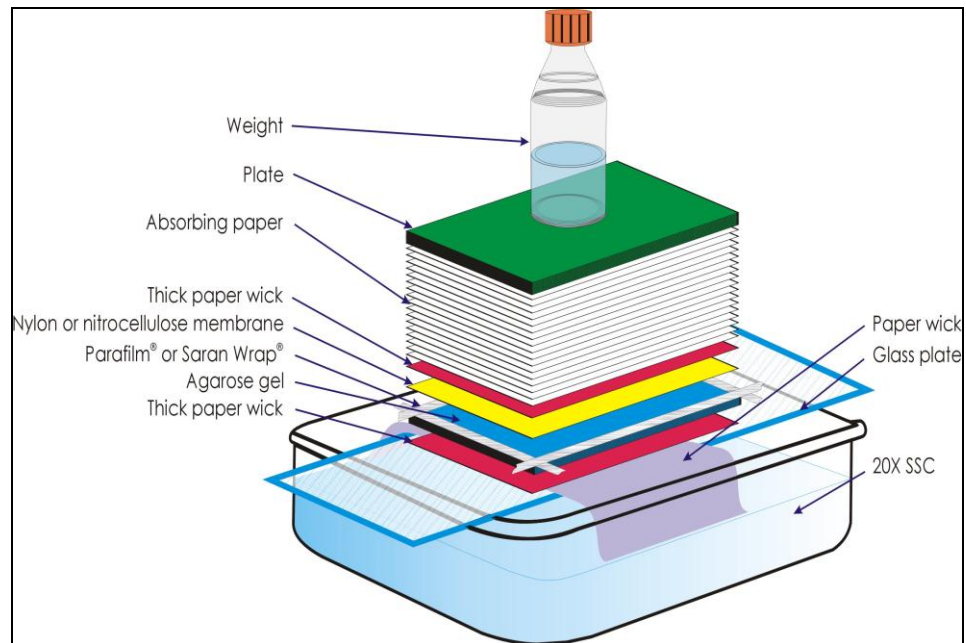


FIGURA 12. Esquema del montaje utilizado en la transferencia de la membrana de Southern blot.

Fuente: ÑOPO, L *et al.* 2005. Applied biotechnology laboratory protocols: Genetic engineering of potato and sweet potato: Production, selection, testing. The International Potato Center,

4.2.6.2.6 Hibridación de la membrana

Se siguió el protocolo del Kit de Detección Luminescente DIG de Roche (Roche, Madison, WI).

- Se precalentó un volumen apropiado de DIG Easy Hyb (kit Roche), aproximadamente 15 mL, en un tubo de hibridación, cubriendo la membrana completamente durante 30 minutos con agitación lenta a 65°C.
- Se denaturó la sonda marcada con DIG* (25 ng/mL de tampón de hibridación) a 95°C en 1 mL de tampón de hibridación durante 5 minutos e inmediatamente después se colocó en hielo durante 5 minutos.
- Se eliminó 1 mL del tampón de hibridación y se agregó en su lugar 1 mL de la sonda denaturada al tubo que contenía la membrana.

- Se incubó con agitación suave toda la noche a 65°C en un horno de hibridación.
- Después de haber incubado la membrana toda la noche, se lavó con soluciones astringentes para eliminar restos de sonda no hibridada. Primero se lavó con la solución de lavado # 1 (Anexo 10.9) dos veces durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Luego se lavó con la solución de lavado # 2 (Anexo 10.9) dos veces durante 15 minutos bajo agitación constante.

4.2.6.2.7 Detección de la sonda

- Después de la hibridación y de los lavados de astringencia, se cubrió completamente con el tampón de lavado (Anexo 10.9) durante 5 minutos.
- Luego se bloqueó la membrana durante 30 minutos con 50 mL de solución de bloqueo 1X (Anexo 10.9) a temperatura ambiente y bajo agitación leve.
- Se centrifugó la solución anticuerpo anti-DIG (Roche, Madison, WI) a máxima velocidad por 5 minutos a 4°C. Se tomó 4 µL y se diluyó en 40 mL de la solución de bloqueo 1X (dilución 1: 10 000). Se dejó reaccionar la membrana con esta solución bajo agitación leve por 30 minutos.
- Se lavó la membrana dos veces por 15 minutos con el tampón de lavado a temperatura ambiente en agitación vigorosa en un agitador horizontal.
- Luego se equilibró el blot de la membrana durante 5 minutos con el tampón de detección (Anexo 7.20). Pasado este tiempo, se retiró el excedente del tampón.
- Se colocó la membrana, con el lado de las muestras de ADN hacia arriba, en una hoja de plástico a manera de folder y se aplicó 4 mL de solución de

CSPD (dilución 1:150 de CSPD en tampón de detección). Se cubrió la membrana con esta solución y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

- Se cubrió la membrana con la otra hoja del folder y se eliminó el exceso del substrato sin dejar burbujas.
- Finalmente, se colocó el folder con la membrana dentro de un casete para autorradiografía (Hypercassette, Amersham) y, en completa oscuridad (cuarto oscuro), se colocó la película (Kodak, Rochester, N.Y) sobre el folder y se dejó reaccionar por 24 horas.

4.2.6.2.8 Revelado

- En el cuarto oscuro se abrió el casete y se retiró la película (Kodak, Rochester, N.Y) cuidadosamente. Luego esta se colocó en la solución de revelado (Kit Kodak) durante 1 minuto y 30 segundos, bajo agitación constante.
- Se lavó la película con agua durante 1 minuto y 30 segundos, bajo agitación constante.
- Se colocó la película en la solución fijadora (Kodak, Rochester, N.Y) durante 1 minuto y 30 segundos, bajo agitación constante.
- Se lavó por última vez la película en agua durante 1 minuto y 30 segundos, bajo agitación constante, y se dejó secar la película para la observación de las bandas.

V. RESULTADOS

La secuencia optimizada del gen *Avr3a* de 381 pb fue sintetizada por la compañía Entelechon (anexo 10.12) y enviada en un vector de clonación pPCRScript Amp con sitios de restricción añadidos como *SacI*, *BamHI*, *XmaI*, *SmaI* y *AvaI* para su fácil manejo (FIGURA 13). El tamaño final de la secuencia fue de 417pb (FIGURA 14).

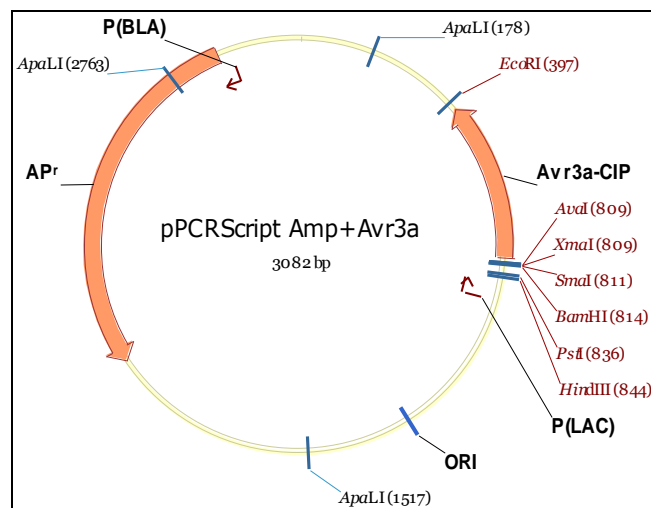


FIGURA 13. Vector Ppcr-Script Amp que contiene el gen optimizado *Avr3a* sintetizado por Entelechon.

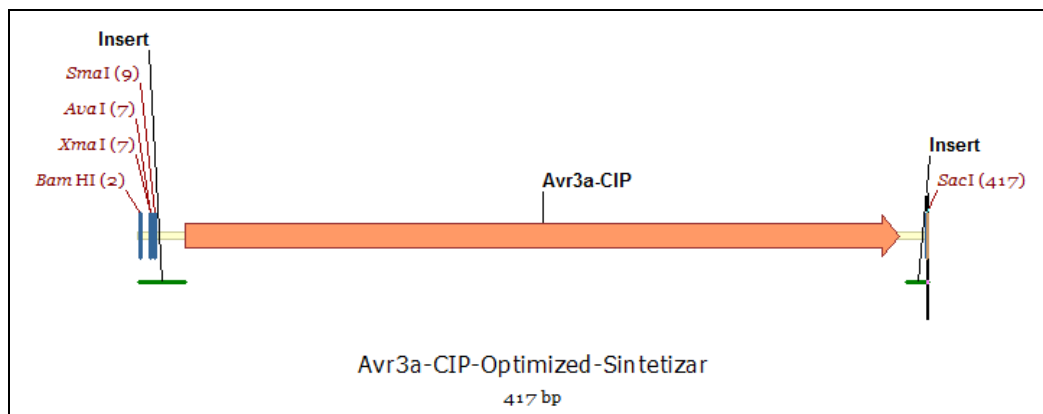


FIGURA 14. Gráfico del gen optimizado *Avr3a* sintetizado por Entelechon, con sus respectivos sitios de restricción.

5.1 Construcción del vector pCIP65

5.1.1 Primer paso:

El vector pPCRScript Amp que contiene el gen *Avr3a* se denominó pPCRScript+*Avr3a*-CIP (Entelechon), se digirió 160 µl de este vector con *Bam*HI y *Sac*I para la extracción y purificación de la banda de 417 pb, que corresponde a la secuencia optimizada del gen *Avr3a* (FIGURA 15).

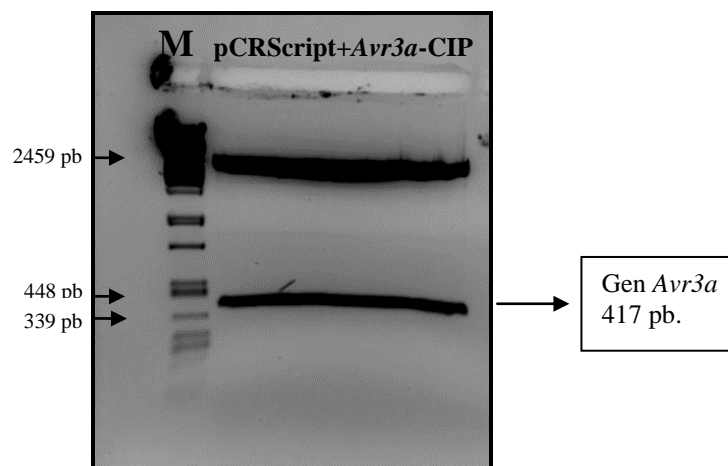


FIGURA 15. Corrida electroforética al 0.8% de agarosa del Vector pPCRScript+*Avr3a*-CIP con el gen optimizado *Avr3a* digerido con *Bam*HI y *Sac*I.

M: Fago Lambda digerido con *Pst*I

Se digirió 160 µl del vector pBI121, código EC054 (FIGURA 16) con *Bam*HI y *Sac*I para extraer el gen *gusA* (FIGURA 17) y ligar en esos mismos sitios de restricción el gen *Avr3a* purificado. El procedimiento permitió extraer y purificar la secuencia del gen *Avr3a* junto con el terminador *nos*, ya que este último, por ser muy pequeño, es difícil de clonar de manera individual.

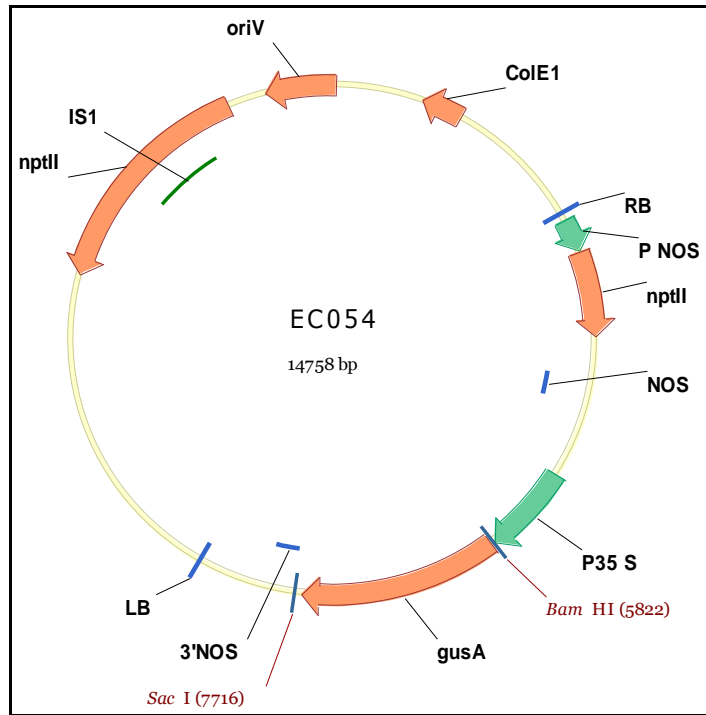


FIGURA 16. Esquema del vector pBI121 (código EC054).

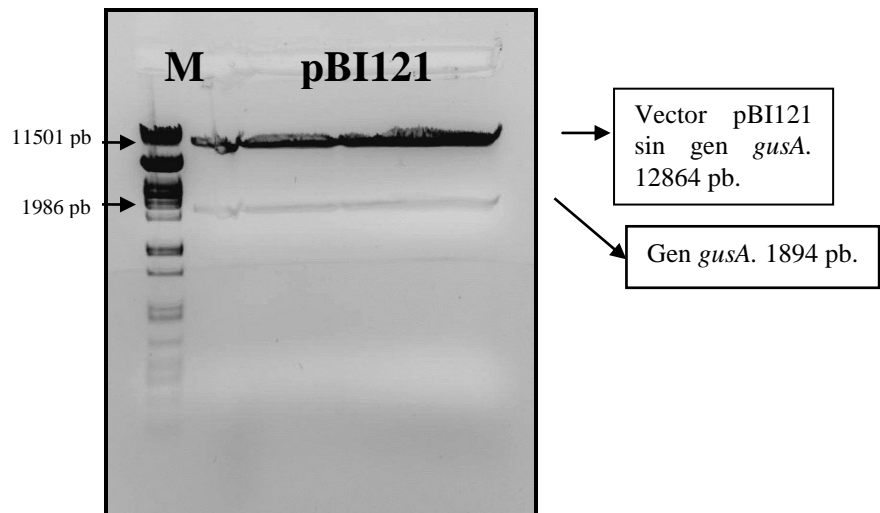


FIGURA 17. Corrida electroforética al 0.8% de agarosa del vector pBI121 digerido con *Bam*HI y *Sac*I
M: Fago Lambda digerido con *Pst*I

Verificación de la calidad de los fragmentos del gen *Avr3a* y del vector pBI121 o EC054 sin el gen *gusA* para su respectiva ligación (FIGURA 18).

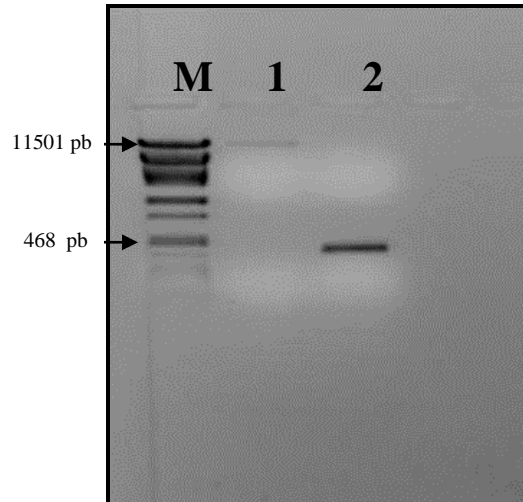


FIGURA 18. Corrida electroforética al 1 % de agarosa
1. Vector pBI121 (EC054) linearizado, digerido con *Bam*HI y *Sac*I (sin el gen *gusA*) 50 ng/ μ L. 12864 pb.
2. Gen *Avr3a* 250 ng/ μ L. 417 pb
M: Fago Lambda digerido con *Pst*I

5.1.2 Segundo paso

Luego de la ligación, se transformó células quimiocompetentes de *E. coli* para obtener el vector EC054+*Avr3a*-CIP (FIGURA 19). Se verificó el inserto en las colonias escogidas mediante digestión con *Eco*RI y *Bam*HI. Finalmente se escogió una colonia, la N° 2. Se le extrajo muestra de ADN plasmídico y se digirió con *Eco*RI y *Bam*HI para extraer el fragmento *Avr3a* - terminador *nos* (FIGURA 20).

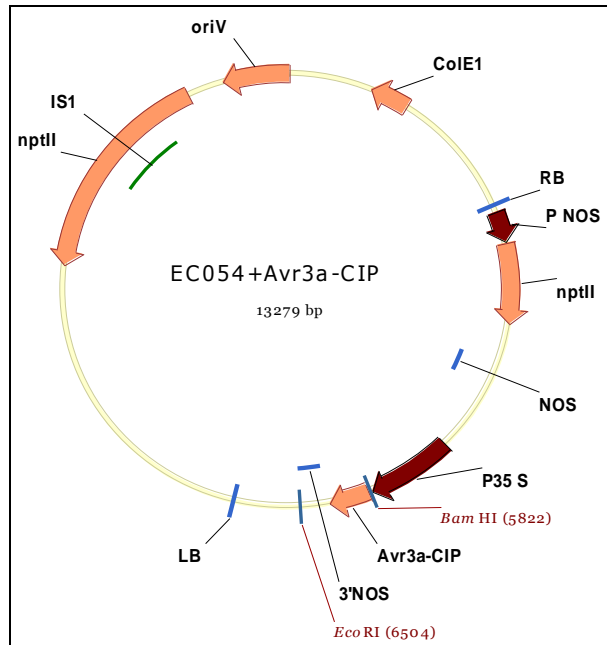


FIGURA 19. Esquema del vector EC054+Avr3a-CIP.

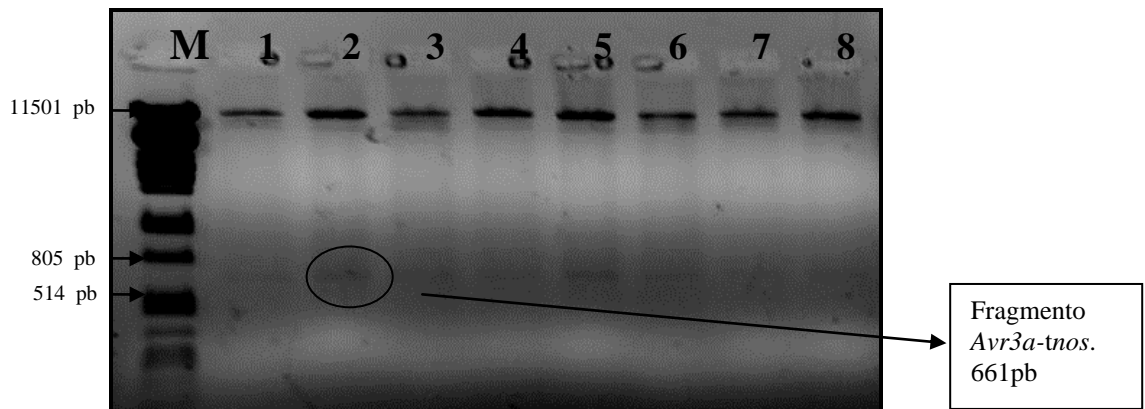


FIGURA 20. Corrida electroforética al 1% de agarosa de ocho colonias que poseen el fragmento *Avr3a-tnos* luego de la digestión con *EcoRI* y *BamHI*.

M: Fago Lambda digerido con *PstI*

El fragmento *Avr3a-terminador nos*, digerida con *EcoRI* y *BamHI*, fue insertada al vector pUC19 (FIGURA 21), el cual fue digerido también con las mismas enzimas. De esta manera se obtuvo el vector pUC19+*Avr3a-tnos* (FIGURA 22).

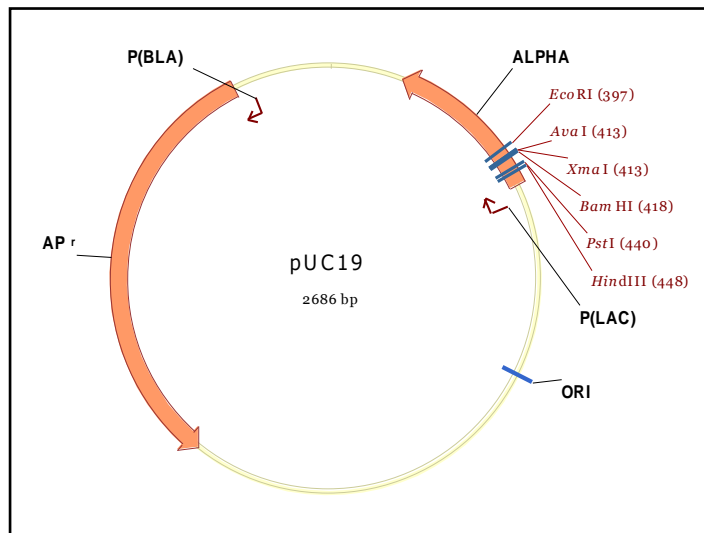


FIGURA 21. Esquema del vector pUC19

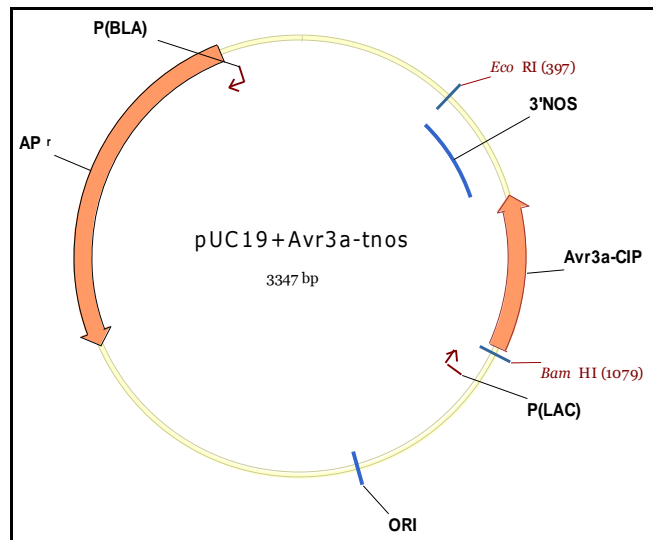


FIGURA 22. Esquema del vector pUC19+ Avr3a-tnos

Verificación de la calidad del fragmento *Avr3a-tnos* y del vector pUC19 para su respectiva ligación (FIGURA 23).

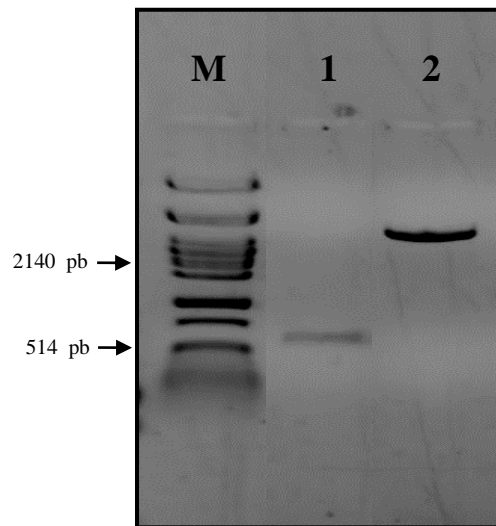


FIGURA 23. Corrida electroforética al 1% de agarosa:
1. Fragmento *Avr3a-tnos* extraído del vector EC054 con *EcoRI* y *BamHI* a 50 ng/μL. 661 pb.
2. Vector pUC19 linearizado, digerido con *EcoRI* y *BamHI* a 250 ng/μL. 2686 pb.
M: Fago Lambda digerido con *PstI*

Una vez ligado el fragmento *Avr3a-terminador nos* al vector pUC19, se procedió a transformar bacterias quimiocompetentes de *E. coli*. Se escogió la colonia N° 8 y se digirió con *EcoRI* y *BamHI* para verificar la inserción del fragmento *Avr3a-tnos* en el vector pUC19 (FIGURA 24).

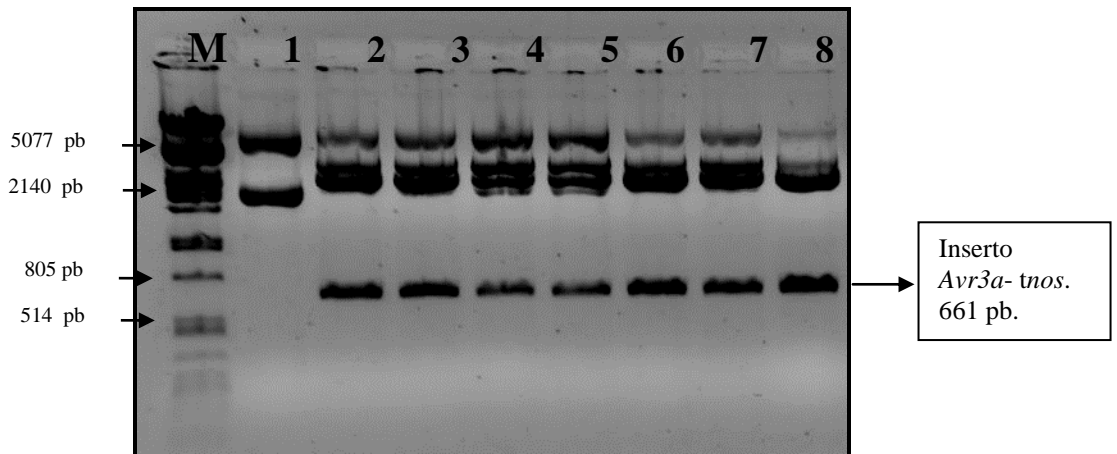


FIGURA 24. Corrida electroforética al 1% de agarosa de ocho colonias luego de la digestión con *EcoRI* y *BamHI*.
M: Fago Lambda digerido con *PstI*

5.1.3 Tercer paso:

Debido a que la secuencia promotora *GstI* es muy pequeña y su clonación problemática, se optó por utilizar el vector pCIP12 (FIGURA 25) como punto de partida para clonarlo. Para ello se digirió el vector con *XmaI* y *EcoRI*, con lo cual se eliminó la secuencia *dhdps-r1:term* (FIGURA 26). Luego, se insertó en su lugar el fragmento *Avr3a-tnos* obtenido de pUC19+*Avr3a-tnos* mediante digestión con *XmaI* y *EcoRI* (FIGURA 27). De este modo se generó la construcción: *GstI-Avr3a-tnos* en el vector pCIP12 (FIGURA 28).

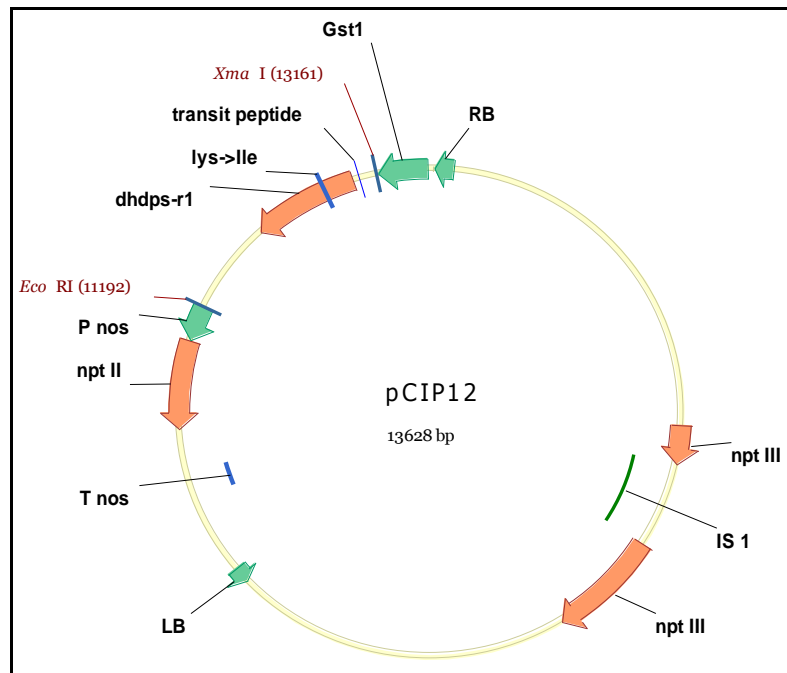


FIGURA 25. Esquema del vector pCIP12

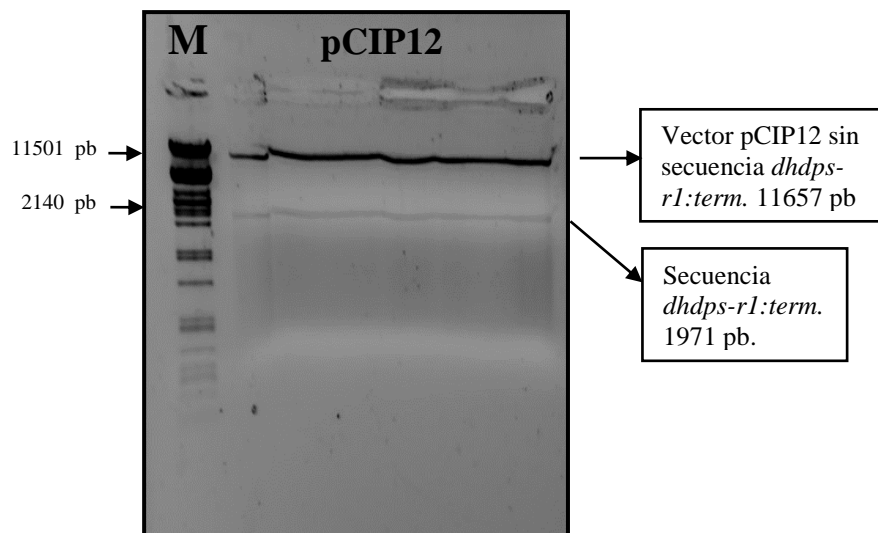


FIGURA 26. Corrida electroforética al 0.8% de agarosa del vector pCIP12 con *Xma*I y *Eco*RI
M: Fago Lambda digerido con *Pst*I

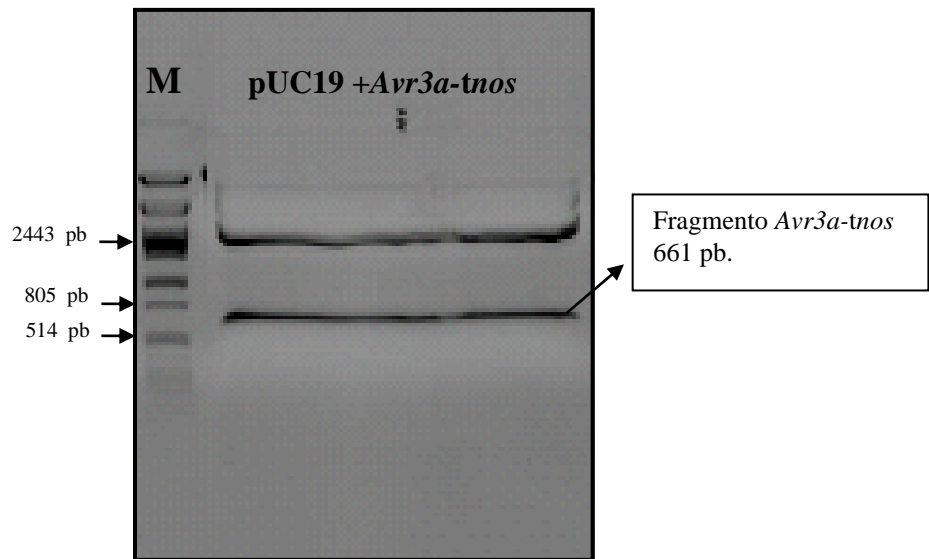


FIGURA 27. Corrida electroforética al 0.8% de agarosa del vector pUC19 +*Avr3a-tnos* con *Xma*I y *Eco*RI
M: Fago Lambda digerido con *Pst*I

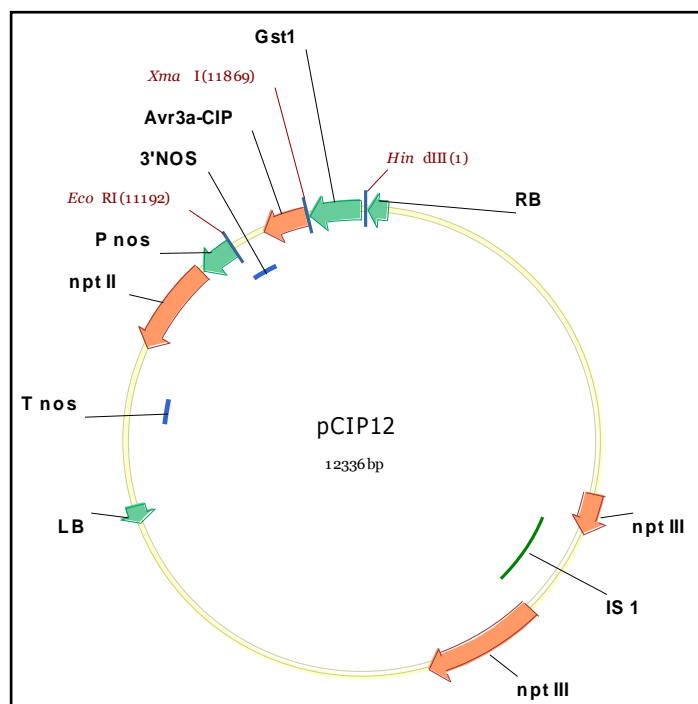


FIGURA 28. Esquema del Vector pCIP12+ *Gst*I-*Avr3a-tnos*

Verificación de la calidad del vector pCIP12 sin secuencia *dhdps-r1:term* y el fragmento *Avr3a-tnos* para su respectiva ligación (FIGURA 29).

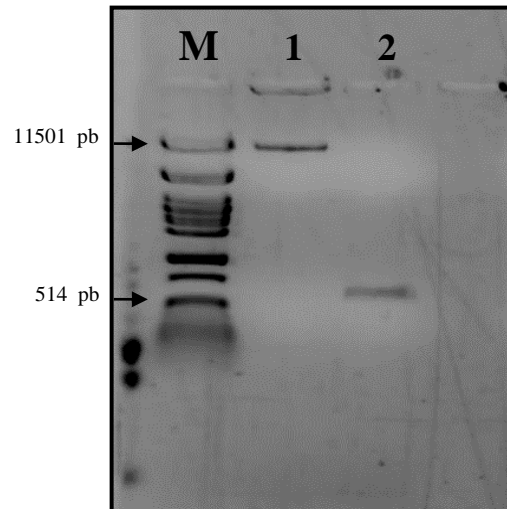


FIGURA 29. Corrida electroforética al 1% de agarosa:
1. Vector pCIP12 linearizado sin secuencia *dhdps-r1:term*. a 100 ng/μL. 11657 pb.
2. Fragmento *Avr3a-tnos* a 70 ng/μL. 661 pb
M: Fago Lambda digerido con *Pst*I

Después de la ligación, se transformó células quimiocompetentes de *E. coli* y se repicaron siete colonias; solo se obtuvieron tres colonias transformadas y se escogió la colonia N° 5 (FIGURA 30). Luego de digerir con *Hind*III y *Eco*RI, el tamaño esperado del fragmento es 1146 pb, el cual contiene la secuencia de la construcción quimérica *Gst*I-*Avr3a-tnos*.

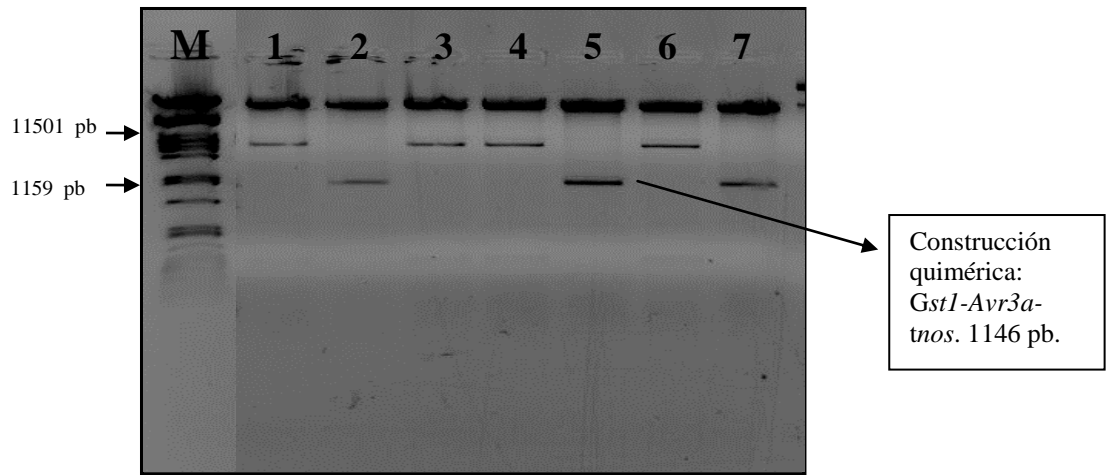


FIGURA 30. Corrida electroforética de siete colonias digeridas con *HindIII* y *EcoRI* para verificar la presencia de la construcción quimérica *GstI-Avr3a-tnos*.
M: Fago Lambda digerido con *PstI*.

5.1.4 Cuarto paso:

El vector que contiene pCIP12+*GstI-Avr3a-tnos* (de la colonia N° 5 del paso anterior) se digirió con *EcoRI* y *HindIII* para obtener la construcción quimérica *GstI-Avr3a-tnos* (FIGURA 31). Esta se insertó en los vectores pBIN20 y pUC19 con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*, y originó las construcciones: pUC19/*GstI-Avr3a-tnos* (código pCIP59) y pBIN20/*GstI-Avr3a-tnos* (código pCIP65)

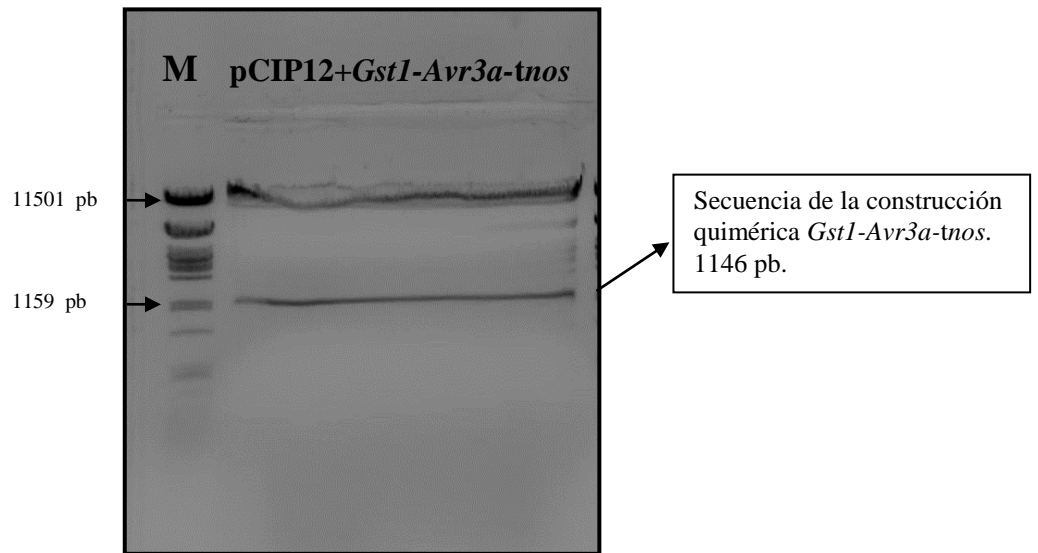


FIGURA 31. Corrida electroforética al 0.8% de agarosa del vector pCIP12+*GstI-Avr3a-tnos* digerido con con *EcoRI* y *HindIII*. M: Fago Lambda digerido con *PstI*

Verificación de la calidad del vector pUC19 y de la construcción quimérica *GstI-Avr3a-tnos* para su respectiva ligación (FIGURA 32).

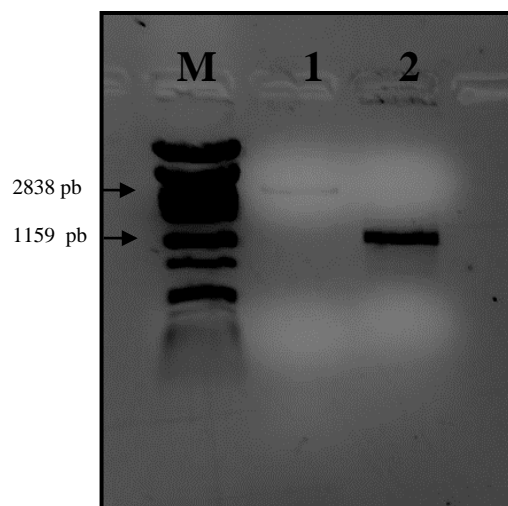


FIGURA 32. Corrida electroforética al 1% de agarosa:
 1. Vector pUC19 linearizado a 20 ng/μL. 2686 pb.
 2. Construcción quimérica: *GstI-Avr3a-tnos* a 140 ng/μL. 1146 pb.
 M: Fago Lambda digerido con *PstI*

Terminada la reacción de ligación, se transformó células quimiocompetentes de *E. coli*. Se repicaron siete colonias, se extrajeron los plásmidos y se les digirió con *EcoRI* y *HindIII* para obtener la construcción quimérica *GstI-Avr3a-tnos*. Se escogió la colonia N° 4 (FIGURA 33) la cual poseía el vector pUC19/*GstI-Avr3a-tnos* con código pCIP59 (FIGURA 34).

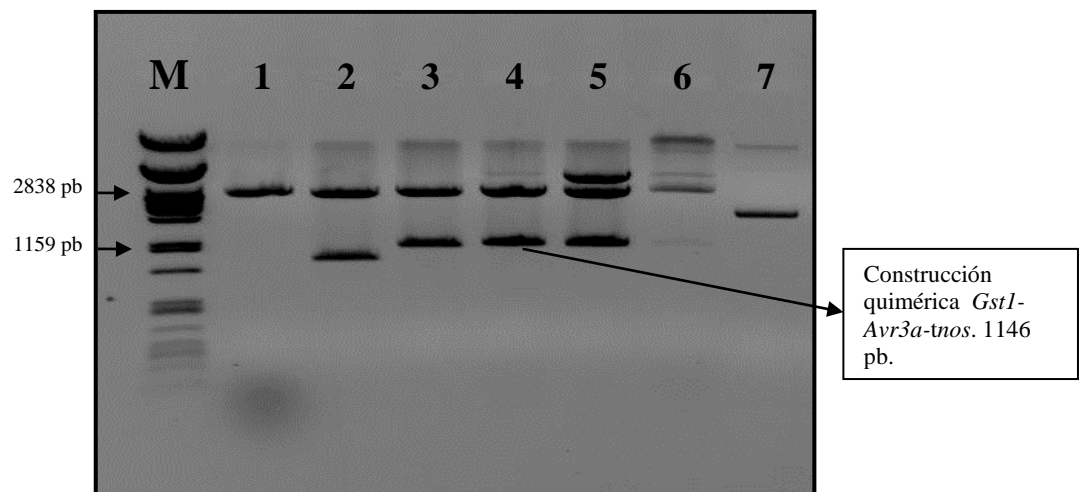


FIGURA 33. Corrida electroforética al 1% de agarosa de siete colonias digeridas con *EcoRI* y *HindIII* para verificar la presencia del constructo quimérico *GstI-Avr3a-tnos*

M: Fago Lambda digerido con *PstI*

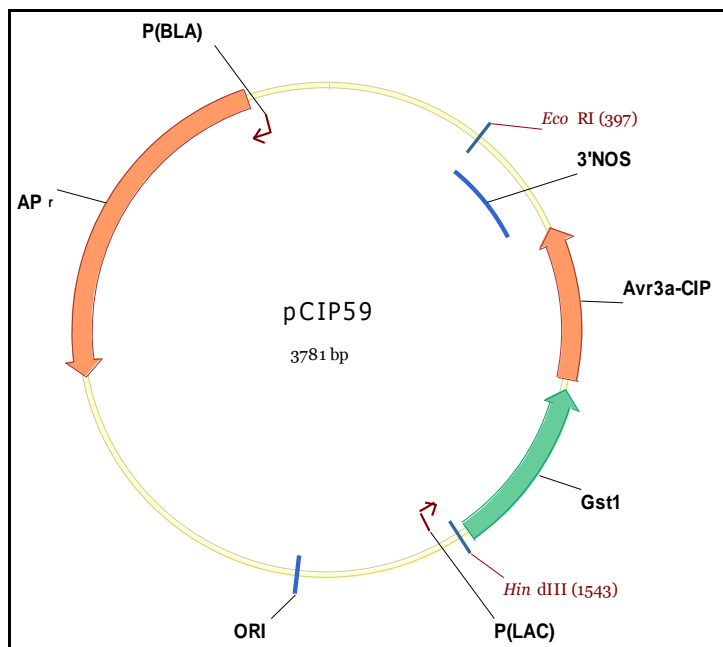


FIGURA 34. Esquema del vector pCIP59

Verificación de la calidad del vector pBIN20 y de la construcción quimérica *Gst1-Avr3a-tnos* para su respectiva ligación (FIGURA 35).

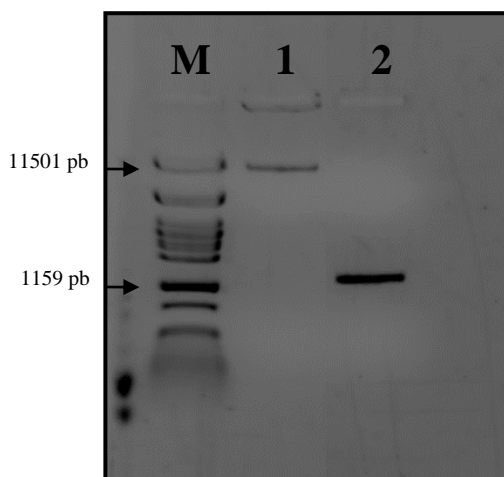


FIGURA 35. Corrida electroforética al 1% de agarosa:
 1. Vector pBIN20 linealizado a 50 ng/μL. 12 040 pb.
 2. Construcción quimérica: *Gst1-Avr3a-tnos* a 140 ng/μL. 1146 pb.
 M: Fago Lambda digerido con *Pst*I

Se transformó en células quimiocompetentes de *E. coli* para obtener el vector pBIN20/*Gst1-Avr3a-tnos* o pCIP65 (FIGURA 36). Se repicaron dieciséis colonias, se extrajeron los plásmidos y se les digirió con *EcoRI* y *HindIII*. Se obtuvo el inserto que contiene la construcción quimérica *Gst1-Avr3a-tnos*, con una longitud de 1146 pb. Se escogió la colonia N° 7 (FIGURA 37).

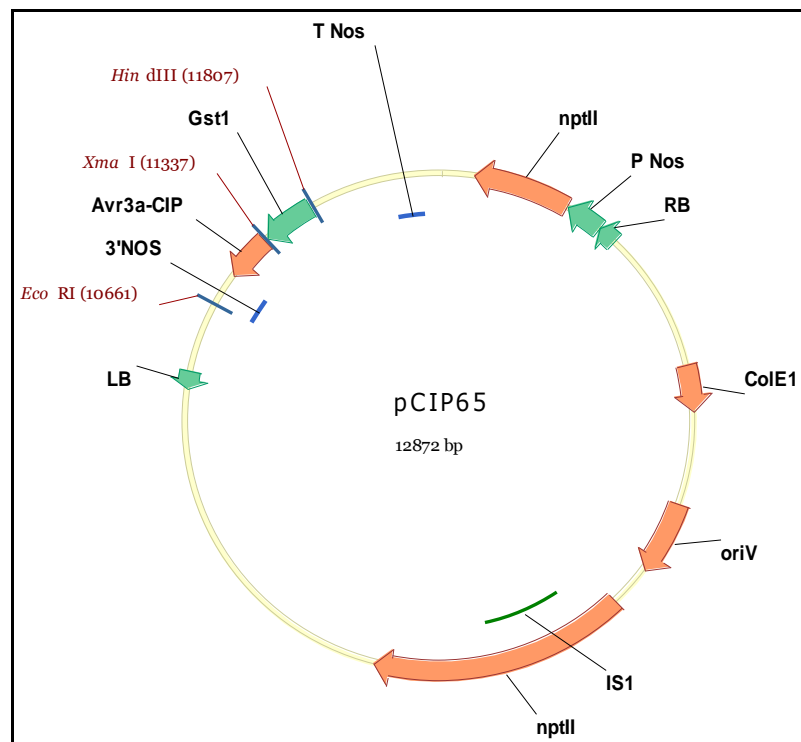


FIGURA 36. Esquema del vector pCIP65.

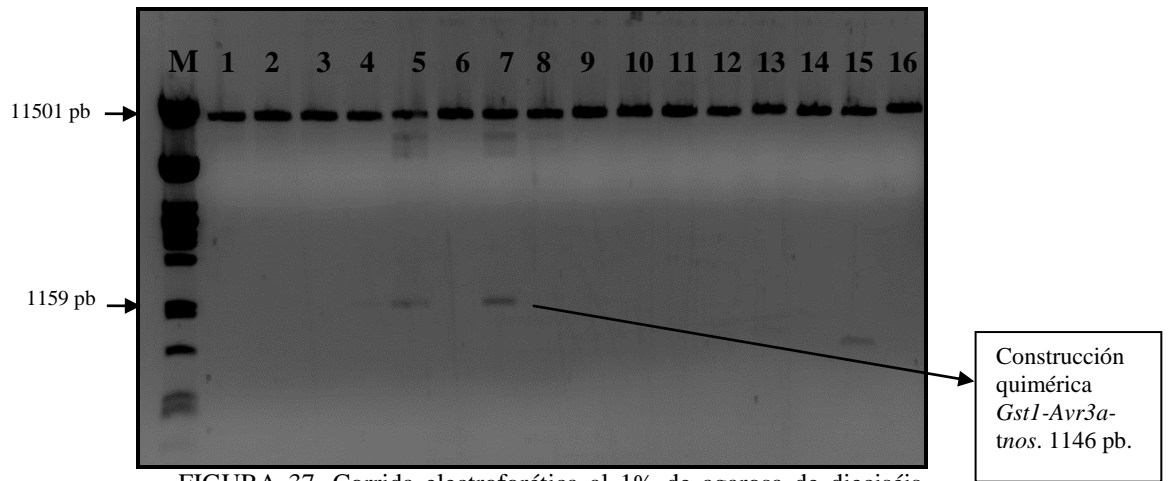


FIGURA 37. Corrida electroforética al 1% de agarosa de dieciséis colonias digeridas con *EcoRI* y *HindIII* para verificar la presencia de la construcción quimérica *GstI-Avr3a-tnos*.
M: Fago Lambda digerido con *PstI*

Se procedió a verificar detalladamente la presencia de la construcción quimérica en el vector pBIN20 (FIGURA 38 y 39).

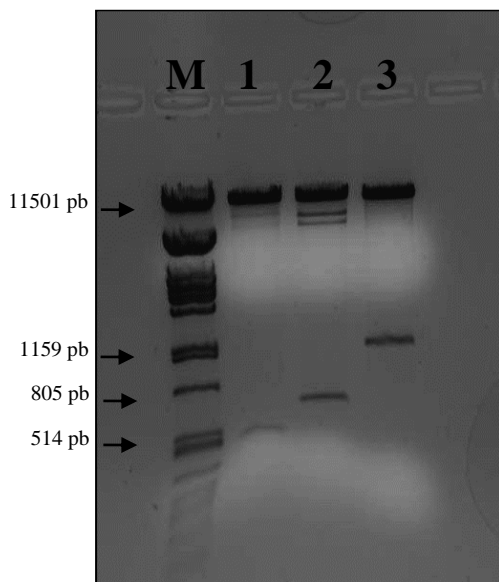


FIGURA 38. Corrida electroforética al 1% de agarosa:
1. *SacI* + *XmaI*. Secuencia *Avr3a*. 417 bp.
2. *EcoRI*+ *XmaI*. Secuencia *Avr3a-tnos*. 678 bp.
3. *HindIII*+ *EcoRI*. Secuencia *GstI-Avr3a-tnos*. 1146 bp.
M: Fago Lambda digerido con *PstI*

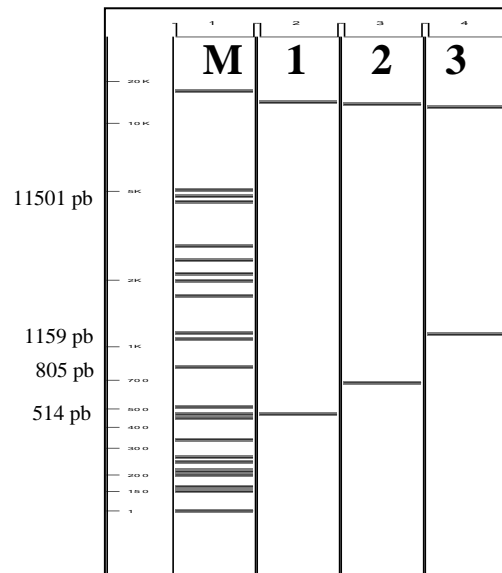


FIGURA 39. Simulación de las digestiones en el programa Vector NTI10.
1. *SacI* + *XmaI*. Secuencia *Avr3a*. 417 bp.
2. *EcoRI*+ *XmaI*. Secuencia *Avr3a-tnos*. 678 bp
HindIII+ *EcoRI*. Secuencia *GstI-Avr3a-tnos*. 1146 bp.
M: Fago Lambda digerido con *PstI*

Se introdujo el vector pCIP65 en células electrocompetentes de *A. tumefaciens*. Se repicaron seis colonias y se digirió con *EcoRI* y *HindIII* para verificar la presencia de la construcción quimérica *GstI-Avr3a-tnos*. Esta reacción arrojó una banda con 1146 pb de longitud. Se escogió la colonia N° 5 (FIGURA 40).

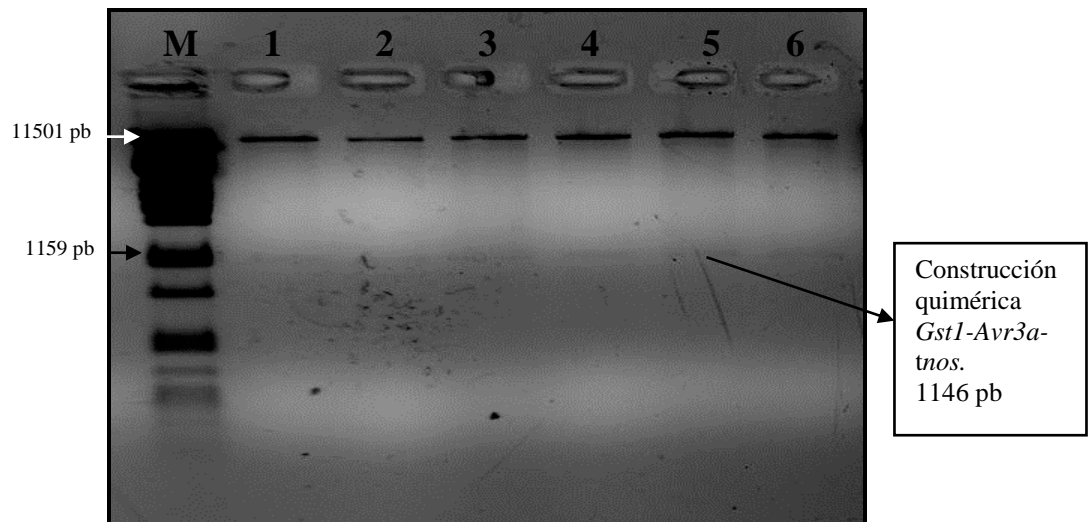


FIGURA 40. Corrida electroforética al 1% de agarosa de seis colonias digeridas con *EcoRI* y *HindIII*.
M: Fago Lambda digerido con *PstI*

Se verificó la presencia específica de la construcción en la colonia elegida de *A. tumefaciens* (FIGURA 41).

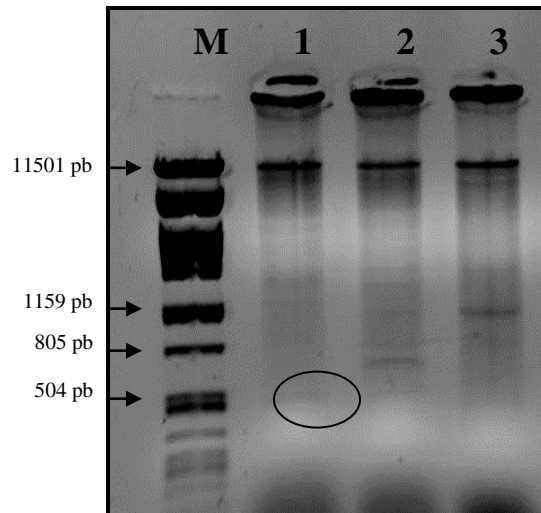


FIGURA 41. Corrida electroforética al 1% de agarosa:
1. *SacI* + *XmaI*. Secuencia *Avr3a*. 417 bp.
2. *EcoRI*+ *XmaI*. Secuencia *Avr3a-tnos*. 678 bp.
3. *HindIII*+ *EcoRI*. Secuencia *GstI-Avr3a-tnos*.
1146 bp.
M: Fago Lambda digerido con *PstI*

5.2 Transformación genética en *S. tuberosum* var. **Pentland Ace** con el vector **pCIP65**

Se transformó 828 explantes, específicamente entrenudos, de la variedad Pentland Ace de *S. tuberosum*. Así mismo se colocó entrenudos sin transformar como control positivo. En la semana N° 4 se observó la formación de los callos en los entrenudos transformados (FIGURA 42) como los controles. Después de la semana N° 6, se apreciaron los primeros regenerantes en los entrenudos transformados y regenerantes de mayor tamaño en los controles (FIGURA 43 y 44), en la semana N° 8 se observaron los regenerantes con mayor tamaño adecuados para ser cosechados (FIGURA 45). Un total de 30 regenerantes posiblemente transformados fueron cosechados. La eficiencia de regeneración fue de $30/828 \times 100 = 3.62\%$.

De estos 30 regenerantes, solo 20 se consideraron como líneas transformadas por pruebas de resistencia a kanamicina y por pruebas de PCR con los cebadores *nptII*. Por lo tanto, la eficiencia de transformación fue $20/828 \times 100 = 2.42\%$

N° de explantes transformados	828
N° de regenerantes cosechados	30
N° de regenerantes positivos para prueba de resistencia a kanamicina	20
N° de regenerantes positivos para prueba de PCR con cebadores para el gen <i>nptII</i>.	20

TABLA 9. Resumen de la transformación genética en la variedad Pentland Ace

Regeneración *in vitro* de *Solanum tuberosum* variedad Pentland Ace.



FIGURA 42. Formación de callo de un entrenudo transformado en la semana N° 4.

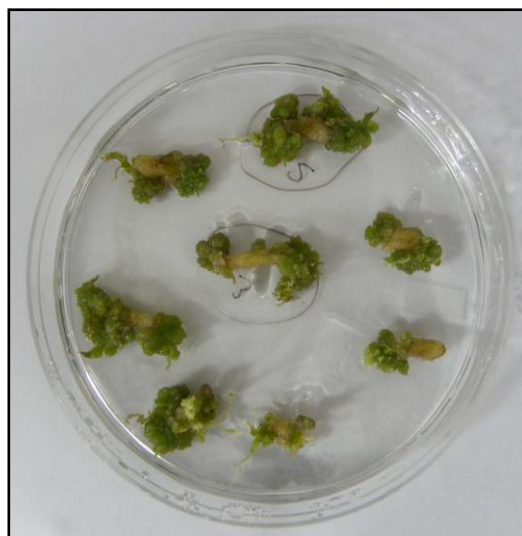


FIGURA 43. Regenerantes de entrenudos transformados en la semana N°6.

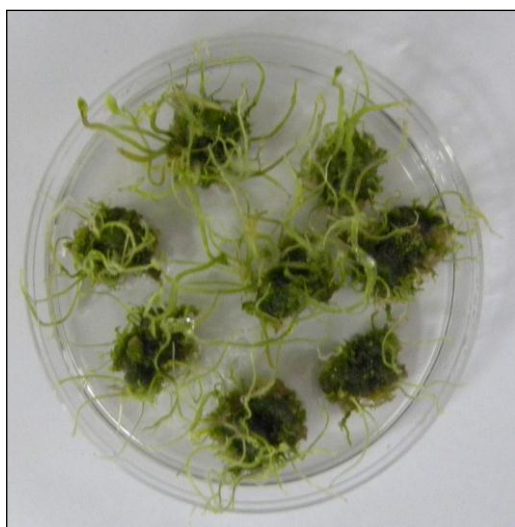


FIGURA 44. Regenerantes de entrenudos sin transformar denominados control positivo en la semana N° 6.



FIGURA 45. Regenerante transformado en la semana N° 8.

5.2.1 Prueba de resistencia a kanamicina

Se evaluaron todos los regenerantes cosechados en el medio 303. De los 30, solo 20 desarrollaron callos en el medio indicado. En presencia del antibiótico, los fragmentos de hojas de las líneas susceptibles se tornaron blancos y murieron al igual que el control negativo, considerándoseles negativas o no transformadas (FIGURA 46).

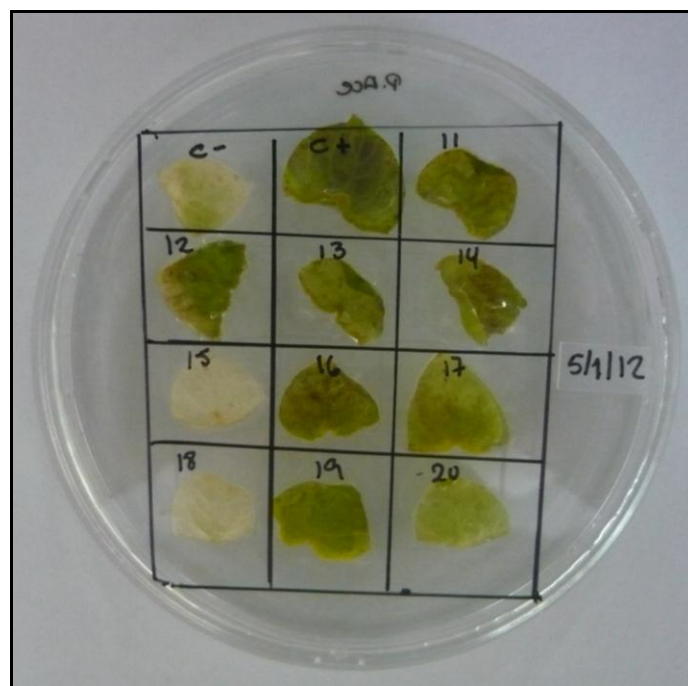


FIGURA 46. Resistencia a kanamicina y formación de callos en hojas transformadas con el vector pCIP65. C+: control positivo, variedad Wik transformada. C- control negativo variedad Pentland Ace sin transformar.

5.2.2 Prueba de reacción en cadena de la polimerasa: PCR

Las 20 líneas positivas según la prueba de resistencia a kanamicina también dieron positivo para la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el par de cebadores del gen *nptII*, algo esperado si tenemos en cuenta que este gen le confiere a los tejidos resistencia contra el antibiótico. La siguiente fotografía (FIGURA 47) muestra los productos de amplificación obtenidos a partir de 9 de las líneas.

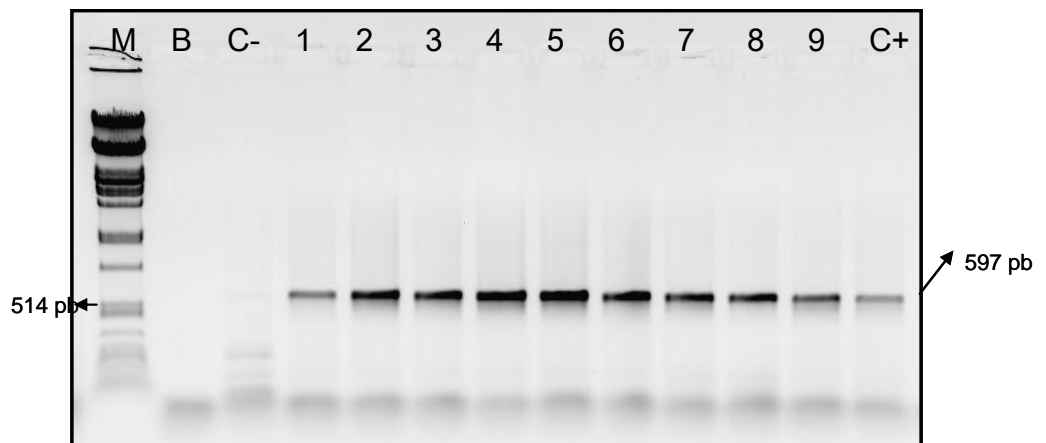


FIGURA 47: Amplificación del gen marcador *nptII* en plantas PCR positivas (1-9). El producto de amplificación tiene un tamaño de 597 pb. B: agua, C-: planta sin transformar, C+: plásmido pCIP65. M: ADN Lambda digerido con *Pst*I.

Para estandarizar la temperatura de hibridación para los pares de cebadores *Avr3a*, se amplificó la secuencia del gen *Avr3a* usando como molde de la reacción 10 ng del vector pCIP65. La amplificación se produjo en las 12 temperaturas probadas y se optó por usar una temperatura de hibridación de 55.5 °C (FIGURA 48).

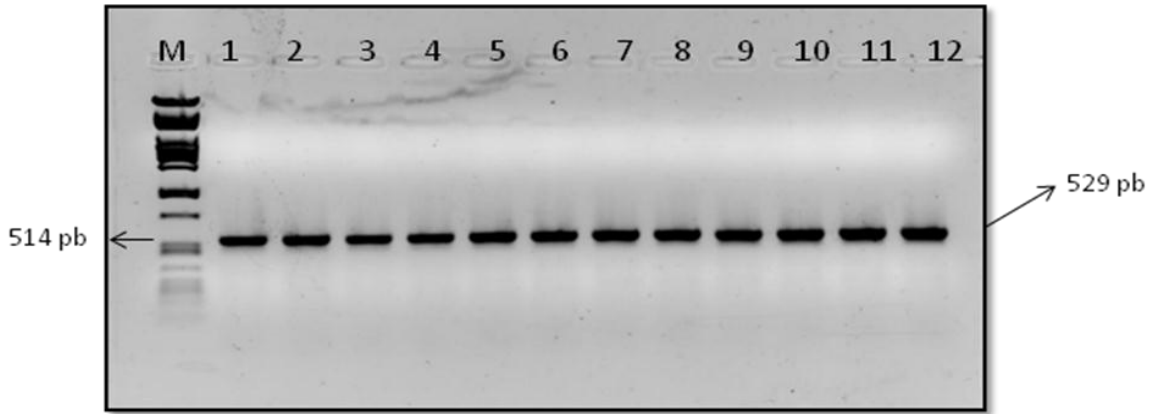


FIGURA 48: Estandarización de los cebadores *Avr3a* a diferentes temperaturas. 1: 50°C, 2: 50.92°C, 3: 51.84°C, 4: 52.76°C, 5: 53.68°C, 6: 54.6°C, 7: 55.5°C, 8: 56.44°C, 9: 57.36°C, 10: 58.28°C, 11: 59.2°C y 12: 60°C.
M: ADN Lambda digerido con *PstI* (10 µL).

Al realizar la amplificación con los pares *Avr3a*, solo 11 de las 20 líneas positivas según la prueba de resistencia a kanamicina, y que fueron positivas también con el par *nptII*, permitieron obtener productos. En la fotografía que se muestra a continuación (FIGURA 49) se puede observar un producto de amplificación del tamaño esperado en 5 de 10 muestras analizadas.

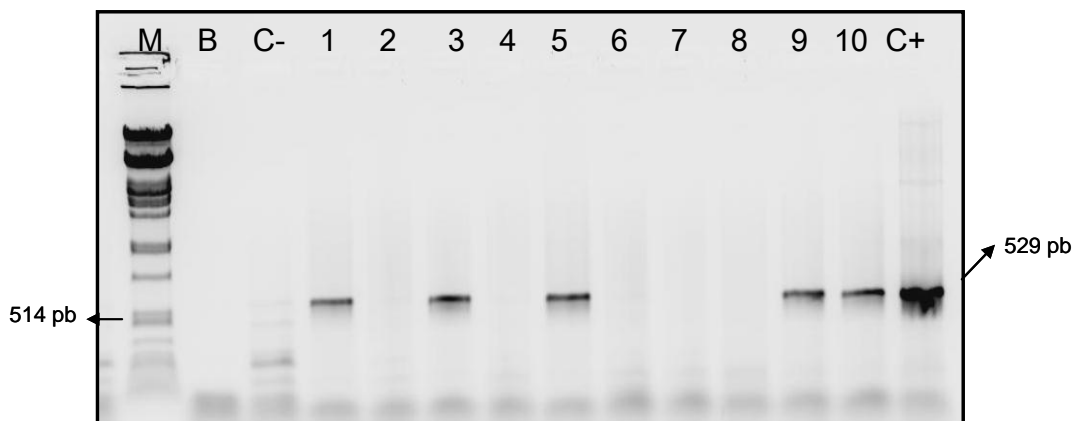


FIGURA 49: Amplificación del transgén *Avr3a* en plantas PCR positivas (1-3-5-9-10). El producto de amplificación tiene un tamaño de 529 pb. B: agua, C-: planta sin transformar, C+: plásmido pCIP65. M: ADN Lambda digerido con *PstI*

5.2.3 Prueba de Southern blot

Se determinó el número de copias insertadas del transgén *Avr3a* en el genoma de la papa mediante la prueba de Southern blot. De las 20 líneas positivas por la prueba de resistencia a kanamicina y por PCR con los cebadores *nptII*, solo 9 dieron al menos una señal, coincidiendo con los resultados de la prueba de PCR con los cebadores *Avr3a*. Se observaron desde 1 hasta 3 copias completas insertadas del transgén. Hubo, sin embargo, 2 muestras con PCR positivo para *Avr3a* que no mostraron inserción alguna por Southern blot (TABLA 10) (FIGURA 50).

Líneas transformadas	Número de copias
P.A [Gst1-Avr3a]1	1
P.A [Gst1-Avr3a]2	2
P.A [Gst1-Avr3a]3	-
P.A [Gst1-Avr3a]4	4*
P.A [Gst1-Avr3a]5	-
P.A [Gst1-Avr3a]6	-
P.A [Gst1-Avr3a]7	-
P.A [Gst1-Avr3a]8	-
P.A [Gst1-Avr3a]9	3
P.A [Gst1-Avr3a]10	-
P.A [Gst1-Avr3a]11	1
P.A [Gst1-Avr3a]12	-
P.A [Gst1-Avr3a]13	3
P.A [Gst1-Avr3a]14	-
P.A [Gst1-Avr3a]15	1
P.A [Gst1-Avr3a]16	-
P.A [Gst1-Avr3a]17	-
P.A [Gst1-Avr3a]18	-
P.A [Gst1-Avr3a]19	1
P.A [Gst1-Avr3a]20	2

TABLA 10. Número de copias de las líneas transformadas con el vector pCIP65. * Solo se insertaron 3 copias completas.

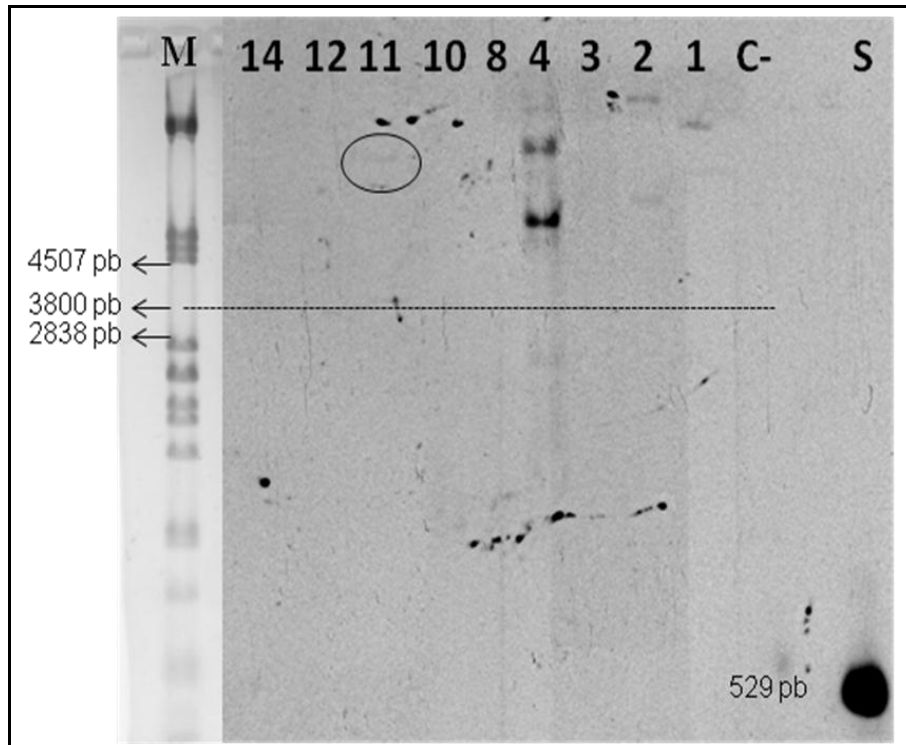


FIGURA 50. Película revelada de la membrana de Southern blot. Se visualizan el número de copias de las líneas transformadas 1, 2, 4 y 11. C-: control negativo, S: Sonda *Avr3a* con un peso de 529 pb. La línea punteada divide la zona superior con un tamaño mayor a 3.8 kb la cual indica que las bandas mayores a 3.8 kb serían copias completas.

VI. DISCUSIÓN

En este trabajo se describe el procedimiento seguido en la obtención de plantas de papa transgénicas a las que se les ha introducido elementos genéticos para la activación de una respuesta de defensa efectiva contra razas distintas de *Phytophthora infestans*, causante del tizón tardío.

En base a la secuencia del gen *Avr3a* optimizada por aproximación manual y seleccionada por tener menos cambios de nucleótidos y mayor porcentaje de C + G, se generó un vector de transformación genética en el que dicho gen se encuentra bajo el control del promotor *Gst1*, este último activado por estrés biótico como *P. infestans*⁷³. El promotor *Gst1* ha sido utilizado para inducir la expresión de genes por contacto con *P. infestans*⁷², *G. pallida*, virus PVY (potato virus Y) y PLRV (potato leaf roll virus)⁷⁴ lo cual se debería a la presencia de elementos regulatorios *cis* como la caja *Gst1* a la que se unen factores de transcripción característicos de la activación de respuestas de defensa de la planta. Por ello se anticipa que plantas de *S. tuberosum* con el vector pCIP65 serán resistentes a cualquier raza de *P. infestans* por activación de la respuesta hipersensible (RH). Este último es un mecanismo natural de defensa de la planta contra el patógeno que ha demostrado su eficiencia al ser inducido a través de aproximaciones similares a la nuestra. La transformación del tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*) con un vector que lleva el gen de avirulencia *Avr9* bajo control del promotor *Gst1* permitió la activación de RH y una serie de mecanismos de defensa en respuesta a la inoculación con *Cladosporium fulvum*.⁵⁹

La estrategia propuesta en el presente trabajo está diseñada para conferir una resistencia de amplio espectro que abarcaría a cualquier cepa de *P. infestans*. Ello

representa una gran ventaja en relación a la estrategia de transferencia directa de genes de tipo R, que genera una resistencia específica que puede ser quebrada en un plazo relativamente corto por mutaciones o recombinaciones asexuales y sexuales de los genotipos ya existentes con cepas nuevas del patógeno provenientes de otros lugares¹⁰¹. Por ejemplo, el gen de tipo R *Vnt1.1* de *Solanum venturii* fue insertado en *S. tuberosum* cv Desiree, pero la resistencia fue neutralizada por el aislamiento de *P. infestans* EC-1 de Ecuador¹⁰². Una alternativa para tener una resistencia más duradera en campo es el apilamiento de varios genes de tipo R¹⁰³, es decir, la incorporación al genoma de *S. tuberosum* de múltiples genes R para disminuir la probabilidad de encontrar una cepa de *P. infestans* compatible. Sin embargo, esa estrategia está aún en fase de investigación.

Se optó por la quimiotransformación para introducir los vectores recombinantes en células de *E. coli* debido a que los productos de las ligaciones tenían altas concentraciones de sales que son incompatibles con la electrotransformación. Los fragmentos de ADN utilizados en las reacciones de ligación provenían de bandas purificadas a partir de muestras de ADN separadas en geles de agarosa. El ADN resultante de la purificación de estas bandas podría poseer altas concentraciones de sales debido a la composición de las soluciones del kit que se utilizó para su purificación. A pesar de que se repitieron los lavados con la solución debida, no se obtuvieron células transformadas por electrotransformación, ya que la presencia de las sales producía una sobrecarga del voltaje que ocasionaba la lisis de las bacterias. Por otro lado, no hubo problemas en realizar el protocolo de quimiotransformación, lográndose obtener células transformadas de *E. coli*.

La construcción quimérica fue clonada, en primera instancia, en el vector pUC19 para obtener una mayor concentración de la muestra de ADN deseada y una

adecuada calidad. El vector pUC19 permite obtener una buena concentración de ADN luego de la extracción de plásmido, ya que es un vector de alto número de copias. La cantidad de ADN obtenida luego de la purificación a partir de *E. coli* es de mucha importancia para un adecuado secuenciamiento ¹⁰⁴, así como para la producción de sondas de hibridación. El tamaño pequeño de este vector lo hace fácil de manipular, a diferencia de los vectores binarios que por su gran tamaño están en menor número de copias en la bacteria *E. coli*.

La clonación fue verificada por secuenciamiento, y luego de hacer un alineamiento de las secuencias obtenidas con las secuencias predichas, se demostró que no hubo variación alguna durante el proceso. Asimismo, el servicio de secuenciamiento de Macrogen otorga una buena lectura a las secuencias que no sean mayores de 700 pb, con un valor Phred de 20 a más que implica un 99% de confiabilidad y precisión de la lectura ¹⁰⁵.

En el presente trabajo se utilizó un método directo de transformación genética en papa descrito por Medina-Bolívar ¹⁰⁰. Este es un método eficiente, sencillo, práctico y rápido; sin embargo, la baja eficiencia de transformación (2.42 %) que se obtuvo podría deberse a distintos factores, entre ellos: (1) la ocurrencia de variación somaclonal en las plantas por exposición a altas concentraciones de auxina y antibióticos, lo que las hace inviables para la regeneración¹⁰⁶; (2) la limitada interacción entre el explante y *A. tumefaciens*, dado que el contacto ocurre en la superficie de un medio semisólido y solo a nivel de la base cortada del explante; en el co-cultivo en medio líquido, los explantes están completamente extendidos y sumergidos, lo que determina una mayor superficie de contacto con la bacteria; sin embargo, existe en este caso un alto grado de contaminación que hace que este método sea más tedioso de manejar¹⁰⁷; (3) el estrés celular de la planta causado por el

corte e infección con la bacteria y la producción de especies reactivas de oxígeno, radicales libres, estrés oxidativo y necrosis, que determinan una notable disminución de su desarrollo en el medio de cultivo¹⁰⁸.

Para seleccionar los tejidos transformados en los medios de regeneración se empleó el antibiótico kanamicina a una concentración de 100mg/L, y para evitar la contaminación después de la transformación, carbenicilina a 250 mg/L. El uso de estos antibióticos se estandarizó en entrenudos previamente (datos no mostrados), donde no se detectaron “escapes” (regeneración de plantas a partir de callos no transformados) con el antibiótico kanamicina a 100 mg/L, y se demostró una inhibición del crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens* en placas con callos transformados (aunque podrían haber quedado bacterias protegidas al interior del callo, ver abajo), sin toxicidad para los tejidos vegetales, con la carbenicilina a una concentración de 250 mg/L. A pesar de ello, en la presente investigación se obtuvo aproximadamente 30 % de regenerantes provenientes de “escapes”, los cuales, pese a haber pasado por el protocolo de transformación con el gen *Avr3a*, no habían insertado dicho transgén en su genoma.

Las posibles causas de estos “escapes” serían la falta de contacto permanente de toda la superficie del explante con el medio de cultivo, lo que ocasionó que en algunos casos la regeneración tuviera lugar a partir de zonas del tejido que no habían estado en contacto con el agente selector, y/o el uso de medios de cultivo “antiguos” -almacenados más de 30 días-, en los cuales la eficiencia y actividad de la kanamicina podría haber disminuido e incluso desaparecido. Por lo tanto, se debe verificar que, al momento de cosechar los regenerantes, estos se hayan formado a partir de un callo producido en la zona de corte del explante que hubiera estado en

contacto con *A. tumefaciens*. De otra forma, será altamente probable que los regenerantes no hayan sido transformados por *A. tumefaciens*¹⁰⁹.

En nuestro caso, todos los regenerantes provenientes de “escapes” pudieron ser detectados y posteriormente eliminados mediante la prueba de resistencia a kanamicina. Esta prueba fisiológica permitió evaluar indirectamente la expresión del transgén *nptII*, ya que solo aquellas plantas que habían incorporado este gen dentro de su genoma podían crecer en un medio con altas concentraciones de kanamicina (200 mg/L), normalmente tóxicas para la planta¹¹⁰.

Esta afirmación fue corroborada mediante la prueba de la PCR, que mostró que todas las líneas que desarrollaron plantas resistentes a kanamicina eran también positivas para el transgén *nptII*. Esto evidencia una eficiencia del 100% en la prueba de resistencia a kanamicina al emplear una concentración de 200 mg/L, tal como reportara Rivera¹¹¹ anteriormente en papa. La ventaja de discriminar los eventos transgénicos de los falsos positivos (“escapes”) radica en el tiempo y los materiales que son ahorrados por el investigador durante la evaluación de líneas.

Si bien las líneas que fueron positivas para la prueba de resistencia a kanamicina también fueron positivas para prueba de PCR con el gen *nptII*, solo 11 fueron positivas para el gen *Avr3a*, y en el ensayo de Southern blot, solo 9 líneas resultaron positivo. Esto se pudo deber a que, en algunos casos, solo una porción del ADN-T se incorporó en el genoma de la planta por pérdida parcial de secuencias o re-arreglos del transgén como translocaciones e inversiones¹¹².

En la transformación por *A. tumefaciens*, la transferencia del ADN-T se inicia por el borde derecho y finaliza cuando ingresa el borde izquierdo. El vector pCIP65 con el que se trabajó proviene del vector pBIN20, en el que el gen *nptII* se ubica hacia el borde derecho y el gen *Avr3a* cerca al borde izquierdo. Esto significa que, en

nuestro sistema de transformación, primero ha debido ingresar el gen *nptII* y luego el gen *Avr3a*, lo que explicaría que, en caso de haberse interrumpido la transferencia, las líneas obtenidas tuvieran el gen *nptII* completo (resistentes a kanamicina y positivas para *nptII* por PCR), pero el gen *Avr3a* estuviera ausente.

Una posible explicación de que se hayan obtenido dos líneas positivas para la secuencia del gen *Avr3a* según la prueba de PCR que resultaron negativas en la prueba de Southern blot es que en la PCR se hayan amplificado secuencias de plásmidos de *A. tumefaciens* que no se lograron eliminar durante la regeneración, a pesar de la presencia de carbenicilina en el medio. El ADN podría haber estado contaminado luego de la extracción y haber provocado la aparición de falsos positivos, algo muy común en este tipo de protocolos ¹¹³. Por ello se recomienda realizar pruebas adicionales como el Southern blot y la prueba de resistencia a kanamicina.

Gracias a la secuencia de hibridación de la sonda, que incluye el gen *Avr3a*, y al sitio de corte de la enzima de restricción de *EcoRI*, se pudo verificar si todos los insertos en el genoma de la planta correspondían a secuencias completas. Desde el borde derecho del ADN-T, por donde se inicia la inserción en el genoma de la papa, hasta el sitio de restricción *EcoRI* hay un total de 3.8 kb aproximadamente (FIGURA 11). Esta enzima corta justo al final de la secuencia del terminador *nos*, con lo cual la aparición de una banda de más de 3.8 kb indicó la presencia de una copia completa insertada.

VII. CONCLUSIONES

- Se pudo clonar en el vector de transformación pBIN20 el gen *Avr3a* optimizado en su secuencia, bajo el control del promotor *GstI*.
- El secuenciamiento del vector con la construcción quimérica demostró que no hubo mutación alguna durante el clonamiento y que la orientación de los insertos (promotor o gen *Avr3a*) y los marcos de lectura fueron correctos.
- Se obtuvieron plantas de papa de la variedad Pentland Ace transformadas con el gen *Avr3a*.

VIII. RECOMENDACIONES

- Utilizar un vector binario que permita tener el gen de interés cerca del borde derecho del ADN-T, como el vector pCAMBIA, para aumentar su probabilidad de incorporación en el genoma de la papa durante la transformación mediada por *A. tumefaciens*.
- Realizar pruebas de infección en invernadero a las plantas transgénicas obtenidas con el vector pCIP65 con las razas más representativas de *Phytophthora infestans* para evaluar el grado de resistencia.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. DEVAUX, A. *et al.* 2010. El sector papa en la región andina: Diagnostico y elementos para una visión estratégica (Bolivia, Ecuador y Perú). Centro internacional de la papa.
2. DOEHLONAN, J. M. y SLEPER, D. A. 1995. *Breeding Field Crops*. Iowa state University Press. Ames. 419-433.
3. GEBHART, G. y VALKONEN, J. P. T. 2001. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annual Review in Phytopatology* 39: 79-102.
4. FAO. 2006. Tesoro enterrado: La papa. Departamento de agricultura, bioseguridad, nutrición y protección del consumidor. Roma, Italia. pp. 2. Disponible en línea: <http://www.fao.org/ag/esp/revista/pdf/0611-1.pdf> (accedido el 24/06/2008).
5. DUNCAN, J. M. 1999. *Phytophthora* - an abiding threat to our crops. *Microbiology Today* 26: 114-116.
6. MENDOZA, A. 1998. Manejo integrado de la ranca en el cultivo de la papa. Universidad Nacional Hermilio Valdizan. Manual Técnico. Huánuco. pp.43
7. ABAD, Z. G. y ABAD, J. A. 1995. Historical evidence on the occurrence of late blight potato, tomato and pear melon in the Andes of South America. In: *Phytophthora infestans* 150: Proceedings.

8. ERWIN, D. C. y RIBEIRO, O. K. (Eds.). 1996. Introduction to the genus *Phytophthora*. In: *Phytophthora* disease worldwide. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp. 1-7.
9. AGRIOS, G. (Eds.). 1995. Fitopatología. Catedrático, Departamento de Fitopatología, Universidad de Massachusetts. Editorial LIMUSA, S.A. México. pp. 317-323.
10. ALONSO, F. 2002. El cultivo de la patata. Editorial Mundi- Prensa, S.A. Madrid. España. pp. 495.
11. COFFEY, M. D. y GEES, R. 1991. The cytology of development. In: advances in Plant Pathology. *Phytophthora infestans*, the cause of potato late blight of potato. INGRAM, D.S. y WILLIAMS, P.H. Editorial ACADEMIC PRESS. Londres. Inglaterra. pp. 31-51.
12. DRENTH, A., TURKENSTEEN, L. J. y GOVERS, F. 1993. The occurrence of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* in The Netherlands, significance and consequences. Netherlands Journal of Plant Pathology 99: 57- 67.
13. McDONALD, B.A., y LINDE, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 40: 349-79.
14. HAAS, B.J. *et al.* 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. Nature 461: 393-98.
15. KAMOUN, S. A. 2006. Catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. Annu. Rev. Phytopathol. 44: 41-60.

16. RAFFAELE, S., FARRER, R.A. *et al.* 2010. Genome evolution following host jumps in the Irish potato famine pathogen lineage. *Science* 330: 1540-43.
17. FLOR, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review Phytopathology* 9: 275-296.
18. DE WIT, P. J. 1997. Pathogen avirulence and plant resistance: A key role for recognition. *Trends in Plant Science* 2: 452-458.
19. BONAS, U. y LAHAYE, T. 2002. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Current opinion in microbiology*. 5:44-50.
20. STASKAWICS, B. J., AUSUBEL, F. M., BAKER, B. J., ELLIS, J. G. y JONES, J. D. G. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268: 661-667.
21. BEYER, K., BINDER, A., BOLLER, T. y COLLINGE, M. 2001. Identification of potato genes induced during colonization by *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* 2: 125-134.
22. BIRCH, P. R. J., y WHISSON, S. 2001. *Phytophthora infestans* enters the genomics era. *Molecular Plant Pathology* 2: 257-263.
23. PIETERSE, C., DE WITT, P. y GOVERNS, F. 1992. Molecular aspects of the potato- *Phytophthora infestans* interaction. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 2: 85-92.

24. ORDÓÑEZ, M. 1993. Identificación de Genes Mayores de Resistencia a *Phytophthora infestans* en Patata (*Solanum tuberosum*). Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Quito: PUCE.
25. STASKAWICZ, B.J., AUSUBEL, F.M. y JONES, R.D.G. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268: 661-667.
26. BIRCH, P. R. J., y WHISSON, S. 2001. *Phytophthora infestans* enters the genomics era. *Molecular Plant Pathology* 2: 257-263.
27. VLEESHOUWERS, V.G. *et al.* 2008. Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. *PlosOne* 3:e2845.
28. CHAMPOURET, N. *et al.* 2009. *Phytophthora infestans* isolates Licking class I *ipiO* variants are virulent on Rpi-blb1 potato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12: 1535-1545.
29. VAN POPPEL, P.M. *et al.* 2008. The *Phytophthora infestans* avirulence gene *Avr4* encodes an RXLR-dEER effector. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 1460-1470.
30. HALTERMAN, D. *et al.* 2010. Competition between *Phytophthora infestans* effectors leads to increased aggressiveness on plants containing broad-spectrum late blight resistance. *PlosOne* 5: 1-10.
31. BEYER, K., BINDER, A., BOLLER, T. y COLLINGE, M. 2001. Identification of potato genes induced during colonization by *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* 2: 125-134.
32. ARMSTRONG, M. R., WHISSON, S. C., y PRITCHARD, L. *et al.* 2005. An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*,

- encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. Proceedings of the National Academy of Science United State of America 102: 7766-7771.
33. BOS, J. I. B., KANNEGANTI, T., YOUNG, C. *et al.* 2006. The C- terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1 –induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal* 48: 165-176.
34. KAMOUN, S. y SMART C. D. 2005. Late blight of potato and tomato in the genomics era. *Plant Disease* 89: 692-99.
35. SHA, D. M. 1997. Genetic engineering for fungal and bacterial diseases. *Current Opinion in Biotechnology* 8: 208-214.
36. LYON, G. D. 2001. Plant/pathogen interactions at the cellular level. Scottish Crop Resesarch Institute. Disponible en línea: <http://www.scri.sari.ac.uk/TiPP/CellText.htm>. (accedido el 26/08/08).
37. HAMOND-KOSACK, K. y JONES, J. 1997. Plant disease resistance genes. *Annual Review Plant Physiology Plant and Molecular Biology* 48: 575-607.
38. HUANG, S., VLEESHOUWERS, V. G. A. A., WERIJ, J.S., *et al.* 2004. The R3 resistance to *Phytophthora infestans* in potato is conferred by two closely linked R genes with distinct specificities. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 428-435.
39. TURKESTEEN, L. J. 1993. Durable resistance of potatoes against *Phytophthora infestans*. In: JacobsTh. & Parlevliet, J.E. (Eds.). *Durability of disease resistance*. Kluwe Academic Publisher, Dordrecht, the Netherlands. pp. 115-124.

40. SANCHEZ, G. M., SMART, C. D., SIMKO, I., *et al.* 2000. Identification of two new R-genes to *Phytophthora infestans* from *Solanum berthaultii*. Paper: 92nd annual meeting of the American Phytopathological Society.
41. KUHL J. C, HANNEMAN J. R. y HAVEY, M. J. 2001. Characterization and mapping of *Rpi1*, a late-blight resistance locus from diploid (1 EBN) Mexican *Solanum pinnatisectum*. *Molecular Genetics and Genomics* 265: 977-985.
42. SMILDE, W. D., BRIGNETI, G., JAGGER, L., PERKINS, S., y JONES, J. D. G. 2005. *Solanum mochiquense* chromosome IX carries a novel late blight resistance gene *Rpi-moc1*. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 252-258.
43. PARK, T-H., GROS, J., SIKKEMA, A., *et al.* 2005. The late blight resistance locus *Rpi-blb3* from *Solanum bulbocastanum* belongs to a major late blight *R* gene cluster on chromosome 4 of potato. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 18: 722-729.
44. BALLVORA, A., ERCOLANO, M. R., WEIS, J., *et al.* 2002. The R1 gene for potato late resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant Journal* 30: 361-371.
45. HUANG, S., VAN DER VOSSSEN, E. A. G., KUANG, H., *et al.* 2005. Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato. *Plant Journal* 42: 251-261.
46. SONG, J., BRADEEN, J. M., NAESS, S. K., *et al.* 2003. Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *The Proceedings National Academy of Science* 100: 9128-9133.

47. VAN DER VOSSSEN, E., SIKKEMA, A., TE LINTEL HEKKERT, B., *et al.* 2003. An ancient *R* gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant Journal* 36: 867-882.
48. WANG, M., ALLEFS, S., VAN DEN BERG, R. G., *et al.* 2008. Allele mining in *Solanum*: conserved homologues of *Rpi-blb1* are identified in *Solanum stoloniferum*. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 933-943.
49. VAN DER VOSSSEN, E., GROS, J. E., SIKKEMA, A., *et al.* 2005. The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an *Mi-1* gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *Plant Journal* 44: 208-222.
50. FONSECA, C., LABARTA, R., MENDOZA, A., LANDEO, J. y WALKER, T. 1996. Impacto económico de la variedad Canchán-INIAA, de alto rendimiento y resistente al tizón tardío, en el Perú. Estudios de casos del impacto económico de la tecnología relacionada con el CIP en el Perú. Lima, CIP: pp. 1-14.
51. WALKER, T., BI, Y. P., LI, J. H., GAUR, P. C. y GRANDE, E. 2003. Potato genetic improvement in developing countries and CIP's role in varietal change. in: crop variety improvement and its effect on productivity: The impact of international agricultural research. Evenson, R.E. and D. Gollin (Eds.). CABI Publishing, Oxfordshire, UK. pp. 315-336.
52. BARTON, J., CRANDON, J., KENNEDY, D. y MILLER, H. 1997. A model protocol to assess the risks of agricultural introductions. *Nature Biotechnology* 15: 845-848.

53. JAMES, C. 2007. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007. *ISAAA Brief No.37*. ISAAA: Ithaca, NY.
54. CUBERO, J.I. 2003. La Biotecnología en la producción agraria. Eds.Mundi-Prensa S.A., Madrid. pp 47-60.
55. ZHU, B., CHEN, T. y LI, P. Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. 1996. *Planta*. 198: 70-77.
56. LOTTMAN, J., HEUER, H., SMALLA, K y BERG, G. 1999. Influence of transgenic T4-lysozyme-producing potato plants on potentially beneficial plant-associated bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 29: 365-377.
57. MELCHERS, L. y STUIVER, M. 2000. Novel genes for disease-resistance breeding. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 147-152.
58. BONIERBALE, M., SIMON, R., ZHANG, D., GHISLAIN, M., MBA, C y LI, X. Q. 2003. Genomics and molecular breeding for root and tuber crop improvement. *Plant molecular breeding*, ed. HJ Newbury, 216-253. Oxford (UK): Blackwell Publishing.
59. HONÉE, G., BUITINK, J., JABS, T., *et al.* 1998. Induction of defense-related responses in Cf9 tomato cells by the AVR9 elicitor peptide of *Cladosporium fulvum* is developmentally regulated. *Plant Physiology* 117: 809-820.
60. ZUPAN, J., MUTH, T., DRAPER, O., *et al.* 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant journal* 23: 11-18.

61. SHENG, O. J. y CITOVSKY, V. 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins will travel. *Plant Cell* 23: 1699-1710.
62. HOOYKAAS, P. J. J. y BEIJERSBERGEN, A. G. M. 1994. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annual Review of Phytopathology* 32: 157-179.
63. ROGERS, S., KLEE, H., HORSCH, R. y FRALEY, R. 1993. Use of cointegrating Ti plasmid vectors. *Plant Molecular Biology Manual* 1-12.
64. BEVAN, M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* 12: 8711-8721.
65. HELLENS, P., EDWARDS, E., LEYLAND, N., BEAN, S. y MULLINEAUX, P. 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* 42: 819-832.
66. HELLENS, R., MULLINEAUX, P. y KLEE, H. 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science* 5: 446-451.
67. HENNEGAN, K. y DANNA, K. 1998. pBIN20: An Improved Binary Vector for *Agrobacterium*- mediated transformation. *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 129-131.
68. LUO, H. R., SANTA MARIA, M., BENAVIDES, J., ZHANG, P., ZHANG, Z. y GHISLAIN, M. 2006. Rapid genetic transformation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) vía organogénesis. *African Journal of Biotechnology* 5: 1851- 1857.

69. KOK-JACON, A., VINCKEN, J. P., SUURS, L., WANG, D., LIU, S., y VISSER, G.F. 2007. Expression of alternansucrase in potato plants. *Biotechnology Letters* 7: 1135-1142.
70. TYAGI, A. K. 2001. Plant genes and their expression. *Current science* 80: 161-169.
71. SALINAS, A. E. y WONG, M. G. 1999. Glutathione-S-transferase(s)-a review. *Current Medicinal Chemistry* 6: 279-309.
72. MARTINI, N., EGEN. M., RÜNTZ. I. y STRITTMATTER, G. 1993. Promoter sequences of potato pathogenesis-related gene mediate transcriptional activation selectively upon fungal infection. *Molecular and general Genetics* **236**: 179-186.
73. HAHN, K. y STRITTMATTER, G. 1994. Pathogen-defence gene *prp1-1* from potato encodes an auxin-responsive glutathione S-transferase. *European journal of biochemistry* 226: 619-626.
74. STRITTMATTER, G., GHEYSEN, G., GIANINAZZI-PEARSON, V. *et al.* 1996. Infections with various types of organisms stimulate transcription from a short promoter fragment of the potato *gst1* gene. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 9: 68-73.
75. RUSHTON, J., REINSTADLER, A. *et al.* 2002. Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen and wound-induced signaling. *The Plant Cell* 14: 749-762.
76. INGELBRECHT, I. L. W., HERMAN, L. M. F., DEKEYSER, R. A., VAN MONTAGU, M. C. y DEPICKER, A. G. 1989. Different 3' end regions

- strongly influence the level of expression in plant cells. *The Plant Cell* 1: 671-680.
77. CHAN, M., CHEN, L. y CHANG, H. 1996. Expression of *Bacillus thuringiensis* (B.t.) insecticidal crystal protein gene in transgenic potato. *Bot. Bull. Academia Sinica* 37: 17-23.
78. HECK, G. R., ARMSTRONG, C. L. y ASTWOOD, J. D. *et al.* 2005. Development and Characterization of a CP4 EPSPS-Based, Glyphosate-Tolerant Corn Event. *Crop Science* 44: 329-339.
79. HOOD, E. E., GELVIN, S. B., MELCHERS, L. S. y HOEKEMA, A. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research* 2: 208-218.
80. HUANG, X. y ZHIMING, W. 2005. Successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Maize elite inbred lines. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*. 83: 187-200.
81. ATKINSON, P.W. 2002. Genetic engineering in insects of agricultural importance. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 32: 1237-1242.
82. BACMAP: BACTERIAL GENOME ATLAS. Disponible en: http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/cgi/getSpeciesCard.cgi?accession=NC_003304&ref=index.html. Accesado enero 15, 2008.
83. DOUGLAS, C.; STANELONI, R.; RUBIN, R; NESTER, E. 1985. Identification and genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *Plant Cell Physiol* 161: 850 – 860.
84. GELVIN, S. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 223-256.

85. TZFIRA, T. y CITOVSKY, V. 2002. Partners-in- infection: Host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol.*12: 21-129.
86. KLEE, H.; HORSCH, R. y ROGERS, S. 1987. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Annual Review of Plant Physiology* 38: 467-486.
87. VEENA, J.; DOERGE, R. y STANTON B. 2003. Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. *The Plant Journal* 35: 219-236.
88. SRIVASTAVA, V.; ANDERSON, O. D. y OW, D. W. 1999. Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11117-11121.
89. OPABODE, J. T. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology. Review* 1 (1): 12-20.
90. ZHAO, Y.; CAI, T.; TAGLIANI, L.; MILLER, M.; *et al.* 2000. *Agrobacterium* mediated sorghum transformation. *Plant Mol. Biol.* 44: 789-798.
91. LITZ, R y JARRET, R. 1991. Regeneración de Plantas en Cultivo de Tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis (7) pp 152-160. En: Roca, W. M y Mroginski, L.A (eds.). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de La Agricultura Tropical. Cali, Colombia. pxii, 970.
92. JAIN, S. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153-166.

93. MONSERRAT, E.; MARFA, V.; MELE, E. y MESSENGUER, J. 2001. Study of different antibiotic combinations for use in the elimination of *Agrobacterium* with kanamycin selection in carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 65: 211-220.
94. RAMESSAR, K.; PEREMARTI, A.; GOMEZ-GALERA, S.; *et al.* 2007. Biosafety and risk assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of science not supporting the politics. *Transgenic Res.* 16: 261-280.
95. GHANEM, S. Cloning of the *nptII* gene of *Escherichia coli* and construction of a recombinant strain harboring functional *recA* and *nptII* antibiotic resistance. 2011. *Genet. Mol. Res.* 10 (3): 1445-1454.
96. NAP, J.; BIJVOET, J.; y STIKEMA, W. 1992. Biosafety of kanamycin resistant transgenic plants: an overview. *Trans Res.* 1:239-249.
97. Disponible en línea:
http://www.europotato.org/display_description.php?variety_name=PENTLAND%20ACE
98. BONIERBALE, M., SIMON, R., ZHANG, D., GHISLAIN, M., MBA, C y LI, XQ. 2003. Genomics and molecular breeding for root and tuber crop improvement. *Plant molecular breeding*, ed. HJ Newbury, 216–253. Oxford (UK): Blackwell Publishing.
99. ÑOPO, L., MEDRANO, G. y GHISLAIN, M. 2005. Applied biotechnology laboratory protocols: Genetic engineering of potato and sweet potato: Production, selection, testing. The International Potato Center, Lima, Perú. 87 pp.
100. MEDINA-BOLÍVAR, F. Y CRAMER, C. 2004. Production of recombinant proteins by hairy roots cultured in plastic sleeve bioreactors.

Methods in Molecular Biology. Vol. 267: Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols, Second Edition.

101. PAEZ, O., VALVERDE, R., GOMEZ, L. y BRENES, A. 2005. Diversidad genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* en plantaciones de papa en Costa Rica con el uso de RAPDS. *Agronomía Costarricense*. 29: 41-55.
102. PEL, M., FOSTER, S., PARK, T. *et al.* 2009. Mapping and cloning of late blight resistance genes from *Solanum venturii* using an interspecific candidate gene approach. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22:601-615.
103. ZHU, S., VOSSEN J.H., VISSER R. y JACOBSEN, E. 2011. Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato. *Transgenic Research*. 11248-011-9510-1.
104. DNA Sequencing Troubleshooting Guide. Iowa State University. E.E.U.U Disponible en:
http://www.dna.iastate.edu/frame_dna_sequencing_tsg.html (accedido el 20/09/08).
105. MACROGEN. Avancing through Genomics. Disponible en línea:
http://www.macrogen.com/eng/sequencing/faq_sequence_view.jsp
(accedido el 16/09/08).
106. CHENG, Z., SCHNURR, J y J, KAPAUN. 1998. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. *Plant Cell Reports* 17: 646-649.
107. GARCIA, R., MORAN, R., MENA, J., *et al.* 2000. Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Regeneration and Transformation Technology to

- Provide Weevil (*Cylas formicarius*) Resistance. Plant Genetic Engineering: towards the Third Millenium A.D. Pp. 112-117.
108. ZHENG, Q., JU, B., LIANG, L. y XIAO, X.H. 2005. Effects of antioxidants on the plant regeneration and GUS expressive frequency of peanut (*Arachis Hypogaea*) explants by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tiss Org Cult 811: 83-89.
109. MONSERRAT, E., MARFA, V., MELE, E. y MESSENGUER, J. 2001. Study of different antibiotic combinations for use in the elimination of *Agrobacterium* with kanamycin selection in carnation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 65: 211-220.
110. ZUPAN, J., MUTH, T., DRAPER, O., y ZAMBRYSKI, P. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. The Plant Journal. 23: 11-28.
111. RIVERA, C. 2008. Modificación de la reacción de hipersensibilidad al virus PVX en *Solanum tuberosum* L. cv King Edward para conferir resistencia a *Phytophthora infestans*. Tesis para optar el título de Magister scientiae. Lima, Perú. 66 pp.
112. GODELIEVE, G. *et al.* 1990. Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. Genes & development 5:287-297.
113. NAIN, V. *et al.* 2005. Polymerase chain reaction analysis of transgenic plants contaminated by *Agrobacterium*. Plant Molecular Biology Reporter 23: 59-65.

X. ANEXO

Anexo 10.1 Medios utilizados en el crecimiento bacteriano.

- Medio semisólido LB (Luria Bertani)

Compuesto	1 L
Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Agar*	15 g

Ajustar a pH 7. Autoclavar a 121° C por 15 minutos.

*Solo si el medio es semisólido. En el medio LB líquido no se agrega.

- Medio SOC

Compuesto	1 L
glucosa	3.6 g
Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0.5 g
MgCl ₂	0.95 g
KCl	0.186 g

Ajustar a pH 7. Autoclavar a 121° C por 15 minutos.

Anexo 10.2 Preparación de antibióticos utilizados en la selección bacteriana.

- Ampicilina (100 000 mg/L)

Disolver 1 g con agua destilada hasta completar un volumen de 10 mL. Esterilizar por filtración. Conservar a -20 °C.

- Kanamicina (100 000 mg/L)

Disolver 1 g con agua destilada hasta completar un volumen de 10 mL. Esterilizar por filtración. Conservar a -20 °C.

Anexo 10.3 Soluciones empleadas para la extracción de plásmido de

A. tumefaciens

- **Solución P1**

Reactivos	PM	Para 100 mL	Concentración final de stock
Tris®	121.14 g/mol	0.30 g	25 mM
D-(+)-Glucosa	180.20 g/mol	0.90 g	50 mM
EDTA, sal disodio, dihidratado	372.20 g/mol	0.37 g	10 mM

Ajustar pH del Tris® a 8.0

- **Solución P2**

Reactivos	PM	Para 100 mL	Concentración final de stock
SDS	288.40 g/mol	1,00 g	1,00%
NaOH	40.00 g/mol	1,16 g	0,2 M

- **Solución P3**

Reactivos	PM	Para 100 mL	Concentración final de stock
Acetato de sodio, anhidro	82.03 g/mol	24.61 g	3.0 M

Ajustar pH a 4.8

- **Fenol-Tris® saturado**

- Tomar stock de fenol de -20 °C y calentarlo a temperatura ambiente antes de colocarlo en baño maría a 68 °C.
- Añadir 8-hidroxiquinolina a una concentración final de 0.1%.
- Añadir un volumen igual de 0.5 M Tris pH 8.0.
- Agitar por 15 minutos a temperatura ambiente. Esperar que se separe en 2 fases y eliminar la fase superior (acuosa).
- Añadir nuevamente un volumen igual de 0.1 M de Tris pH 8.0.
- Agitar por 15 minutos y continuar como los pasos anteriores.
- Repetir esto hasta que el pH de la fase fenólica sea 8.0.
- Medir con papel pH.
- Después de equilibrar, añadir 0.1 volúmenes de 0.1 M Tris pH 8.0 y guardarlo en una botella oscura a 4 °C.

- **Fenol alcalino**

Esta solución es preparada al instante. Mezclar 1 volumen de Fenol-Tris® saturado (pH 8.0) y 2 volúmenes de 0.2 N NaOH.

- **Fenol-Cloroformo**

Mezclar en volúmenes iguales Fenol-Tris® saturado (pH 8.0) y cloroformo. Mantener la solución en una botella oscura a 4 °C.

Anexo 10. 4 Soluciones utilizadas para electroforesis.

- **EDTA.**

Reactivos	PM	Para 1000 mL	Concentración final de stock
EDTA, sal disodio, dihidratado	372.20 g/mol	186.1 g	0.5 M
Pepitas de NaOH		50 pepitas	
Ajustar pH a 8.0.			

- **TBE 10X.**

Reactivos	PM	Para 1000 mL	Concentración final de stock
Tris ®	121,14 g/mol	108 g	892 mM
Ácido Bórico	61,814 g/mol	55 g	889 mM
EDTA 0.5 M pH 8.0,	372,20 g/mol	40 mL	20 mM

- **SALB 10X**

Compuesto	50 mL
Azul de Bromofenol	75 mg
Xilen cianol	75 mg
Naranja G	100 mg
Sucrosa	30 g
TBE 10X	2.5 mL
H ₂ O	50 mL

Para correr una muestra de 10 µL se usa 0.87 µL de SALB más 0.13 µL de gelred (1:4).

- **Agua DEPC (1X)**

Compuesto	1L
DEPC	1 mL
Agua mili-Q	1000 mL

Dejar disolviendo 24 horas en oscuridad, autoclavar y enfriar.

- **Preparación del marcador λ digerido con la enzima *PstI*.**

Reactivos	Cantidad
ADN de λ	100 μ L
<i>PstI</i> (10 U/ μ L)	10 μ L
Tampón 10X para <i>PstI</i>	90 μ L
Agua libre de nucleasas	(*) μ L
Volumen final	900 μ L

(*) Volumen necesario para completar 900 μ L

- Incubar a 37 °C por 2 horas.
- Tomar 3 μ L de muestra y correr en un gel de agarosa para verificar si la digestión es completa.
- Añadir 100 μ L de SALB 10X y guardar a -20 °C.

Anexo 10. 5 Preparación de células electrocompetentes de

Agrobacterium tumefaciens.

- Preparar un cultivo líquido de *A. tumefaciens* en 5 mL de medio LB con antibiótico de selección. Incubar a 28 °C toda la noche en un agitador de baño maría a 250 rpm.
- Inocular 100 μ L del cultivo bacteriano en 100 mL de medio líquido LB con 100 μ g/mL de kanamicina o rifampicina, e incubar bajo las mismas

condiciones hasta llegar a una absorbancia de 620 nm medida en el espectrofotómetro dentro de una escala de 0.4 - 0.6.

- Dividir el cultivo en 4 tubos de 50 mL.
- Centrifugar a 10 000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
- Disolver cada precipitado en 10 mL de Tampón I frío. Centrifugar como se dijo anteriormente.
- Disolver cada precipitado en 10 mL de Tampón II frío. Centrifugar como se dijo anteriormente.
- Disolver cada precipitado en 500 µL del Tampón II.
- Mezclar las células y distribuir en tubos de 2 mL.
- Centrifugar a 10 000 rpm por 5 min a 4 °C.
- Disolver cada precipitado en 200 µL de Tampón II. En este paso la concentración será de 1×10^{11} ufc/mL.
- Distribuir en tubos de 0.5 mL esterilizados añadiendo 50 µL por tubo y sumergir en nitrógeno líquido (-196 °C). Luego las células son conservadas a -70°C.

Soluciones empleadas.

Tampón I.

Reactivos	PM	Para 100 mL	Concentración final de stock
HEPES (libre de ácido)	235.3 g/mol	23.83 mg	1 mM

Ajustar pH a 7.0 y autoclavar.

Tampón II.

Reactivos	PM	Para 100 mL	Concentración final de stock
HEPES (libre de ácido)	235.3 g/mol	23.83 mg	1 mM
Glicerol (99%)	92.09 g/mol	10 mL	10%

Ajustar pH a 7.0 y autoclavar.

Anexo 10.6 Preparación de células quimiocompetentes de *Escherichia coli*.

- Seleccionar una colonia aislada de un cultivo en placa fresco.
- Transferir la colonia a 25 mL de LB en un frasco de 250 mL.
- Incubar por 6 a 8 horas a 37 °C y agitar a 250-300 rpm.
- Inocular este cultivo en 3 frascos de 1 L, los cuales contienen 250 mL de LB.
- Poner 10 mL del cultivo en el primer frasco, 4 mL en el segundo y 2 mL en el tercero.
- Incubar toda la noche a 18-22 °C con una agitación moderada.
- Cuando el OD600 alcance 0.55, poner el cultivo en hielo por 10 minutos.
- Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
- Descartar el sobrenadante asegurándose de que no haya residuos en el tubo de centrífuga.
- Resuspender las células en 80 mL del Tampón A, haciendo girar con cuidado.
- Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender las células suavemente en 20 mL del Tampón A.

- Añadir 1.5 mL de DMSO. Mezclar por agitación.
- Almacenar en hielo por 10 minutos.
- Rápidamente dispensar alícuotas de 50 μ L en tubos de 0.5 mL y sumergir en nitrógeno líquido (-196 °C). Guardar las células a -70 °C.

Soluciones empleadas.

PIPES.

Reactivos	PM	Para 100 mL	Concentración final de stock
PIPES	302.37 g/mol	15.1 g	0.5 M

Usar agua Mili-Q filtrada. Ajustar el pH a 6.7 y esterilizar por filtración. Guardar a -20 °C.

- **Tampón para células quimiocompetentes.**

Reactivos	PM	Para 1000 mL	Concentración final de stock
MnCl ₂	125.84 g/mol	6.92 g	55 mM
CaCl ₂	110.99 g/mol	1.66 g	15 mM
KCl	74.55 g/mol	18.64 g	250 mM
PIPES (0.5M, pH 6.7)	362.37 g/mol	20 mL	10 mM

Usar agua Mili-Q filtrada. Esterilizar por filtración y guardar a -20 °C.

Anexo 10.7 Extracción de plásmido (*E. coli*)

La extracción se llevo a cabo con el kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), de acuerdo al protocolo siguiente:

- Tomar 2 mL de cultivo de bacterias y colocarlos en un tubo eppendorf de 2 mL.
- Centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet con 250 µL de Cell Resuspension Solution. Luego agregar 250 µL de Cell Lysis Solution e invertir la muestra 4 veces.
- Adicionar a la muestra 10 µL de Alkaline Protease Solution invirtiendo el tubo para mezclar y dejar incubando a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Agregar 350 µL de Neutralization Solution y nuevamente invertir 4 veces.
- Centrifugar a máxima velocidad por 10 minutos.
- Insertar la columna dentro del tubo colector y colocar el sobrenadante dentro de la columna.
- Centrifugar por un minuto en las mismas condiciones del paso anterior.
- Retirar la columna descartando el contenido del tubo recolector y volver a insertarla dentro de este.
- Adicionar 750 µL de Wash Solution, centrifugar por un minuto o dos, descartando nuevamente el contenido del tubo recolector.
- Repetir el paso anterior pero con 250 µL de Wash Solution.
- Finalmente, transferir la columna a un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL y agregar 100 µL de agua libre de nucleasas.

- Centrifugar por un minuto a máxima velocidad, descartar la columna y almacenar la muestra a -20°C hasta su uso.

Anexo 10.8 Medios utilizados en el desarrollo de las plantas

- **Medio MSA**

Compuesto	1L
Sales Murashige & Skoog	4.3g
Solución base MSA*	5.0 mL
Sucrosa	25g
gelrite	2g

Ajustar el pH a 5.6 y autoclavar a 121° C por 15 minutos.

***solución base MSA (Stock)**

Compuesto	500 mL
Acido giberélico	0.01g
Glicina	0.30g
Acido nicotínico	0.075g
piridoxina	0.075g
Tiamina HCL	0.06g

Ajustar el pH a 5.6 y autoclavar a 121° C por 15 minutos.

Para preparar el medio MSA líquido, no se agrega el gelificante gelrite.

- **Medio Co-cultivo MS**

Compuesto	1L
Sales Murashige & Skoog	4.3g
Sucrosa	20g
Gelrite	2g

Ajustar el pH a 5.6 y autoclavar a 121° C por 15 minutos.

- **Medio 3.1 para callos**

Compuesto	1 L
Sales MS	4.43 g
Mix de vitaminas	1 mL
sucrosa	20 g
2,4D	200 µL
BAP	2.5 mL
carbanicilina	1.25 mL
Kanamicina*	1 mL

Ajustar el pH a 5.7 y autoclavar a 121° C por 15 minutos.

- **Medio 3.1 para brotes**

Compuesto	1 L
Sales MS	4.43 g
Mix de vitaminas	1 mL
sucrosa	20 g
ANA	200 µL
BAP	2 mL
GA3	1 mL
carbanicilina	1.25 mL
Kanamicina*	1 mL

Ajustar el pH a 5.7 y autoclavar a 121° C por 15 minutos.

- **Mix de vitaminas**

Compuesto	100 mL
Glicina	200 mg
Tiamina	3000 mg
Acido nicotínico	100 mg
Piridoxina	0.5 mg

La piridoxina deberá ser disuelta antes con gotas de KOH.

- **Medio 303**

Compuesto	1 L
Sales MS	4.43 g
Manitol	20 g
Glucosa	20 g
MES	0.5 g
Polivinil pirrolidona (PVP)	0.5 g
Glutamina	0.2 g
Adenina (sulfato)	0.04 g
Phytigel	3 g
Vitaminas GAP*	1 mL
Zeatina Ribosida*	1 mL
ANA*	100 μ L
Kanamicina*	2 mL

Ajustar a pH 5.7 y autoclavar a 121° C por 15 minutos.

* Se agrega luego de que el medio haya sido autoclavado y enfriado

Preparación de hormonas.

- **Ácido giberélico (5,000 mg/L)**
Disolver 50 mg con 500 μ L de etanol y añadir agua destilada hasta completar un volumen de 50 mL. Esterilizar por filtración. Conservar a -20°C.
- **Ácido naftalenacético (1,000 mg/L)**
Disolver 100 mg con 100 μ L de KOH 1M y añadir agua destilada hasta completar un volumen de 100 mL. Esterilizar por filtración. Conservar a -20°C.
- **Ribósido de zeatina (1,000 mg/L)**
Disolver 20 mg con 300 μ L de KOH 1M y añadir agua destilada hasta completar un volumen de 20 mL. Esterilizar por filtración. Conservar a -20°C.
- **Ácido 2,4- diclorofenoxiacético: 2-,4D (1,000 mg/L)**
Disolver 100 mg con 100 μ L de KOH 1M y añadir agua destilada hasta completar un volumen de 100 mL. Esterilizar por filtración. Conservar a -20°C.
- **N⁶-Bencil-adenina (BAP)**

Disolver 100 mg con 100 μ L de agua destilada hasta completar un volumen de 100 mL. Esterilizar por filtración. Conservar a -20°C.

Preparación de antibióticos para los medios de cultivo *in vitro*.

- Carbenicilina (200,000 mg/L)
Disolver 1 g con agua destilada hasta completar un volumen de 5 mL. Esterilizar por filtración. Conservar a -20°C.
- Kanamicina (100,000 mg/L)
Disolver 1 g con agua destilada hasta completar un volumen de 10 mL. Esterilizar por filtración. Conservar a -20°C.

Anexo 10.9 Soluciones utilizadas en la extracción de ADN vegetal genómico y en Southern blot

- **Tampón CTAB 2X**

Compuesto	1 L
CTAB (bromuro de cetil-trimetil-amonio)	20 g
NaCl	81.81 g
EDTA 0.5M pH8.0 (ácido etilen-diamino-tetra acético)	40 mL
Tris®-HCl 1M pH8.0	100 mL
PVP (polivinil pirrolidona)	10 g
Agua destilada	1000 mL

El CTAB y el PVP se agregan cuando la solución está caliente y luego de haber agregado todos los demás componentes.

- **Lavado #1. Extracción de ADN mediana escala**

-

Compuesto	Concentración final	500 mL
Etanol absoluto	76 %	380 mL
Acetato de sodio 1M	0.2 M	40 mL
H ₂ O (d)		80 mL

- **Lavado # 2. Extracción de ADN mediana escala**

-

Compuesto	Concentración	500 mL
------------------	----------------------	---------------

	final	
Etanol absoluto	76 %	380 mL
Acetato de sodio 1M	10 mM	5 mL
H ₂ O (d)		115 mL

- **Acido clorhídrico 0.25M**

Compuesto	Concentración final	1L
HCl	0.25 M	20.80 mL
H ₂ O (d)		1000 mL

- **Solución de denaturación**

Compuesto	Concentración final	1L
Na OH	0.5 M	20 g
NaCl	1.5 M	87 g

- **Solución de neutralización**

Compuesto	Concentración final	1L
Tris	1 M	121.14g
NaCl	1.5 M	87 g

Ajustar el pH a 8.

- **Solución SSC 20X (Stock)**

Compuesto	Concentración final	1L
Citrato de sodio tribásico dihidratado	0.3 M	88.23 g
NaCl	3 M	174 g

Ajustar el pH a 8 con NaOH concentrado

- **Lavado # 1. Southern blot**

Compuesto	Concentración final	100 ml
Acetato de sodio	0.2 M	1.64 g
Etanol absoluto	75 %	75 mL
H ₂ O (d)		16 mL

- **Lavado # 2. Southern blot**

Compuesto	Concentración final	100 ml
Acetato de amonio	10 mM	0.077 g
Etanol absoluto	75 %	75 mL
H ₂ O (d)		16 mL

Disolver el Acetato de amonio previamente en agua antes de agregarle el etanol.

- **Tampón de lavado. Southern blot**

Para esta solución se necesita preparar ácido maleico

Compuesto	Concentración final	1L
Ácido maleico	0.1 M	16 g
NaCl	0.15 M	75 mL
H ₂ O (d)		1000 mL

Ajustar el pH a 7.5

Tampón de lavado: ácido maleico más 0.3% de tween 20.

Compuesto	300 mL
Ácido maleico	300 mL
Tween 20	900 µL

- **Solución de bloqueo 1X. Southern blot+**

Compuesto	100 mL
Solución Blocking 10X (kit Roche)	10 mL
Ácido maleico	90 mL

- **Tampón de detección. Southern blot**

Compuesto	Concentración final	1L
Tris-HCl	0.1 M	12.14 g
NaCl	0.1 M	5.84 g
H ₂ O (d)		1000 mL

Ajustar el pH a 7.5

Anexo 10.10 ALINEAMIENTO pCIP65

	1	10	20	30	40	50	67
060317-08_G19_Malu-gst1-M13F.ab1	(1)	1	10	20	30	40	50
gst	(1)	TTTGGCTATAAGATGACCGCGCGCGGATA--	TTATCCTAGTTGGCGCGCTATATTT				
Malu-gst1-M13R	(1)	GAATTCGGACATAGTAAACAAGACACCGCGCGCGGATAAT	TTATCCTAGTTGGCGCGCTATATTT				
Consensus	(1)	T T C A AAGA	ACCGCGCGCGGATA	TTATCCTAGTTGGCGCGCTATATTT			
060317-08_G19_Malu-gst1-M13F.ab1	(68)	88	80	90	100	110	120
gst	(68)	TCCTTTCTATCGCGGATTAATAATCTATAATTCGGGACTCTAA	TCATAAAAACCCATCTCATAAATAA				
Malu-gst1-M13R	(1)	TCCTTTCTATCGCGGATTAATAATCTATAATTCGGGACTCTAA	TCATAAAAACCCATCTCATAAATAA				
Consensus	(68)	TCCTTTCTATCGCGGATTAATAATCTATAATTCGGGACTCTAA	TCATAAAAACCCATCTCATAAATAA				
060317-08_G19_Malu-gst1-M13F.ab1	(135)	140	150	160	170	180	190
gst	(123)	CGTCATGCATACATGTTAAATTAATACATGCTTAACGTAAT	CAACGTAATCAACAGAAATATATGATAATCATC				
Malu-gst1-M13R	(1)	CGTCATGCATACATGTTAAATTAATACATGCTTAACGTAAT	CAACGTAATCAACAGAAATATATGATAATCATC				
Consensus	(135)	CGTCATGCATACATGTTAAATTAATACATGCTTAACGTAAT	CAACGTAATCAACAGAAATATATGATAATCATC				
060317-08_G19_Malu-gst1-M13F.ab1	(202)	210	220	230	240	250	268
gst	(190)	CCAAGACCGGCAACAGGATTCAAATCTTAAGAAACTTTAT	TGCCAAAATGTTGAACGATCGGGGAAA				
Malu-gst1-M13R	(1)	CCAAGACCGGCAACAGGATTCAAATCTTAAGAAACTTTAT	TGCCAAAATGTTGAACGATCGGGGAAA				
Consensus	(202)	GCAAGACCGGCAACAGGATTCAAATCTTAAGAAACTTTAT	TGCCAAAATGTTGAACGATCGGGGAAA				
060317-08_G19_Malu-gst1-M13F.ab1	(269)	280	290	300	310	320	335
gst	(257)	TCGAGCTCGGTACCCCTAATATCCAGTGAGTCCAGATGC	ATCATGTAACCTATATAGATCTGATTGT				
Malu-gst1-M13R	(1)	TCGAGCTCGGTACCCCTAATATCCAGTGAGTCCAGATGC	ATCATGTAACCTATATAGATCTGATTGT				
Consensus	(269)	TCGAGCTCGGTACCCCTAATATCCAGTGAGTCCAGATGC	ATCATGTAACCTATATAGATCTGATTGT				
060317-08_G19_Malu-gst1-M13F.ab1	(336)	336	350	360	370	380	402
gst	(324)	ACTTGGCGCTGTGCTTACGGCTTGCAGTTTCAGGACG	TGTCAA-TCTGATCTAGTGAACCC				
Malu-gst1-M13R	(37)	ACTTGGCGCTGTGCTTACGGCTTGCAGTTTCAGGACG	TGTCAA-TCTGATCTAGTGAACCC				
Consensus	(336)	ACTTGGCGCTGTGCTTACGGCTTGCAGTTTCAGGACG	TGTCAA-TCTGATCTAGTGAACCC				
060317-08_G19_Malu-gst1-M13F.ab1	(403)	403	410	420	430	440	450
gst	(390)	TGTTATGGTCCACCACATATATGAGCATCAGCGAGTTTAT	CCCATTAAGCTGTTTCGGCCAA				
Malu-gst1-M13R	(103)	TGTTATGGTCCACCACATATATGAGCATCAGCGAGTTTAT	CCCATTAAGCTGTTTCGGCCAA				
Consensus	(403)	TGTTATGGTCCACCACATATATGAGCATCAGCGAGTTTAT	CCCATTAAGCTGTTTCGGCCAA				
060317-08_G19_Malu-gst1-M13F.ab1	(470)	470	480	490	500	510	520
gst	(457)	CTTCTTGGCATCTGCTCTCTCTGTCAAATGACGCCACAT	TAAACATTTCCCTCGTTTAGATTAGCTAGA				
Malu-gst1-M13R	(170)	CTTCTTGGCATCTGCTCTCTCTGTCAAATGACGCCACAT	TAAACATTTCCCTCGTTTAGATTAGCTAGA				
Consensus	(470)	CTTCTTGGCATCTGCTCTCTCTGTCAAATGACGCCACAT	TAAACATTTCCCTCGTTTAGATTAGCTAGA				


```

Section 17
060317-08_G19_Malu-gst1-M13F.ab1 (1073) 1073 1080 1100 1110 1120 1139
gst (1072) AAAAAAAAAAGCACAAAAATTTAAAAACCTTTTAAATTTGTTAGATTTTGGATCCTCTAGAG-TCGA CCTG
Malu-gst1-M13R (773) AAAAAAAAAAGCACAAAAATTTAAAAACCTTTTAAATTTGTTAGATTTTGGATCCTCTAGAGCTCGAGTAG
Consensus (1073) AAAAAAAAAAGCACAAAAATTTAAAAACCTTTTAAATTTGTTAGATTTTGGATCCTCTAGAG TCGA G

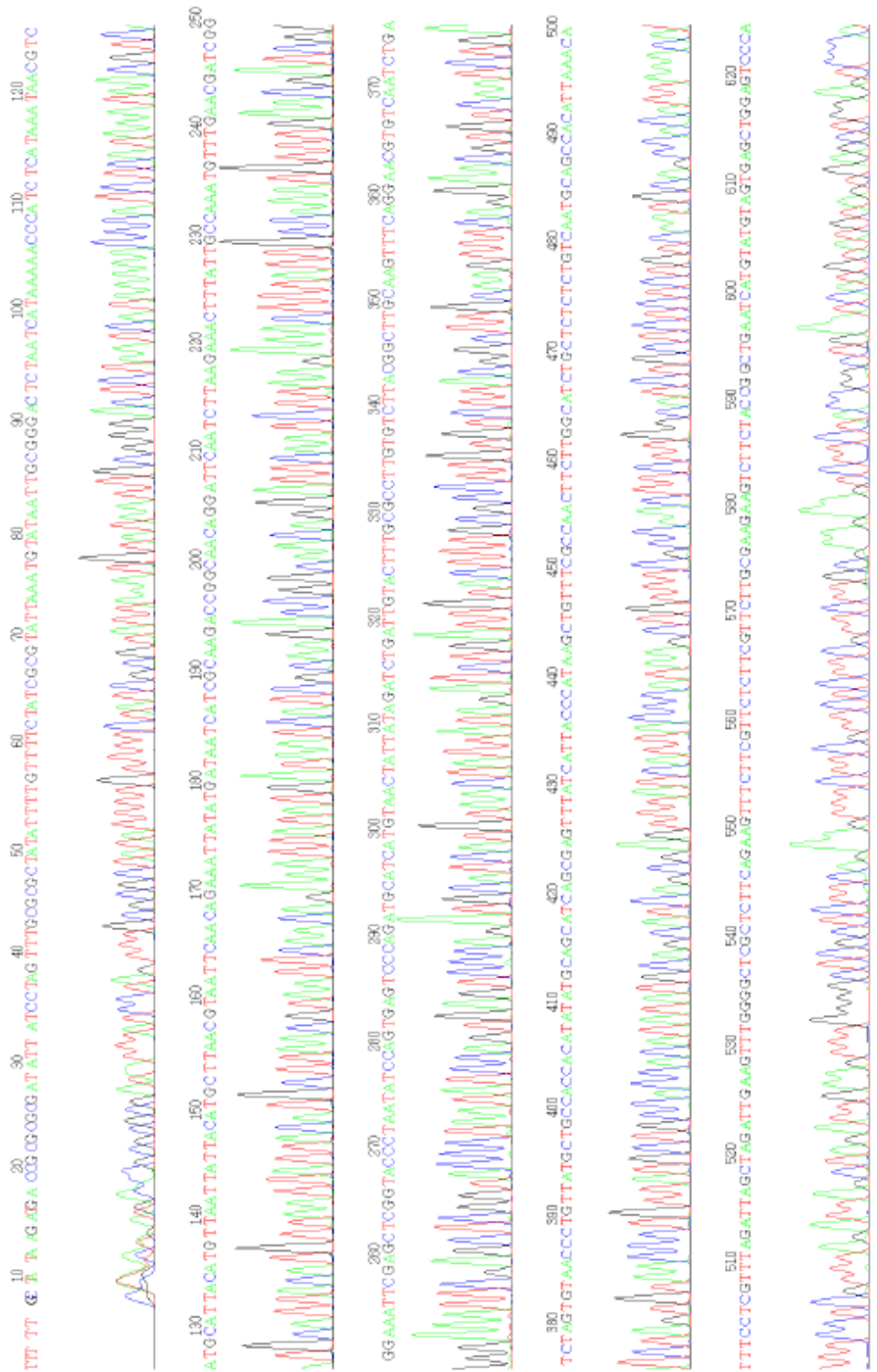
Section 18
060317-08_G19_Malu-gst1-M13F.ab1 (1140) 1140 1150 1160 1179
gst (1138) CAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTT
Malu-gst1-M13R (840) CTGGGTATCGTCACTTT
Consensus (1140) C GG C T

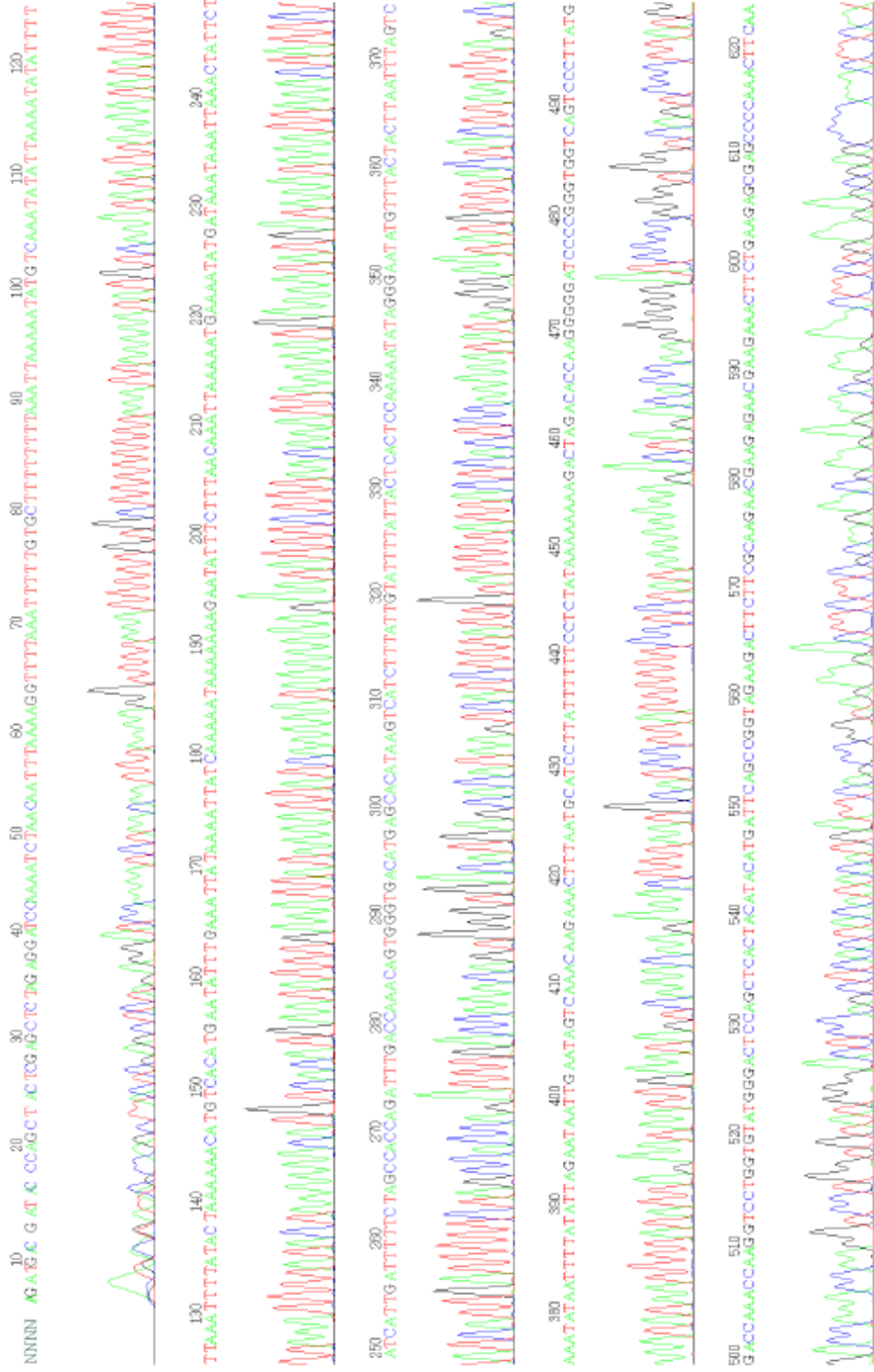
```

Anexo 10.11 CROMATROGRAMA pCIP65



File: 060317-08_G19_Main-gst1-M13F.ab1 Run Ended: 2006/3/17 23:14:54 Signal G: 2443 A: 2939 C: 2716 T: 3913
 Sample: Main-gst1_M13F Lane: 74 Base spacing: 13.64 854 bases in 10157 scans Page 1 of 2





ANEXO 10.12

Sequence report

Sequence alignment from synth. gene order by Dr. Condori

gene Avr3a-CIP 417 bp

cloned in pCR-Script-Amp

orientation M13fwd - gene - M13rev

```

      1          11          21          31          41          51          61
Avr3a-CIP.txt: ggatccccgg gtggtcagtc cttatggac caaaccaagg tcttggtgta tgggactcca
gctcactaca
K44_M13r.ab1: GGATCCCCGG GTGGTCAGTC CCTTATGGAC CAAACCAAGG TCCTGGTGTA TGGGACTCCA
GCTCACTACA

      71          81          91          101         111         121         131
Avr3a-CIP.txt: tacatgattc agccggtaga agacttcttc gcaagaacga agagaacgaa gaaacttctg
aagagcgagc
K44_M13r.ab1: TACATGATTC AGCCGGTAGA AGACTTCTTC GCAAGAACGA AGAGAACGAA GAAACTTCTG
AAGAGCGAGC

     141         151         161         171         181         191         201
Avr3a-CIP.txt: cccaaacttc aatctagcta atctaaacga ggaaatgttt aatgtggctg cattgacaga
gagagcagat
K44_M13r.ab1: CCCAACTTC AATCTAGCTA ATCTAAACGA GGAAATGTTT AATGTGGCTG CATTGACAGA
GAGAGCAGAT

     211         221         231         241         251         261         271
Avr3a-CIP.txt: gccaaagaagt tggcgaaaca gcttatgggt aatgataaac tcgctgatgc tgcataatg
tggtggcagc
K44_M13r.ab1: GCCAAGAAGT TGGCGAAACA GCTTATGGGT AATGATAAAC TCGCTGATGC TGCATATATG
TGGTGGCAGC

     281         291         301         311         321         331         341
Avr3a-CIP.txt: ataacagggt tacactagat cagattgaca cgttcctgaa acttgcaagc cgtaagacac
aaggcgcaaa
K44_M13r.ab1: ATAACAGGGT TACTACTAGAT CAGATTGACA CGTTCCTGAA ACTTGCAAGC CGTAAGACAC
AAGGCGCAAA

     351         361         371         381         391         401         411
Avr3a-CIP.txt: gtacaatcag atctataata gttacatgat gcatctggga ctcaactggat attagggtag
cgagctc
K44_M13r.ab1: GTACAATCAG ATCTATAATA GTTACATGAT GCATCTGGGA CTCACTGGAT ATTAGGGTAC
CGAGCTC
```