



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Obtención de papa (*Solanum tuberosum*) genéticamente modificada
expresando proteínas antimicrobianas”**

Tesis que presenta

ING. JESSICA CITLALLI CEDILLO JIMÉNEZ

Para Obtener El Grado De

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de tesis:

DRA. BEATRIZ XOCONOSTLE CÁZARES (CINVESTAV)

Asesores

Dr. Roberto Ruiz Medrano (CINVESTAV)

Dr. Jesús Hinojosa Moya (BUAP)

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE DE 2015

Agradecimientos

A Gerardo Cedillo, Verónica Jiménez y Alexis Cedillo, por su apoyo incondicional, por siempre estar junto a mí en los momentos más difíciles y sobre todo por su amor y su ejemplo de superación.

A Felipe Israel Villavicencio por apoyarme en esta decisión y este proyecto, por tu paciencia y por esperarme día a día, eres una gran motivación y me siento orgullosa de ti.

A Leonor del Canto, Luis del Canto, Rodrigo del Canto y Sergio Gutiérrez, por brindarme un espacio en su hogar y su familia, por siempre apoyarme sin pedirme nada a cambio, sin su ayuda seguro que esto no hubiera sido posible, estoy infinitamente agradecida y este trabajo también es de ustedes.

A Socorro Aguilar, Luis Felipe Villavicencio, Benjamín Villavicencio y Fabiola Villavicencio por formar parte de mi nueva familia y por el apoyo en estos momentos.

A la Doctora Beatriz Xoconostle y al Doctor Roberto Ruiz por permitirme trabajar en su laboratorio, por su confianza brindada y apoyo incondicional, sin duda me llevo muchas experiencias buenas y sobretodo y lo más importante el aprendizaje y conocimiento generado durante todo este tiempo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Estela, Lulú, José Luis, Bety, Apolo, Moni, Roberto, Jorge, Diego, Lilian, Angie, Vale, Josué, Humberto, Miguel, Rebe, Brenda, Bruno, Martín, Eduardo, Alex, David, Ari y Lidia, por sus conocimientos y su ayuda en el proyecto, por hacer agradable mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos de generación: Fernanda, Laura, Abraham, Anluí, Enrique, Sarita, Lety, Anamarel, Azucena, Jesús, Fany, Andrés, gracias por los arduos momentos de trabajo y también por los momentos de fiesta.

A Diego Garfías por ser un excelente amigo y un gran chico, gracias por todo tu apoyo, llegaste caído del cielo para ayudarme en los momentos más críticos y quiero que sepas que llegarás muy lejos, gracias por tu dedicación y tu empeño en el laboratorio, estoy orgullosa de ti.

A la Doctora Alma Rosa Bocanegra, gracias por estar siempre pendiente de mí, y sobre todo por su amistad.

A Conacyt por el financiamiento de mis estudios de posgrado.

Dedicatoria

A Emilio Amat Villavicencio Cedillo, porque desde tu llegada todos mis sacrificios y objetivos son pensando en ti, no deseo que seas como yo, deseo que seas mejor.

“Lo que sabemos es una gota, lo que ignoramos un inmenso océano. La admirable disposición y armonía del universo, no ha podido sino salir del plan de un ser omnisciente y omnipotente”. Newton (1643-127)

Fundador de la Física teórica clásica.

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
NOTACIÓN.....	IVX
RESUMEN.....	XVII
SUMMARY.....	XX
1.- Introducción.....	1
2.- Antecedentes.....	7
3.- Marco teórico.....	10
3.1.- Papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	10
* Descripción : Planta, Tubérculo.....	10
* Origen.....	12
* Taxonomía.....	12
* Morfología.....	13
* Tubérculos.....	13
* Hojas.....	13
* Inflorescencias.....	13
* Frutos.....	13
* Valor nutritivo.....	15
3.2.- Condiciones de cultivo.....	16
3.3.- Uso.....	17
* Alimenticio.....	17
* Medicinal.....	17
* Cosmético.....	17
* Usos no alimentarios.....	17
3.4.- Cultivo en México.....	18
3.5.-Estrés biótico y abiótico.....	19
3.6.- Zebra Chip y efectos en papa.....	20
3.7.- Control.....	22
* control cultural.....	23
* control biológico.....	24
* control químico.....	24

3.8.- <i>Candidatus liberibacter</i>	24
* Taxonomía.....	24
* Morfología.....	25
3.9.- <i>Bactericera coquerelli</i>	26
3.10.- Antimicrobianos.....	27
* Alfa-defensinas.....	27
* Beta-defensinas.....	28
3.11.- Lisozima.....	28
3.12.- Defensina y Lisozima como péptidos antimicrobianos.....	29
3.13.-Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos Defensina y Lisozima.....	30
3.14.- Transporte de antimicrobianos Defensina y Lisozima en floema mediante CsPP16.....	31
3.15.- Transformación genética de plantas.....	32
3.16.- Construcción de un vector.....	33
3.17.- GFP (<i>Green Fluorescent Protein</i>).....	34
3.18. - <i>Western immunoblot</i>	34
3.19.- Transformación genética por <i>Agrobacterium Tumefaciens</i>	35
3.20.-Mecanismo que utiliza <i>Agrobacterium</i> para transferir ADN a células vegetales.....	36
3.21.- Cultivo in vitro.....	39
3.22.- Hormonas como reguladores de crecimiento.....	39
3.23.- Auxinas.....	40
3.24.- Citocininas.....	40
* BAP (6 bencilaminopurina).....	40
* Cinetina (6 furfurilamino purina).....	41
3.25.- Microscopia confocal.....	42

4.- Justificación.....	43
5.- Hipótesis.....	44
6.- Objetivos.....	44
6.1.- Objetivo general.....	44
6.2.- Objetivos específicos.....	44
7.- Estrategia experimental.....	45
8.- Materiales y métodos.....	46
8.1- Etapa 1.....	46
* Diseño de construcciones genéticas.....	46
* Amplificación de genes.....	47
* Clonación de genes en el vector de entrada PCR™ 8/GW/TOPO.....	47
* Medios y soluciones para clonación de fragmentos y transformación en células <i>E. Coli</i> DH 5α competentes.....	48
* Medio de cultivo para bacteria <i>E.coli</i> DH 5α.....	48
* Compuestos utilizados para la selección de clones.....	48
* Preparación de células de <i>E. coli</i> DH 5α competentes.....	49
* Transformación en <i>E. coli</i> DH5α.....	50
* Obtención de ADN plasmídico mediante lisis alcalina.....	51
* Digestión enzimática y separación de productos por electroforesis.....	52
* Purificación de plásmido.....	53
* <i>Determinación de la orientación del inserto</i>	54
* Digestión enzimática de vector de entrada para linealizar.....	56
* Recombinación sitio específica Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix....	56
* <i>Extracción de DNA plasmídico con ZR Plasmid Miniprep™</i>	58
* Clonación de genes en vector de expresión en planta pB7 GW2.0 y pB2GW7.0.....	59
8.2.- Etapa 2.....	60
* Transformación en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por electroporación.....	60
* Material biológico.....	61
* Propagación <i>in vitro</i> de papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	61
* Protocolo de transformación de explantes de papa con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GL1.....	62
* Selección y Regeneración de plantas transformadas.....	63

8.3.- Etapa 3.....	64
* Análisis de las plantas genéticamente modificadas.....	64
* Extracción de DNA de las plantas GM - Aislamiento de DNA genómico mediante CTAB (Hexadeciltrimetilamonio) (Doyle & Doyle 1987).....	65
* PCR para confirmar el fragmento de interés en el ADN extraído.....	66
* Traspaso de plantas positivas <i>in vitro</i> a invernadero.....	68
* Fusión de Defensina con el gen reportero GFP (Green Fluorescent Protein).....	68
* Detección de la proteína GFP (Green Fluorescent Protein) fusionada a Defensina 16K mediante Western immunoblot.....	69
* Extracción de proteína.....	69
* Electroforesis en gel desnaturizante (SDS-PAGE).....	70
* Inmunodetección - Bloqueo de la membrana.....	71
* Microscopia confocal.....	72
9.- Resultados y discusión.....	73
10.- Conclusiones.....	99
11.- Perspectivas a futuro.....	101
12.- Anexos.....	102
13.- Bibliografía.....	123

Índice de tablas

Tabla1.- Explantes transformados.....	83
Tabla 2.- Explantes sobrevivientes a medios de selección.....	87
Tabla 3.- Explantes positivos a la transformación.....	92
Tabla 4.- Explantes transformados con GFP.....	94

Notación

ADN-T	ADN de transferencia
AIA	Ácido Indol Acético
AIB	Ácido indolbutírico
AS-Trehalasa	Trehalasa Antisentido
BAP	Bencilaminopurina
BM	Banco de México
CaMV 35S	Virus Mosaico de la coliflor
CLs	<i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>
CmPP16	Cucurbita máxima
CTAB	Hexadeciltrimetilamonio
CONPAPA	Comité Nacional Sistema Producto Papa
Def	Defensina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Dinucleótidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FMI	Fondo Monetario Internacional
Gen NOS	Nopalina sintasa de <i>A. tumefaciens</i>
HNP	Human neutrophil peptides

HD	Defensina Humana
HBD	Beta - Defensina Humana
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ITESM	Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey
kDa	Kilo Dalton
Kg, g, mg,	Kilogramo, gramo, miligramo
LB	Luria Bertani
L, mL, μ L,	Litro, mililitro, microlitro
LYZ	Lisozima
MS	Murashige, T. y Skoog
m, cm, mm, μ m, nm	Metro, centímetro, milímetro, micrómetro, nanometro
M, mM	Molar, milimolar
min	Minuto
NOAA	National Oceanic and Atmospheric Administration
OMG	Organismo Genéticamente Modificada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMP	Punta morada de la papa
RNA	Ácido ribonucleico
r.p.m	Revoluciones por minuto
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
SRM	Medio de regeneración
t/ha	Tonelada por hectárea
Ti	Plásmido Ti
UV	Ultra Violeta
2IA	2-Isopentiladenin
ZC	Zebra Chip

Resumen

La papa (*Solanum tuberosum*) es una hortaliza muy importante, por la cantidad de carbohidratos que aporta a la alimentación de la población en general. El consumo per cápita de papa en México es de 17 kilogramos, pero las importaciones de Canadá y los Estados Unidos no han dejado de aumentar en los últimos años, y en 2006 llegaron a 65 000 toneladas de papa fresca y 122 000 toneladas de productos congelados.

La brotación anormal de los tubérculos y el rayado interno de los mismos, son síntomas de una enfermedad que está afectando la producción de papa en México, en el suroeste de Estados Unidos y América Central.

Los síntomas de la enfermedad conocida como punta morada de la papa (PMP) en México son similares a “Zebra Chip” en los Estados Unidos. Los síntomas de la PMP se caracterizan por una disminución notable en el crecimiento de la planta, formación de tubérculos aéreos y aparición de color morado en hojas superiores. El nombre de “Zebra Chip” que se le ha dado en Estados Unidos se debe al manchado interno de los tubérculos en forma de estrías. Se ha demostrado que los síntomas descritos previamente pueden estar asociados a la presencia de fitoplasmas (Almeyda y col., 1999; Cadena y col., 2003; Maramorosch, 1998), o bien pueden ser provocados por la infección de una bacteria, cuyo nombre propuesto es el de *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Liefting y col., 2008).

Diversas estrategias han sido implementadas para la eliminación de “Zebra Chip”, sin embargo, no existe a la fecha un tratamiento eficaz que sea capaz de erradicar esta enfermedad. Existen limitantes en el tratamiento de enfermedades causadas por patógenos que se desarrollan en el floema ya que los agentes químicos y biológicos usados para su control generalmente no tienen acceso a este tejido, en particular a los elementos cribosos que albergan el patógeno. En este trabajo, se propone la expresión de las proteínas Defensina y Lisozima en todos los tejidos y en floema de papa fusionadas a la proteína de floema CsPP16, que es capaz de transportarse a larga distancia a través de dicho tejido. Se determinará si esta fusión proteica es capaz de proporcionar resistencia contra Zebra Chip en papa.

Por otra parte existen problemas importantes en el cultivo, ya que la papa es susceptible a bajas temperaturas, para este fin se propone la transformación genética de este cultivo con una construcción genética que le proveerá de resistencia a frío y sequía.

En zonas productoras de papa como el Valle de Toluca y otras regiones, las temperaturas disminuyen bajo cero en invierno, y aún dentro del invernadero, donde los cultivos se protegen del estrés abiótico, se obtienen tubérculos pequeños, lo que ocasiona daños en la productividad, así como incremento en los costos de producción. Dentro de los factores importantes de estrés

que enfrentan las plantas, son las altas y bajas temperaturas (Mora-Herrera y col., 2005).

Para los problemas que tienen diversas plantas con frío y sequía se ha reportado que el azúcar Trehalosa es capaz de conferir a plantas resistencia a sequía y a frío.

Se pretende utilizar la tecnología de silenciamiento génico mediante el uso de un RNA de interferencia para el gen antisentido que codifica para la enzima Trehalasa (Cedillo Jiménez y col., 2012; Agreda Laguna y col., 2012) la cual es la responsable de hidrolizar a la Trehalosa en dos moléculas de glucosa y en este proyecto se desea la acumulación de dicha azúcar en vez de que sea hidrolizada.

El silenciamiento de la enzima que hidroliza el azúcar protector permitirá acumular a este carbohidrato, teniendo una mejor protección contra el estrés abiótico.

Summary

The potato (*Solanum tuberosum*) is an important crop due to, the amount of carbohydrate that provides to the feeding of the population. The consumption per capita of potato in Mexico is 17 kg, but it is imported from Canada and the United States. In recent years, such import has increased to reach 65 000 tons of fresh potato and 122 000 tons of frozen products in 2006. The abnormal sprouting of tubers and shredded them inside, are symptoms of a disease that is affecting potato production in Mexico, in the Southwestern United States and Central America. The symptoms of the disease known as purple top of potato (PMP) in Mexico are similar to "Zebra Chip" in the United States. The symptoms of the PMP are characterized by a noticeable decrease in the growth of the plant, aerial tubers formation and appearance of purple on the upper leaves. The name of "Zebra Chip" which has been given in the United States, since the tubers are spotted in the form of stretch marks. It has been shown that the symptoms described previously may be associated with the presence of phytoplasmas (Almeyda et al., 1999; Chain et al., 2003; Maramorosch, 1998), or it may be caused by a bacterial infection which proposed name is *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Liefing et al., 2008).

Different strategies have been implemented for the elimination of "Zebra Chip" disease; however, does not exist to date an effective treatment that is capable of eradicating this disease. There are limitations in the treatment of

diseases caused by pathogens that are developed in the phloem since chemical and biological agents used to control generally do not have access to this tissue, in particular to the sieve elements that contain the pathogen. In this work, it is proposed the expression of the proteins Defensin and lysozyme translationally fused to the phloem protein Csp16, which is able of carrying the fused antimicrobial proteins to the vasculature.

In producing areas of potato such as Toluca Valley in Central México, temperatures decrease below zero in winter, and even inside the greenhouse the winter impacts plant productivity, thus producing small tubers, and increasing the costs of production. The extreme temperatures are the most important stress factors faced by plants (Lal et al., 2005).

It has been described the Trehalase accumulation in plants provides tolerance to abiotic stress. However, this sugar is hidrolized by the enzyme Trehalasa. The use of RNA interferent technology for silencing Trehalasa expression will be also addressed, which was described as useful for maize drought tolerance. (Cedillo Jiménez et al., 2012; Agreda Laguna et al., 2012.

1.- Introducción

El tubérculo *Solanum tuberosum* L (papa), está catalogado como un alimento muy importante en el consumo en fresco y procesado, el tubérculo forma parte de la dieta mexicana y ocupa el cuarto lugar en el consumo después del maíz, frijol, trigo y arroz. De acuerdo con los reportes de CONAPAPA en el 2009 de las 63 mil 919 ha anuales que se siembran en el país, sólo el 20% de la superficie utiliza semilla calificada (registrada, certificada y habilitada). Arellano y colaboradores en el 2010 determinaron que la semilla es el insumo más importante en todo cultivo, concluyendo que la disponibilidad de semilla sana y de buena calidad es uno de los principales factores que limitan la producción.

En nuestro país, *Solanum tuberosum* L., está considerado como un cultivo importante pues su derrama económica representa el 1% del Producto Interno Bruto total y el 2.6% del Producto Agropecuario del país (ITESM, 2003). Praga Torres en el 2010 menciona en su trabajo que en países en desarrollo el consumo de papa por persona aumentó de 10 kg (1961–1963) a 21.5 kg en 2003; Además también menciona que el consumo per cápita en comparación con países desarrollados es bajo comparado con países desarrollados, en donde el consumo anual es de 93 kg por persona (Bayer, 2008).

Las comidas rápidas, entre las cuales tenemos a las papas fritas han tenido gran apogeo desde la década de los 90's, Praga en el 2008 reporta que en México se han importado diferentes variedades de papa con expectativas muy altas en la calidad industrial pero con susceptibilidad a enfermedades entre las cuales se encuentran el tizón tardío, tizón temprano, enfermedades de la raíz, virosis, etcétera (Parga, 2008). Uno de los factores más importante es el llamado síndrome de la punta morada de la papa (PMP) el cual ha sido considerado como un problema fitopatológico primordial en la producción de papa en la región noreste de México; este síndrome es ocasionado por diferentes factores bióticos, entre los primeros se encuentran los fitoplasmas (Maramorosch, 1988), virus (Salazar, 1995), hongos (Garza,1999) y recientemente la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*, dicho patógeno causa enfermedades en especies de la familia Solanaceae, como el tomate *Solanum lycopersicum* L. y la papa; esta bacteria es transmitida por el psílido *Bactericera cockerelli* y estos análisis se han descrito en el 2008 por Hansen y colaboradores.

Zebra Chip fue identificada en México por primera vez en 1994 en el norte de Saltillo, Coahuila, México, los registros iniciales de la enfermedad en los Estados Unidos se mostraron en el año 2000 en los campos de papa en el sur de Texas y se han identificado campos infectados de papa en varios otros estados, incluyendo Nebraska, Colorado, Kansas, Wyoming, Nuevo México, Arizona, Nevada y California (Munyanza y cols., 2007, Secor y cols. 2009) Figura 1.

Flores y Colaboradores mencionan que a fines de los años 90's, se tuvieron reportadas pérdidas del 35% en el norte de México por la baja calidad del producto, estas pérdidas fueron consecuencias del manchado interno del tubérculo causado por este síndrome, también provocó en el 2004 más del 50% de pérdidas en producción y hasta el 100% en calidad (Flores y cols., 2008).

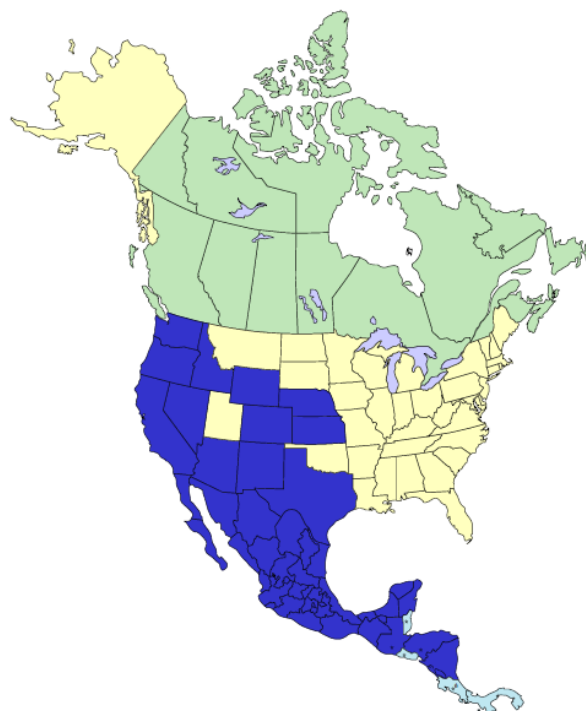


Figura 1.- Mapa que muestra la distribución geográfica de la enfermedad Zebra Chip en el norte y Centro de América (Covarrubias y cols., 2011).

Actualmente en el Noreste de México para producir papa, se requieren de 30 a 50 aplicaciones de insecticidas, con el fin de controlar los principales virus y fitoplasmas.

Es preocupante la contingencia que puede ocasionar el uso de estos agroquímicos además de representar un costo extra en la producción del cultivo.

Por otro lado la sequía es una importante limitación que ejerce el medio ambiente sobre la producción de este tubérculo; la sequía está definida como el periodo prolongado de clima anormalmente seco y es un factor que interviene directamente en las actividades humanas (NOAA, 2003).

Hernández y colaboradores describen que México por su localización geográfica, es sumamente vulnerable a la acción desafortunada de las sequías. Se tiene conocimiento que desde las primeras civilizaciones prehispánicas, se padecía en sus diferentes manifestaciones (Hernández y col., 1992). En la figura 2 se describen cinco áreas del país tienen sequía severa (Figura 2).

SEMARNAT ha publicado que se estiman mayores incrementos en sus temperaturas entre 2020 y 2050 en los estados de Guanajuato, Estado de México, San Luis Potosí, Tlaxcala y Veracruz, afectando sin lugar a dudas las actividades humanas (SEMARNAT, 2009).

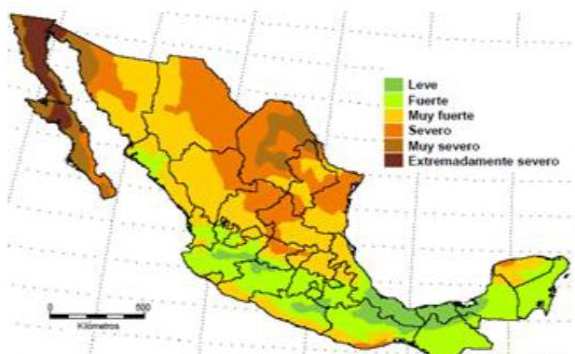


Figura 2.- Índice de severidad de sequía meteorológica.
Escenario actual. INEGI

Como efecto del cambio climático SAGARPA ha registrado eventos desorbitantes de las sequías y heladas afectando negativamente los precios de los alimentos y provocando crisis internacional pues nuestro país está sujeto a los eventos climáticos jugando un rol de importancia para organismos internacionales como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el Fondo Monetario Internacional (FMI) y el Banco Mundial (BM) que se han preocupado por los efectos en la población con condiciones en pobreza (SAGARPA, 2012).

Nuestro país no puede seguir apostando a las importaciones sin involucrarnos en la mejora y en la competitividad de la producción nacional de alimentos pues esta confianza fomenta a que México se vuelva más vulnerable a los cambios de precios mundiales. Con estos argumentos y por los efectos que ejerce el cambio climático sobre la agricultura, uno de los principales retos para el siglo XXI es la producción suficiente de este tubérculo.

2.- Antecedentes

Por su gran interés agrícola y económico la papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los principales cultivos de cosecha a nivel mundial, sin embargo, existen grandes pérdidas debido tanto a factores bióticos como abióticos. Entre los factores bióticos que más dañan a la papa se encuentran, las plagas y los patógenos (Atkinson y col., 2001).

El uso de biotecnología moderna aplicado a mejoramiento genético de plantas, ofrece nuevas alternativas para el control de plagas y patógenos, así como para la generación de materiales con características agronómicas ventajosas al lograr transferir material genético exógeno (transgen) que le confiera nuevas características deseadas (Lawrence, 2002).

En plantas de papa, es posible la transformación genética de diferentes cultivares comerciales, a partir de segmentos de tallo y hojas desarrolladas *in vitro*, anteras y de discos de microtubérculos (Gómez y col., 1997; Rodríguez y col, 2000; Trujillo y col., 2001).

Hasta el momento, se han utilizado métodos convencionales de mejoramiento genético y no se han podido obtener variedades comerciales resistentes a esta bacteria. Sin embargo, la ingeniería genética ofrece una

real oportunidad de hacerlo, insertando en la planta genes específicos para la expresión de proteínas de interés.

En este trabajo se propone emplear los genes que codifican para las proteínas lisozima y defensina humanas. Ambas proteínas reportan propiedades antimicrobianas y pertenecen al sistema inmune innato en humanos, se tiene reportado que estas proteínas protegen de infecciones microbianas debido al mecanismo de desestabilización de membranas de los patógenos (Brul y col., 1999).

La lisozima y defensina pertenece al sistema inmune innato, este sistema es la primera barrera inmunológica de nuestra especie. Ambas proteínas se sintetizan de manera constante en nuestro epitelio y se secreta en los fluidos corporales tales como saliva, sudor, lágrimas, mucosidades y está presente en el aparato digestivo (Alberts y col., 2002).

Por otro lado, para proveer de tolerancia a la sequía y al frío en trabajos anteriores se ha encontrado que la acumulación de un azúcar (trehalosa) permite la tolerancia a la sequía y al frío, por lo que se propuso introducir ese gen con mayor rapidez empleando ingeniería genética, pero sin introducir proteínas adicionales como marcadores de selección, tomando la propiedad que la tolerancia a sequía es un marcador dominante.

La Trehalosa ha demostrado ser un osmoprotector importante en una gran variedad de organismos, se sabe que la trehalosa se acumula en altas concentraciones en organismos tolerantes, como plantas xerófitas, lo cual le permite sobrevivir a la deshidratación.

Asimismo, se emplea en criopreservación. Se ha hipotetizado que la trehalosa preserva membranas durante periodos de sequía, además previene el desdoblamiento de proteínas (Crowe y col., 1984).

3.- Marco teórico

3.1 Papa (*Solanum tuberosum*)

Descripción

* Planta

La papa (*Solanum tuberosum*) es una herbácea anual que alcanza una altura de un metro y produce un tubérculo llamado papa, con abundante contenido de almidón ocupando el cuarto lugar mundial en importancia como alimento, después del maíz, el trigo y el arroz (FAO; 2008).



Figura 3.- Planta de papa (*Solanum tuberosum*) mostrando flores y frutos

* Tubérculo

Al crecer, las hojas de la planta de la papa producen almidón, el cual se desplaza hacia la parte final de los tallos subterráneos, también llamados estolones. Estos tallos sufren un engrosamiento y así se producen unos cuantos o hasta 20 tubérculos cerca de la superficie del suelo.

El número de tubérculos que llegan a madurar depende de la disponibilidad de humedad y nutrientes del suelo (FAO; 2008).



Figura 4.- Tubérculo de papa (*Solanum tuberosum*) en la parte final de los estolones.

El tubérculo puede tener formas y tamaños distintos, y por lo general pesa hasta 300 g.

Al terminar el período de crecimiento, las hojas y tallos de la planta se marchitan y los tubérculos se desprenden de los estolones. A partir de este momento, los tubérculos funcionan como depósito de nutrientes que permite a la planta subsistir en el frío y posteriormente reverdecer y reproducirse.

Cada tubérculo tiene de 2 hasta 10 brotes laterales “ojos”, distribuidos en toda la superficie. De estos ojos brotan las nuevas plantas, cuando las condiciones vuelven a ser favorables (FAO; 2008)



Figura 5.- Brotes laterales u ojos de papa (*Solanum tuberosum*) distribuidos en la superficie del tubérculo

Origen

La papa es una planta alimenticia que procede de las culturas Incas y fue cultivada por primera vez entre los años 8000 y 5000 a. C. En el territorio peruano se encuentra la mayor cantidad de especies de papa conocidas en el mundo.

Actualmente en Perú, es el principal cultivo del país en superficie sembrada y representa el 25% del PBI agropecuario. Es la base de la alimentación de la zona andina y es producido por 600 mil pequeñas unidades agrarias. La papa llega a Europa en el siglo XVI por dos vías diferentes: una fue España hacia 1570, y otra fue por las Islas Británicas entre 1588 y 1593 expandiéndose por toda Europa (FAO; 2008).

Taxonomía

Reino: Plantae, Género: *Solanum*, División: Magnoliophyta,

Clase: Magnoliopsida, Orden: Solanales, Familia: Solanáceas y Especie:

Tuberosum.

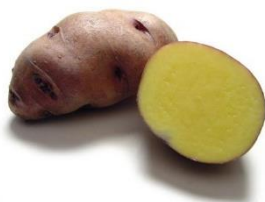


Figura 6.- Fotografía que muestra la apariencia una papa común.

Morfología

La papa es una planta herbácea, dicotiledónea, provista de un sistema aéreo y otro subterráneo de naturaleza rizomatosa del cual se originan los tubérculos.

Raíces: son fibrosas, ramificadas, finas y largas.

Tallos: son aéreos, gruesos, fuertes y angulosos, son erguidos y con el tiempo se van extendiendo hacia el suelo. Los tallos se originan en la yerma del tubérculo, siendo su altura variable entre 0.5 y 1 metro.

Rizomas: son tallos subterráneos de los que surgen las raíces adventicias. Los rizomas producen unos hinchamientos denominados tubérculos, siendo éstos ovales o redondeados.

Tubérculos: son los órganos comestibles, están formados por tejido parenquimatoso, donde se acumulan reservas de almidón. En las axilas del tubérculo se sitúan las yemas de crecimiento llamadas “ojos”, dispuestas en espiral sobre la superficie del tubérculo.

Hojas: la nervadura de las hojas es reticulada, con una densidad mayor en la vena central y en los bordes del limbo. Las hojas poseen tricomas también presentes en toda la parte aérea.

Frutos: En forma de baya redondeada de color verde de 1 a 3 cm de diámetro, que se tornan amarillos al madurar.

Inflorescencias: están situadas en la extremidad del tallo y sostenidas por un escapo floral. Es una planta autógama, y las flores son gamopétala de color blanco, rosado o violeta. Cabe señalar que el proceso de floración es complejo, ya que la planta crece predominantemente por propagación vegetativa (Jose F. Morales; 2006).

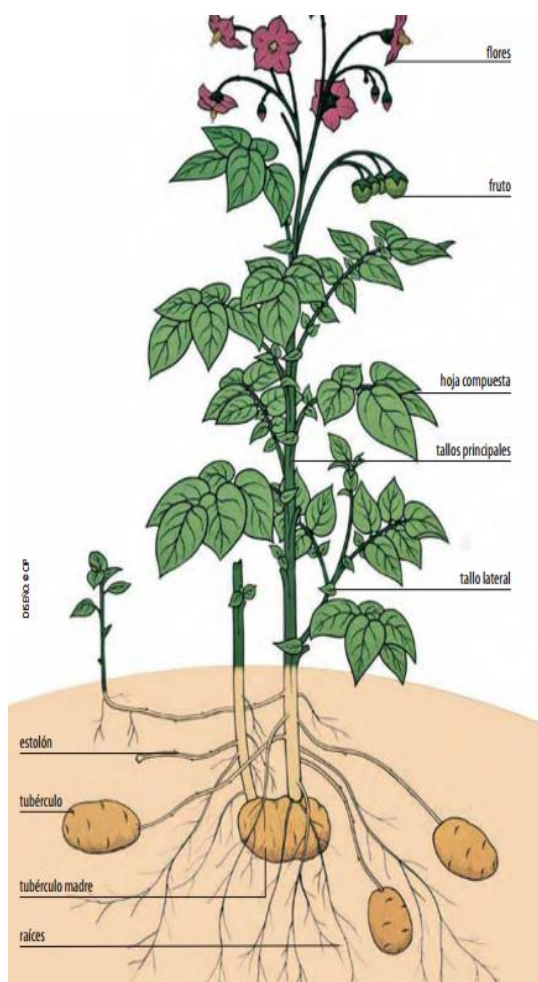


Figura 7.- Morfología de la planta mostrando sus partes aéreas y subterráneas. Tomado de <http://www.fao.org/potato>.

Valor nutritivo

En la figura ocho podemos observar que el tubérculo está comprendido por un 25% de parte seca y entre 72-75% de agua. En cada 100 g de parte seca, encontramos 84 g de carbohidratos, 14 g de proteínas y 0.1 g de grasa. La FAO tiene reportado que por cada kilogramo de papa este aporta a la dieta 800 calorías y 20 g de proteínas. Asimismo un kilogramo de papa cocinada con cáscara contiene 0.9 mg de vitamina B1, 15 mg de vitamina B2, 120 mg de vitamina C, 8 mg de fierro, 5,600 mg de potasio y 77 mg de sodio (FAO.2008).



Figura 8.- Contenido en vitaminas, minerales, carbohidratos, proteínas y agua de la papa.

3.2 Condiciones de cultivo

La pureza de los cultivares y la salud de los tubérculos semilla son esenciales para obtener una buena cosecha. El tubérculo semilla debe estar libre de enfermedades, tener buenos brotes y pesar de 30 a 40 g. El uso de semilla comercial de buena calidad puede aumentar la producción del 30% al 50% (FAO., 2008).

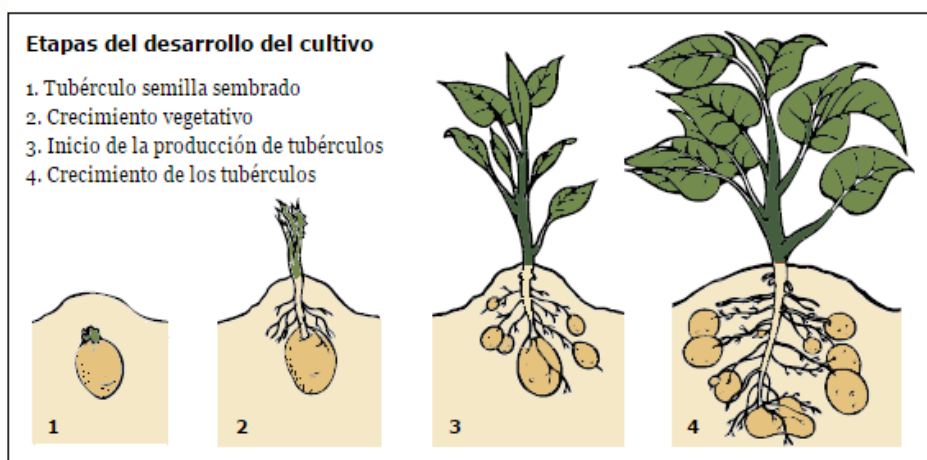


Figura 9.- Etapas del desarrollo del cultivo de papa desde el tubérculo sembrado hasta el crecimiento de tubérculos. Tomada de <http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/cultivo.html>

3.3 Usos

Alimenticio: La FAO reporta que se consumió dos tercios de aproximadamente 320 millones de toneladas de papa producidas en el 2005, el tubérculo se consume de en múltiples formas ya sea cocido o frito.

Medicinal: Se tienen reportes del efecto médico del tubérculo y es usado comúnmente como antiespasmódico, hemostático, contra úlceras gástricas, reumatismo, picadura de insectos, forúnculos, quemaduras y cálculos renales.

Usos no alimentarios: FAO reporta de manera extensa como se utiliza el almidón por industrias como la farmacéutica, textil, de la madera y del papel, este se usa como adhesivo, aglutinante, texturizador y relleno. Un dato curioso es el uso del almidón para la elaboración de platos y cubiertos desechables sustituyendo al poliestireno, por otro lado la cáscara de la papa y desechos de almidón son licuados y utilizados para la producción de combustibles y etanol. Estudios realizados en Nueva Brunswick, Canadá productora de papa, ha reportado que de las 44 000 toneladas de desechos industriales de la papa se podrían producir de 4 a 5 millones de litros de etanol (FAO; 2008).

3.4 Cultivo en México

En México la producción de esta hortaliza es primordial. FAO reporta en 1998 la cosecha de 1.27 millones de toneladas en una superficie de 63,000 ha (FAO. Statistical Issues).

El incremento en la población nos da como resultado el aumento en la producción y el consumo en mayores cantidades de papa, se sabe que en Europa se consume un promedio de 86 Kg de papa por persona y en México es de 12 Kg dando un rendimiento de 20.2 t/ha, este aumento en la producción se da de manera constante pero la superficie cultivada no es la suficiente para la magnitud necesaria.

Se sabe que el 80% de la papa que se consume en el país es importada, por lo que de no llegar se provocará un desabasto y eso disparará el precio del tubérculo.

El país no debe seguir apostando a las importaciones pues esto lo vuelve vulnerable ante cualquier cambio climático o estrés ambiental y estos cambios son siempre importantes en la producción agrícola sobretodo en la producción de alimentos básicos como el maíz, frijol y papa.

3.5 Estrés biótico y abiótico

Las plantas en su ambiente general están expuestas a diversos cambios adquiriendo estrategias de adaptación, las cuales dependen de las condiciones climáticas y del suelo, así como de la capacidad genética de la planta; de tal forma que plantas diferentes pueden poseer tolerancia distinta al mismo nivel de sequía (Díaz y Antón, 2002).

Existen varias clasificaciones de los factores de estrés. En general pueden ser clasificados como estrés biótico y abiótico (Brey y Weretilnyk, 2000).

El **estrés abiótico**, depende del agente causal, pueden dividirse en físicos y químicos. Entre los factores físicos pueden ser por déficit o exceso de agua, temperaturas extremas como el frío, sequía, calor y congelación, y radiación UV. Entre los factores químicos destacan la contaminación atmosférica por metales pesados, toxinas y carencia de elementos minerales.

El **estrés biótico** es causado por la acción de otros seres vivos: animales, plantas, microorganismos como bacterias y hongos y otros agentes fitopatógenos como los virus.

3.6 Zebra Chip y efectos en papa

La determinación del agente causal del síntoma denominado “Zebra chip” (ZC) o “papa rayada” se ha asociado al grupo de las alfa proteobacterias dentro de las cuales se encuentra *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CLs) (Muyaneza y col., 2007; 2009).

Las plantas muestran síntomas de clorosis o crecimiento apical con decoloración y hojas enrolladas, aguda disminución de los ápices de las hojas, acortamientos de entrenudos, y retraso general del crecimiento.

Numerosos síntomas se han observado en plantas de papa afectadas por Zebra chip, los cuales incluyen retraso en el crecimiento, quemaduras en las hojas, clorosis, proliferaron las yemas axilares, formación de tubérculos aéreos, tallos retorcidos con apariencia de zigzag, nudos engrosados, decoloración vascular, y marchitez foliar, oscurecimiento del sistema vascular en las porciones subterráneas de tallos, coloraciones anormales de color café en el anillo vascular de tubérculos, necrosis a manera de pecas de los tejidos internos del tubérculo, y oscurecimiento de rayos medulares (Gudmestad y Secor, 2007; Munyaneza y col., 2007, 2009; Munyaneza, 2010).

Snyder y col. en 1946 describieron una necrosis observable en la sección o corte trasversal de tubérculos de papa como un oscurecimiento de los haces vasculares o manchas oscuras discontinuas distribuidas en la sección

transversal del anillo vascular cerca del centro y que se extendían a través de la parte final del tallo.

Los síntomas iniciales de infección son espesamiento o concentración de almidón ocasionado por el taponamiento de los rayos medulares y anillo vascular en el tubérculo de papa, más avanzada la infección estos anillos medulares se van tornando más oscuros hasta volverse de color café por la necrosis, este síntoma es claramente visible en el corte trasversal del tubérculo fresco (Figura 10). Los tubérculos afectados por Zebra chip rara vez brotan, y si lo hacen, con frecuencia producen brotes en hilacha o hilados y plantas débiles (Secor y col., 2009).

Las infecciones ocasionadas por Zebra chip reducen drásticamente la calidad de las papas y el valor comercial en el mercado. Los costos por el manejo de la enfermedad así como de su vector han producido a ambos lados de la frontera EUA-México millones de dólares en pérdidas (Gudmestad y Secor, 2007). En casos aislados, campos de papa infectados con *Candidatus Liberibacter solanacearum* han sido causa de abandono (Wenbin y col., 2009). En México y Guatemala, el síntoma ocasionado por punta morada de la papa fue catalogado como la segunda enfermedad más importante de la papa después del tizón tardío (Cadena e Hinojosa, 1996). La enfermedad reduce la comercialización para la industria de productos procesados a “papas fritas” debido a la coloración oscura de los rayos medulares durante el proceso de freído (Figura 11).



Figura 10



Figura 11

Figura 10 y 11.- Necrosis observable en el corte trasversal del tubérculo. Apariencia rallada y manifestación de Zebra chip en las hojas enrolladas color purpura.

3.7 Control

El **control cultural** abarca la rotación de cultivos, la desinfección, y otras prácticas de saneamiento son importantes para prevenir la ocurrencia de la bacteria y su diseminación (CAB International, 2006). El manejo de semilla certificada es el mejor método para evitar la infestación de cualquier enfermedad sistémica, el caso de Zebra chip no es la excepción.

En el **control biológico** se han utilizado hongos contra el insecto que transmite a la bacteria, estos tratamientos han contribuido a reducir el daño en plantas y los síntomas de la enfermedad ocasionada por Zebra chip (Lacey y col., 2011). También se ha reportado al parasitoide *Tamarixia triozae* controlando poblaciones de *B. cockerelli* con niveles de parasitismo natural mayores del 80% en cultivos de solanáceas sin la aplicación de insecticidas en varias regiones de México (Bujanos y col., 2005; Bravo y López, 2007).

En el **control químico** existen insecticidas para aplicación en follaje y en suelo que controlan estados inmaduros y adultos de *B. cockerelli* en el Comité de Sanidad Vegetal del Estado de México. Page Weir y col. en 2011, han reportado la eficacia de 11 insecticidas evaluados contra ninfas y adultos del psílido de la papa. Las aplicaciones de Abamectina y aceite, así como Bifentrina han sido efectivos contra poblaciones de adultos después de tres días de tratamientos, mientras que moléculas tales como Thiacloprid, Spiromesifen, Imidacloprid, Spinetoram y Azadiractina han sido reportados como ligeramente tóxicos para controlar al psílido de la papa. La mezcla de Abamectina y aceite, Spirotetramat, Bifentrina y Spiromesifen han sido los compuestos que controlaron mejor a los estadios ninfales (Bujanos y col., 2005; Bravo y López, 2007).

3.8 *Candidatus liberibacter*

A la enfermedad se le ha asociado al grupo de las alfaproteobacterias dentro de las cuales se encuentra *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CLs) (Muyaneza y col., 2007; 2009).

Candidatus Liberibacter solanacearum es una bacteria Gram negativa, no cultivable y restringida al floema y fue identificada por primera vez en campos de papa comerciales mexicanos en la localidad de Saltillo, Estado de Coahuila, en el año de 1994 y en las localidades de Pearsall y Rio Grande, Estado de Texas en el 2000 (Secor y Rivera, 2004; Muyaneza y col., 2007; 2009).

Taxonomía

Dominio: Bacteria, Phylum: Proteobacteria, Clase: Alphaproteobacteria, Orden: Rhizobiales, Familia: Phyllobacteriaceae, Género: *Candidatus Liberibacter*, Especie: *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CAB International, 2011).

Morfología

En la figura 12 observamos especies de “*Candidatus Liberibacter*” en imágenes de microscopía electrónica que revelan morfología de forma de bacilos (Tanaka y col., 2007). Bové en el 2006 describe que *Candidatus Liberibacter* son bacterias Gram negativas que no pueden ser cultivadas de manera in vitro y se encuentran en el tejido vascular de las plantas especialmente en el floema.

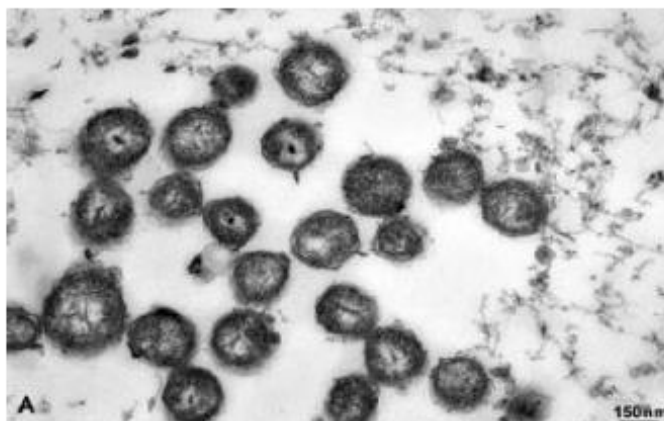


Figura 12.- Bacilos de *Candidatus Liberibacter* en imágenes de microscopía electrónica.

Candidatus Liberibacter se alberga primordialmente en *Solanum tuberosum* (papa), (Liefing, 2009). Pero se ha reportado por Liefing y col., en 2009 daños en los cultivos *Solanum lycopersicum* (tomate), *Capsicum annuum* (chile) en condiciones de invernadero en Nueva Zelanda y amarillamiento en *Daucus carota* (zanahoria) en Finlandia (Munyanza y col., 2010).

3.8 *Bactericera cockerelli*

Las liberibacterias se dispersan de plantas infectadas a plantas sanas por injerto e insectos vectores (Bové, 2006; Tanaka y col., 2007; Almeyda León y col., 2008). Se ha reportado por Hansen y col. en 2008 que *B. cockerelli* (figura 13) tiene una transmisión persistente y el insecto adquiere a la bacteria por la alimentación y posteriormente la bacteria es incorporada en la flora intestinal.



Figura 13.- Insecto vector de liberibacterias llamado *Bactericera cockerelli* en plantas de papa. Tomado de senasica.gom.mx

3.10 Antimicrobianos

Defensina

Son péptidos pequeños de 3-6 kDa, ricos en cisteína que poseen actividad antimicrobiana de amplio espectro contra bacterias, hongos y virus, además de capacidad para neutralizar toxinas. Se trata de moléculas muy conservadas, presentes en todos los vertebrados, existiendo también moléculas equivalentes en invertebrados e incluso en plantas. En humanos se diferencian dos grandes subfamilias de defensinas: alfa-defensinas y beta-defensinas (Salvador Resino; 2010).

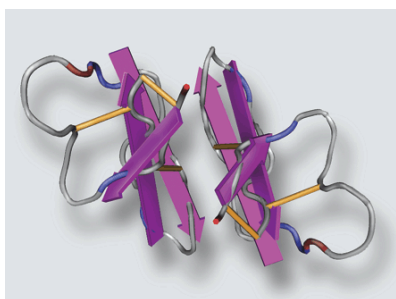


Figura 14.- Estimación probable de la forma tridimensional de las Defensinas.
Tomado de
mielartesanaldominicana.blogspot.com

* Alfa-defensinas

Salvador Resino en el 2010 describe que las alfa-defensinas (1, 2, 3 y 4) las encontramos en los neutrófilos (HNP, human neutrophil peptides). Y se ha descrito que los leucocitos también las producen, como monocitos y macrófagos. Las alfa-defensinas 5 y 6 (HD5 y HD6) son producidas fundamentalmente por las células del intestino, aunque se han encontrado también en otros tejidos como glándulas salivares, tracto genital femenino o secreciones uretrales asociadas a infecciones.

* **Beta-defensinas**

Salvador Resino describe que se han identificado 28 beta-defensinas humanas de las cuales solo seis se expresan en células epiteliales (HBD1, 2, 3, 4, 5 y 6). La HBD1 se expresa constitutivamente y las HBD2 y 3 son inducidas por virus, bacterias. La expresión de HBD4 se da de manera constitutiva y se da solo en el epitelio respiratorio. HBD5 y HBD6 se expresan específicamente en epidídimo.

Igualmente las alfa y beta defensinas son encontradas en leche materna, indicando un posible papel en proteger a los recién nacidos frente a las infecciones. (Salvador Resino; 2010).

3.11 Lisozima

La lisozima es una enzima descubierta por Fleming, está ubicada en el cromosoma 12 y la podemos encontrar en lágrimas y saliva igualmente se encuentra en el bazo, los pulmones, los leucocitos, el plasma y la leche, tiene como función actuar ante las infecciones, tiene diversos usos industriales como controlar la presencia de bacterias y podemos encontrarla en la clara del huevo de la cuál es extraída para su uso industrial (ANMAT Argentina; 2010).



Figura 15.- Estimación probable de la forma tridimensional de la Lisozima. Tomada de <http://www2.udec.cl/~jmartine/Capitulo5.htm>

3.12 Defensina y Lisozima como péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos son moléculas efectoras clave en la inmunidad innata.

Generalmente contienen de 15 a 45 residuos de aminoácidos y en su gran mayoría poseen carga positiva, además de que tienen la propiedad de ser anfipáticos. Estos péptidos son secretados por células epiteliales y leucocitos, como es el caso de los macrófagos y neutrófilos.

En la actualidad, con base en la traducción de secuencias en programas computacionales se han descrito más de 800 tipos de péptidos antimicrobianos distribuidos en los reinos animal y vegetal.

El papel principal de los péptidos antimicrobianos es la lisis directa de microorganismos (Salud Pública Méx; 2006).

3.13 Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos Defensina y

Lisozima

Lisozima

La lisozima, también llamada muramidasa, es una enzima de 14,4 kilodaltones que daña las células bacterianas catalizando la hidrólisis de las uniones beta 1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina en el peptidoglicano. La lisozima es abundante en numerosas secreciones.

Su acción catalítica consiste en la ruptura del enlace glicosídico 1-4 característico de los peptidoglicanos bacterianos, cuyo disacárido constitutivo es N-acetil glucosamina-N-acetil murámico.

Defensina

La mayoría de las defensinas son moléculas anfipáticas (2 propiedades simultáneas de las moléculas) que tienen grupos cargados positivamente de las cadenas laterales de aminoácidos y son hidrofóbicas, cadenas de aminoácidos laterales. Esto les permite interactuar con las membranas microbianas, con sus grupos de fosfolípidos cargados negativamente y cadenas de ácido graso hidrófobos. La atracción electrostática y el campo de transmembrana bioeléctrica arrastran a las moléculas de péptidos hacia la superficie y hacia dentro de la membrana, dando como resultado la formación de "agujeros de gusano de la membrana o poros". (Salud Pública Méx; 2006).

3.14 Transporte de antimicrobianos Defensina y Lisozima en floema mediante la proteína acarreadora CsPP16

La expresión de proteínas en floema está dada por una proteína de floema de *Citrus aurantifolia* (CsPP16) junto con un enlazador proteico o bisagra y una proteína con actividad antimicrobiana. La proteína de fusión CsPP16 ejerce su función mediante movimiento simplásmico producido a través de los plasmodesmos de la planta hasta llegar a los tubos cribosos del floema y la proteína antimicrobiana ya sea Lisozima o Defensina actúa eliminando el microorganismo que se asienta en el floema.

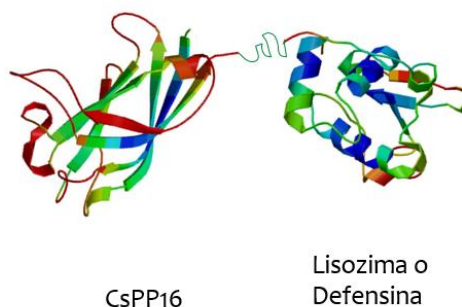


Figura 16.- Esquema de una Defensina o Lisozima fusionada a la proteína acarreadora CsPP16.

3.15 Transformación genética de plantas

Se han utilizado métodos convencionales e ingeniería genética para modificar organismos aumentando la productividad de cultivos, y las técnicas utilizadas cada día son más rápidas y precisas. Hoy en día podemos pasar información genética entre organismos que correspondan a diferentes especies. Estos experimentos nos han dado como resultado especies utilizadas en la industria y como ejemplo se encuentra biorremediación, producción de vacunas, o para la obtención de bioplásticos o de biocombustibles. Se sabe que la transformación genética puede darse con material genético del mismo o diferente organismo involucrando cultivos in vitro para poder generar un mayor número de plantas transformadas.

Las plantas transgénicas que se obtienen se someten a mejoramientos tradicionales como el cruzamiento (reproducción sexual) para transferir los genes de interés a variedades de alto rendimiento.

Para la transformación existen metodologías como la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y métodos de transformación genética directos como la Biobalística (Argen Bio; 2007).

3.16 Construcción de un vector

Un vector es una porción de ADN circular con la capacidad de replicarse y debe mantenerse en el citoplasma de la bacteria u otro organismo y en él se puede insertar el gen de interés, asimismo debe tener un sistema con el que pueda identificarse a los tejidos transformados, esto se da gracias a un gen de selección el cuál le va a dar una ventaja al crecer en un medio con antibiótico o herbicida si la célula es transgénica (Argen Bio; 2007).



Figura 17.- Esquema del diseño de un vector con promotor, gen de interés, gen de selección y terminador.

De igual manera el gen que va a ser transferido o transgén debe tener una secuencia codificante que es el gen de interés y secuencias regulatorias como los promotores (P) los cuales son responsables del nivel de expresión y el lugar en donde se expresará dicho gen y también deben estar compuestos de terminadores (T), que indican la terminación de la transcripción (Argen Bio; 2007).

3.17 GFP (Green Fluorescent Protein)

Existen proteínas fluorescentes las cuáles se utilizan en diferentes campos de microbiología permitiendo visualizar mecanismos celulares que antes eran imposibles de observar. Entre las proteínas fluorescentes tenemos a GFP *Green Fluorescent Protein* que es una proteína producida por la medusa *Aequorea victoria* y esta es capaz de emitir una luminiscencia en color verde, entonces el gen que codifica esta proteína ha sido clonado y utilizado de manera común como un marcador en biología molecular (María P Millán; Damasia Becú; 2009).

3.18 Western immunoblot

Para ubicar a una proteína en una muestra que a su vez contenga varias proteínas se puede realizar una técnica llamada Western immunoblot, en este proceso se separan las proteínas dependiendo de su peso molecular por electroforesis y después se hace uso de anticuerpos para detectar la proteína con el uso de membranas que pueden ser de nitrocelulosa obteniendo de manera específica a la proteína de interés (Towbin, H y cols. 1979).

3.19 Transformación genética por *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria que vive en el suelo y es capaz de infectar a plantas por medio de alguna herida existente en tallos o raíces, esta bacteria es responsable de la producción de tumores y a esta enfermedad le llaman “agalla de la corona” estos tumores se forman cuando *Agrobacterium tumefaciens* transfiere parte de su material genético al hospedante y de esta manera se da la transformación genética, Ana Valderrama y cols. en 2005 describen que existe un fragmento llamado ADN-T (ADN de transferencia), el cuál como su nombre lo indica es transferido a la célula vegetal donde se integra al ADN cromosómico de la planta, esta transferencia de ADN se induce por la expresión de los genes llamados vir y dentro del ADN-T se encuentran genes bacterianos que intervienen en la síntesis de fitohormonas (hormonas vegetales) que causan la proliferación celular responsable de formar los tumores y también genes que participan de la síntesis de una serie de compuestos denominados opinas, los que son secretados y utilizados como nutrientes por *Agrobacterium* (Ana Valderrama y cols; 2005).

3.20 Mecanismo que utiliza *Agrobacterium* para transferir ADN a células vegetales

El mecanismo por el cual la bacteria es capaz de transferir ADN es el uso del plásmido Ti, en este se reemplazan la secuencia original de T-DNA que porta los genes responsables de la formación de tumores y los genes de síntesis de opinas, por otra secuencia que es nuestro gen de interés y por su puesto el gen de selección para diferenciar a los organismos que están o no transformados (Ana Valderrama y cols. 2005).

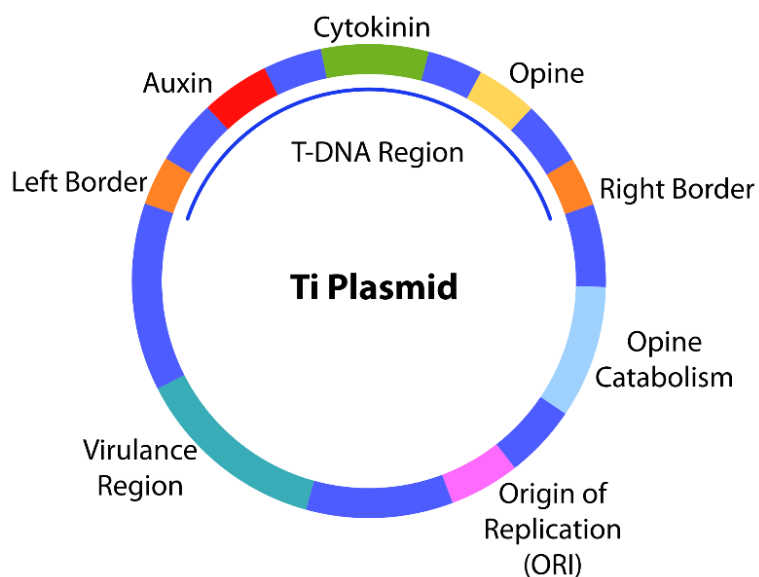


Figura 18.- Esquema de un plásmido Ti con los bordes izquierdo y derecho, región en donde se inserta el ADN de transferencia y origen de replicación.

El ADN que se encuentra entre los bordes izquierdo y derecho es el que va a ser insertado en la célula transformada.

Posteriormente *Agrobacterium tumefaciens* con el nuevo plásmido que tiene el gen de interés se utiliza para transformar las células vegetales (Ana Valderrama y cols. 2005).

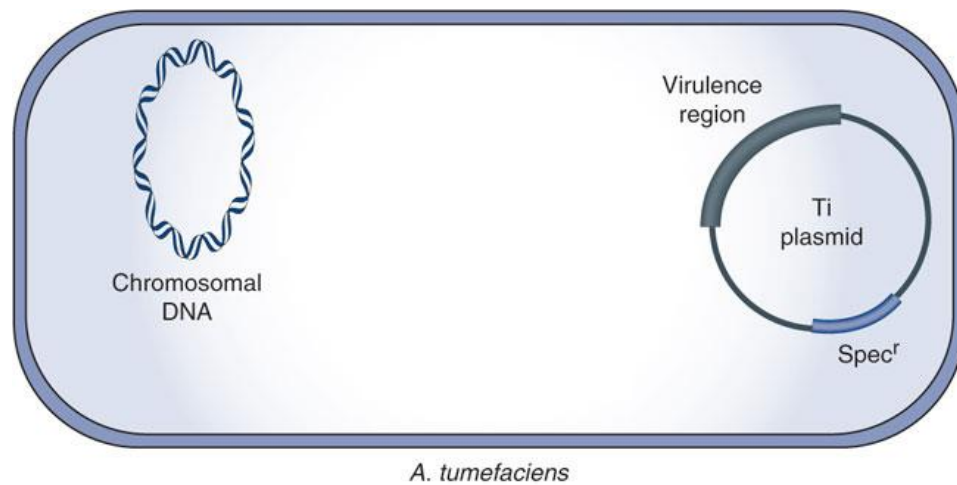


Figura 19.- Esquema de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* transformada con el plásmido Ti con su respectivo gen *vir* y la región que dará resistencia a espectinomicina a las bacterias transformadas.

Dentro del plásmido Ti existe una zona donde se encuentran los genes *vir* que son responsables del procesamiento, corte y transferencia del ADN-T.

Ana Valderrama y cols. en 2005 describe que la transformación de la planta primeramente esta inducida al poner en contacto a la bacteria con la célula vegetal, posteriormente el T-DNA se transfiere a la célula vegetal para integrarse en el material genético y una vez que se ha dado la transformación el material genético es inoculado en medios de cultivo que ya contienen el agente selector ya sea un antibiótico o herbicida donde las células transformadas serán las que puedan sobrevivir en este medio selector.

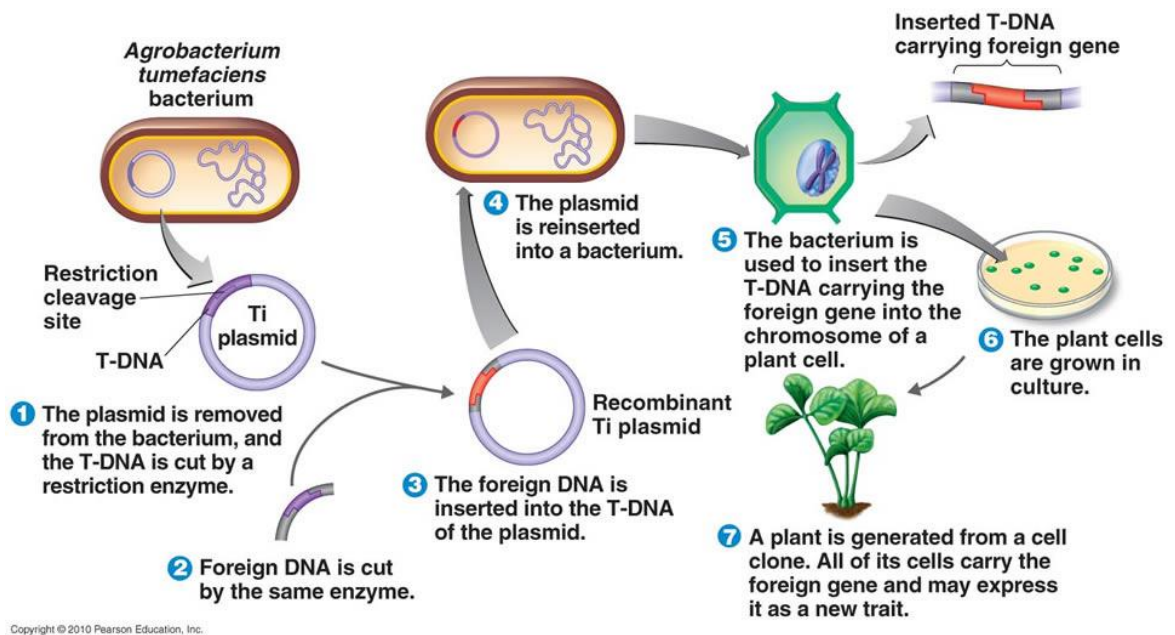


Figura 20.- Esquema paso a paso de la transformación de tejido de planta con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*.

3.21 Cultivo in vitro

Se tiene conocimiento que las células vegetales tienen una característica muy importante que les permite generar una planta completa de cualquier explante o fragmento de la planta en un medio de cultivo adecuado con la presencia de fitohormonas, esta característica es llamada totipotencia, y las fitohormonas más comunes y relacionadas directamente en la estructura son las auxinas entre las cuáles se encuentran el Ácido indolacético, Ácido 4-cloroindolacético, Ácido Indolbutírico y Ácido fenilacético (Azcón y Talón, 2000).

Uno de los más usados en cultivo in vitro es el ácido indolbutírico (AIB), este es de origen sintético y promueve el crecimiento de raíces, además es comúnmente utilizado por su estabilidad, ya que es muy resistente a la oxidación por la luz, enzimas u otros agentes (Azcón y Talón, 2000).

3.22 Hormonas como reguladores de crecimiento

Salisbury y Ross, en 1994 describen a las hormonas como compuestos orgánicos que en pequeñas cantidades fomentan, inhiben o modifican algún proceso fisiológico, la síntesis de estas moléculas son responsables de la división celular, diferenciación y enraizamiento (Weaver, 1990). Se tiene reportado que las auxinas y citocininas están en el grupo de reguladores de crecimiento (Salisbury y Ross, 1994).

3.23 Auxinas

Azcón y Talón, en el 2000 menciona que son las primeras hormonas que se describieron. Su estructura es un derivado del fenol o el indol, y tienen anillos aromáticos con dobles enlaces conjugados. Estas fueron descubiertas al observarse una curvatura en los tallos al cortar su parte apical.

3.24 Citocininas

Estas hormonas son las responsables de la división celular, se conoce que derivan de las adeninas, y las más frecuentes son la 6 furfurilamino purina (Cinetina), bencilaminopurina (BAP) y la zeatina. Azcón y Talón en 2000 describen que estas hormonas se encuentran en el xilema y en el floema pero se trasladan muy poco en la planta y si se les encuentra en hojas son relativamente inmóviles.

- * **BAP (6 bencilaminopurina).** Es la responsable de inducir la división celular, también es capaz de incrementar la clorofila y la fotosíntesis (Davies, 1995). También promueve la brotación lateral en diferentes especies (Rease y Burst, 1983).

- * **Cinetina (6 furfurilamino purina)**. Se reporta como la responsable en inducir división celular, diferenciación y crecimiento asimismo genera callos y retrasa el envejecimiento (Azcón y Talón, 2000).

Podemos decir que esta investigación se enfoca en la transformación genética de plantas de papa mediada por el método biológico con *Agrobacterium*, también la obtención de plantas transformadas resistentes a frío y sequía con la generación de explantes in vitro con un adecuado balance de fitohormonas.

3.25 Microscopia confocal

El microscopio confocal fue inventado en el año 1955 por el científico estadounidense Marvin Minsky al estudiar neuronas. Tiene un mecanismo, basado en el microscopio de fluorescencia y se obtienen imágenes tridimensionales de los tejidos analizados (Sheppard, 1993).

El microscopio confocal es muy complejo pues tiene complementos electrónicos y de computación los cuáles son capaces de enfocar solo en un plano de la muestra eliminando la luz que no se encuentran en el plano enfocado.

Con el microscopio confocal se pueden observar muestras con cortes más gruesos ya que este permite hacer cortes ópticos finos y después se reconstruyen en tres dimensiones todos los cortes anteriormente realizados, las ventajas de usar microscopio confocal es el enfoque de la muestra en un solo plano, elimina información de otros planos no enfocados, y al combinar los cortes ópticos seriados podemos construir estructuras tridimensionales con programas sofisticados de computación (Sheppard, 1993).

4. Justificación

Debido a la problemática que tiene nuestro país con la sintomatología provocada por *Candidatus Liberibacter solanacearum* sobre los cultivos de este importante tubérculo y aprovechando las nuevas tecnologías biotecnológicas, se propone un sistema alternativo para la generación de papa mejorada para el control de esta enfermedad.

5. Hipótesis

- * La expresión de proteínas antimicrobianas podrá disminuir la infección de la bacteria causante de la enfermedad Zebra Chip en plantas de papa.
- * Se podrá proveer de tolerancia a frío a plantas de papa.

6 Objetivos

6.1 Objetivo general

Realizar la transformación genética de papa empleando construcciones genéticas que codifican para las enzimas Defensina, Lisozima y Trehalasa para el control de *Candidatus Liberibacter solanacearum* y proveer de tolerancia a frío.

6.2 Objetivos específicos

- * Generar el vector de expresión para papa con cada una de las construcciones genéticas.
- * Transformar genéticamente papa con las construcciones genéticas vía *Agrobacterium tumefaciens*.
- * Regenerar plantas transformadas con técnicas de propagación *in vitro*.
- * Analizar molecularmente a las plantas transformadas.

7 Estrategia experimental

La estrategia experimental se dividió en tres etapas y cada etapa tiene distintas actividades para cumplir con los objetivos propuestos.



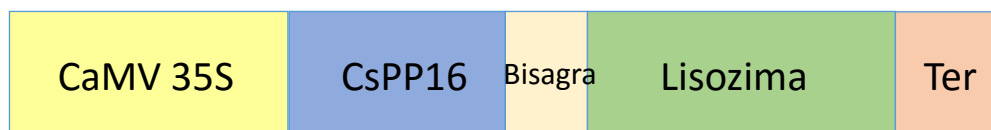
8. Materiales y métodos

8.1 Etapa 1

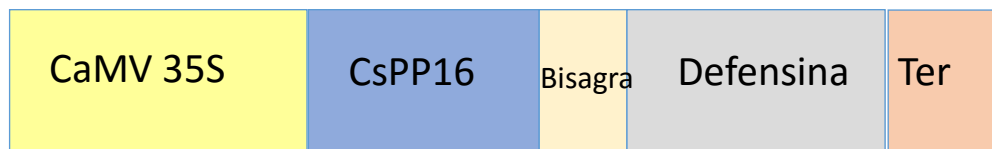
Diseño de construcciones genéticas

Para el diseño de las construcciones de los antimicrobianos así como el antisentido de Trehalasa se decidió utilizar como promotor CaMV 35S del Virus Mosaico de la coliflor el cual es un promotor constitutivo fuerte, que causa niveles altos de expresión génica en plantas, y como terminador NOS (nopalina sintasa de *A. tumefaciens*) que contiene la señal de terminación de la transcripción y dirige la poliadenilación.

Lisozima



Defensina



Trehalasa Antisentido

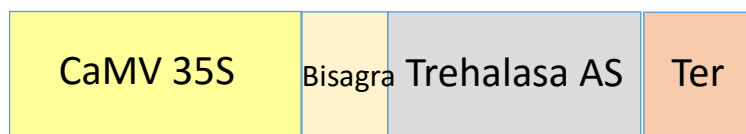


Figura 21.- Diseño de las construcciones genéticas para Defensina, Lisozima y Trehalasa AS.

Amplificación de genes

En el Anexo A se encuentra la secuencia y los oligos utilizados para la amplificación de los genes CsPP16-lisozima y AS-Trehalasa así como la mezcla de reacción y condiciones de PCR para cada una de las construcciones.

La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* transformada con el gen Defensina fue proporcionado por José Abraham Ramírez Pool y posteriormente después de una extracción de ADN plasmídico el fragmento fue confirmado por PCR siguiendo las condiciones descritas en el Anexo B.

Clonación de genes en el vector de entrada PCR™ 8/GW/TOPO

Una vez que los genes que codifican para Lisozima y AS-Trehalasa fueron amplificados, se clonaron en el vector de entrada PCR™ 8/GW/TOPO® TA Cloning Kit (Figura 22), posteriormente la bacteria *Escherichia coli* DH5α fue transformada con este vector mediante choque térmico y después fueron inoculadas en medios LB/espectinomicina.

Este vector se caracteriza por permitir la selección de las cepas de *Escherichia coli* DH5α transformadas a través de marcador de selección (espectinomicina).

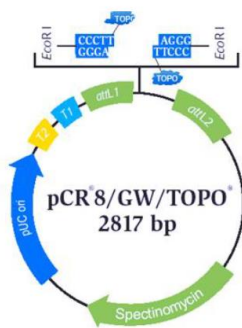


Figura 22.- Representación gráfica del vector PCR™ 8/GW/TOPO® TA Cloning con resistencia a espectinomicina.

Las condiciones de clonación para cada secuencia fueron las siguientes:

Se agregó a la reacción TOPO los siguientes componentes: vector 0.5 μ L, solución salina 0.5 μ L, ADN que codifica al gen Trehalasa o Lisozima 2 μ L, Agua 2 μ L y se incubó por una noche a 22 °C para permitir la ligación de cada uno de los fragmentos.

Medios y soluciones para clonación de fragmentos y transformación en células *E. Coli* DH 5 α competentes.

Medio de cultivo para bacteria *E.coli* DH 5 α

La bacteria *E.coli* DH 5 α fue sembrada en el Medio LB (Luria Bertani) líquido, la composición de este medio y su concentración se encuentra detallada en Anexo C.

Compuestos utilizados para la selección de clonas

El antibiótico que se utilizó para seleccionar a las clonas positivas fue Espectinomicina 200 mg/ml (Anexo I).

Preparación de células de *E. coli* DH 5 α competentes

Se colocaron 5 mL de medio LB en un tubo de ensaye y se inoculó una colonia bacteriana de *E.coli* DH5 α que fue previamente crecida en placa con medio LB.

El tubo de ensaye se incubó de manera inclinada con agitación constante toda la noche a 37 °C. Se inoculó 1 mL del cultivo incubado anteriormente en un matraz con 100 mL de medio LB y se incubó a 200 rpm a 37 °C. La solución se incubó hasta que el cultivo alcanzó DO (600 nm)=0.4. Esto ocurrió aproximadamente después de 2 horas. Se transfirieron las células a dos tubos de centrifuga (previamente esterilizados) y se incubaron en hielo por 10 min. Se centrifugó las células a 5000 rpm a 4°C por 10 min.

Se desechó el sobrenadante, y se colocó el tubo en hielo y resuspendió cada pastilla celular con 20 ml de CaCl₂ 100mM (Anexo J) previamente frío, se incubó en hielo durante 20 minutos y se centrifugó nuevamente a 5000 rpm a 4°C por 10 min. Se desechó el sobrenadante y resuspendió en 1ml de CaCl₂ 100mM previamente frío. Se homogeneizó y se mantuvo las células competentes en refrigeración a -80°C.

Transformación en *E. coli* DH5 α

Una vez clonado el gen de Trehalosa o Lisozima en el plásmido pCR[®]8/GW/TOPO[®] se prosiguió con la transformación. Se colocó cuidadosamente 25 μ L de células competentes a la reacción TOPO previamente realizada. Los tubos con la mezcla TOPO y las células competentes se incubaron en hielo por 30 minutos, posteriormente se colocaron los tubos a 42°C para darle un choque de térmico por 90 segundos, los tubos se regresaron al hielo por 5 minutos.

En condición de esterilidad, se agregaron 250 μ L de medio SOC (Anexo D) mantenido a temperatura ambiente. Se colocaron los tubos horizontalmente en la incubadora con agitación a 37°C por una hora. En este tiempo, el plásmido expresará el gen de resistencia al antibiótico Espectinomicina. Luego de 1 hora de incubación se inocularon cajas de medio LB/Espectinomicina 20 y 200 μ L de bacteria. La bacteria fue esparcida homogéneamente sobre la superficie del medio. Se incubaron las cajas de manera invertida a 37°C durante toda la noche.

Obtención de ADN plasmídico mediante lisis alcalina.

Se utilizó el método de purificación de lisis alcalina siguiendo el protocolo de (Sambrook y Russell, 2001).

Se centrifugó a temperatura ambiente y a velocidad máxima por 30 segundos 4 mL el cultivo de células *E.coli* DH5 α que fueron transformadas, se removió el sobrenadante dejando la pastilla libre del medio. Después se resuspendió la pastilla en 100 μ L de solución Alcalina I previamente fría y se mezcló vigorosamente con ayuda de vórtex. Se adicionaron 200 μ L de solución de lisis II recién preparada, se cerró el tubo y se mezcló invirtiendo el tubo cinco veces cuidadosamente sin usar vórtex. El tubo se colocó en hielo y se adicionó 150 μ L de solución alcalina III fría, se cerró el tubo y se invirtió el tubo cinco veces para mezclar. Se mantuvo el tubo en hielo 3-5 minutos y se centrifugó a 13 000 rpm por cinco minutos a 4°C. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se adicionó un volumen de fenol: cloroformo (1:1 v/v), se mezcló en vórtex y centrifugó a 13.000 rpm por 2 min a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y para precipitar el ADN plasmídico adicionamos 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubó a -20 °C durante 20 minutos. Nuevamente se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se removió el sobrenadante. Adicionar 1 mL de etanol al 70 % y se centrifugó a 13 000 rpm por 2 minutos a 4 °C. Remover el sobrenadante hasta que nuestra pastilla quede lo más seca posible y resuspender en 30 μ L de agua desionizada estéril y guardar a -20 °C.

La cuantificación del ADN plasmídico y su integridad fueron medidas en el equipo Nano drop (Thermo Scientific).

Digestión enzimática y separación de productos por electroforesis.

Una vez determinada la concentración y la calidad del ADN plasmídico se prosiguió con la liberación del fragmento de interés cortando el plásmido con enzimas específicas o de restricción, las cuales pueden reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortar el ADN en ese punto en concreto, (sitio de restricción), o en un sitio no muy lejano a este. Estos cuentan con 4 o 6 pares de bases, con las que son reconocidos. El mecanismo del corte de ADN se realiza a través de la ruptura de dos enlaces fosfodiéster en la doble hebra, lo que da lugar a dos extremos de DNA. Éstos pueden ser romos (cuando los enlaces rotos coinciden) o Cohesivos/escalonados (Anexo K).

Para la liberación del fragmento de interés se siguió la siguiente reacción enzimática: en un tubo eppendorf se colocó 10 μ L NE buffer 2, 30 μ L de DNA más 60 μ L de H₂O y 5 μ L de la enzima EcoRI (Anexo K), mezclar brevemente y centrifugar durante 30 segundos a 13000 rpm se deja incubar 12 horas a 37 °C.

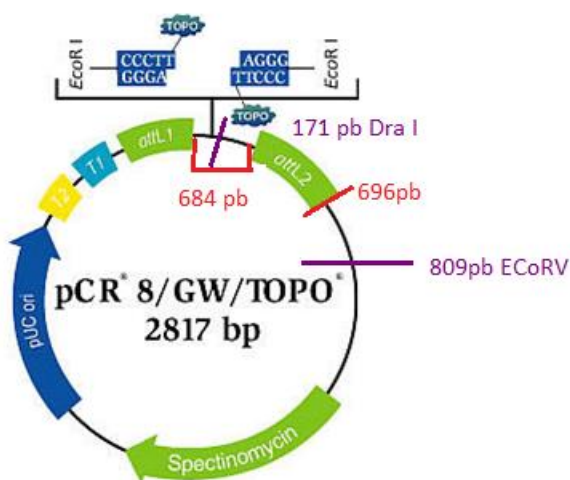
Una vez realizada la digestión enzimática y la cuantificación de ADN presentes en las muestras se continuó con la separación de los productos por la técnica de electroforesis en agarosa al 1% a 50 volts durante 2 h (Anexo J).

Purificación de plásmido

Para purificar el producto de la digestión enzimática de ADN que proviene de un gel con ayuda de una navaja y visualizando con luz UV en un Transiluminador (Bio DocAnalyze Biometra) se cortó y colocó la banda en un tubo Eppendorf, se prosiguió con las instrucciones de *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Alemania) agregando 200 μL de isopropanol y dejando reposar por 5 minutos, agregar tres equivalentes al peso de la agarosa de buffer QG, aproximadamente 800 μL e incubamos durante 10 minutos a 50 °C. Cuando la agarosa este fundida pasaremos este contenido por una membrana para atrapar el DNA, esto se hará centrifugando 13000 rpm/1 min. Se adicionaron a la membrana 750 μL de Buffer PE, centrifugando nuevamente a 13000 rpm/1 min. El filtro se transfirió a un nuevo tubo y se colocó en la membrana 35 μL de agua Milli-Q libre de RNasas para resuspender la muestra. Se centrifugó nuevamente a 13000 rpm/min y la muestra se almacenó a -20 °C.

Determinación de la orientación del inserto

Después de la transformación en el vector de entrada; se confirmó su correcta orientación con enzimas de restricción, en el caso particular del vector pCR8/GW/TOPO, la inserción ocurre entre los sitios attL1 y attL2 del plásmido, estos sitios son necesarios para su posterior subclonación en el vector de expresión. Debemos destacar que la incorporación del inserto no tiene una orientación preferencial y por ende ésta debe comprobarse para garantizar la dirección correcta de la secuencia y esto es indispensable para la posterior expresión del gen de interés. La correcta orientación del inserto 5'→3' fue comprobada por medio de digestiones con pares de enzimas de restricción las cuáles fueron determinadas usando el software NEB cutter V2.0, éstas enzimas reconocen y cortan un sitio dentro del ORF y el vector. Para determinar la correcta orientación del inserto AS Trehalasa en el vector de entrada se utilizó las siguientes enzimas: Dra-I y EcoR V.



684pb: inserto AS Trehalasa

696pb: pares de bases hasta el sitio attL2 del vector

Dra-I: corta en el sitio 171pb dentro del ORF

EcoR V: corta en el sitio 809 pb del vector

$$684 - 171 = 513$$

$$809 - 696 = 113$$

$$\text{Entonces: } 513 + 113 = 626 \text{ pb}$$

Este es el fragmento en pares de bases esperado por el corte de ambas enzimas.

Figura 23.- Orientación de AS Trehalasa. Representación gráfica del vector de entrada y los cortes de las enzimas Dra-I y EcoR V determinadas por el software NEB cutter V2.0.

Igualmente para determinar la correcta orientación del inserto Lisozima en el vector de entrada se utilizó las siguientes enzimas: Dra-I y EcoR V Figura 24.

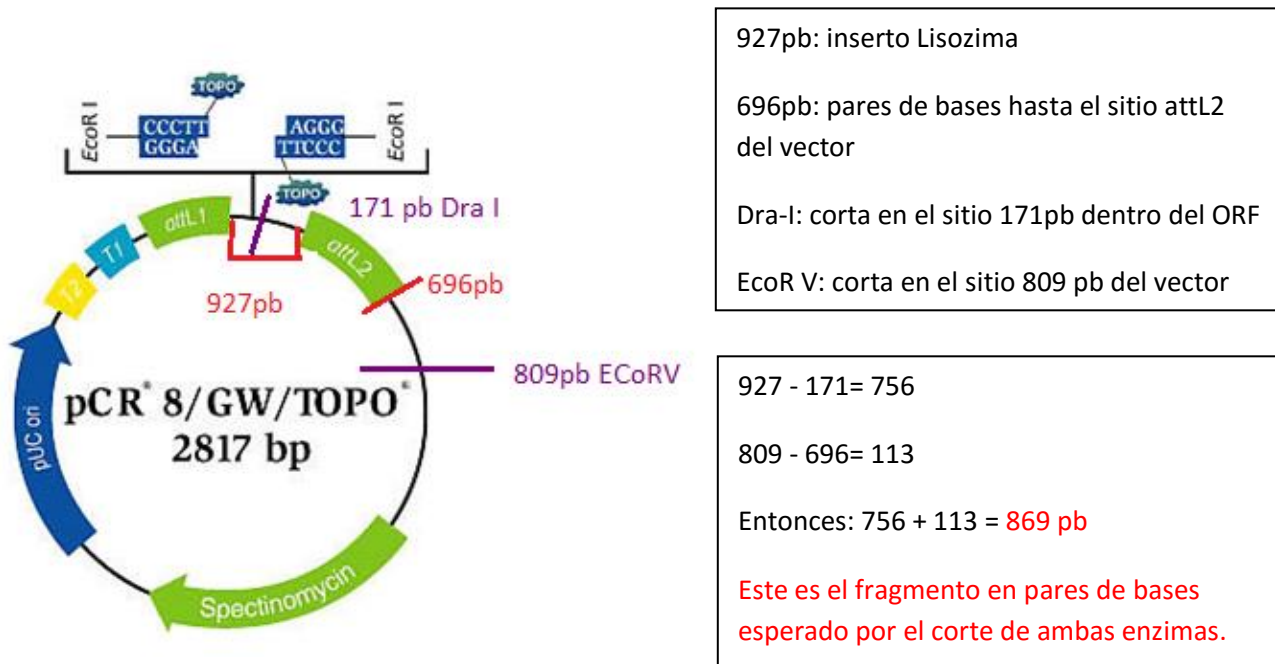


Figura 24.- Orientación de Lisozima. Representación gráfica del vector de entrada y los cortes de las enzimas Dra-I y EcoR V determinadas por el software NEB cutter V2.0.

La mezcla de reacción para ambas orientaciones de cada inserto fue la siguiente: para 1 reacción: Agua 3.0 µL, BSA 0.1 µL, Cutsmart 1.0 µL, RNasa 0.5 µL, EcoR V 0.2 µL, Dra I 0.2 µL, DNA 5.00 µL (200ng).

Digestión enzimática de vector de entrada para linealizar.

Una vez orientado el fragmento de interés AS Trehalasa y Lisozima en el vector de entrada pCR®8/GW/TOPO® debemos someterlo a una digestión enzimática y como resultado tendremos una molécula lineal la cual será purificada nuevamente con *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Alemania).

Para cada fragmento (AS Trehalasa y Lisozima) en el vector de entrada se preparó la siguiente reacción enzimática: en un tubo eppendorf se colocó 1 µL de Buffer 3.1, 1 µL de DNA más 7 µL de H₂O y 1 µL de la enzima EcoRV (Anexo K), mezclar brevemente y centrifugar durante 30 segundos a 13000 rpm se deja incubar ON/ 37 °C.

Una vez realizada la digestión enzimática y para comprobar la efectividad de la digestión, la muestra es sometida a electroforesis en agarosa al 1 % a 50 volts durante 2 h y purificamos el fragmento deseado.

Recombinación sitio especifica Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix

Ya que obtenemos el vector de entrada clonado, linealizado y purificado, éste es sometido a una técnica llamada LR Clonasa que está basada en la transferencia de fragmentos de ADN entre vectores utilizando proteínas de recombinación del bacteriófago lambda.

El sistema de clonación tiene como ventajas el transferir uno o más fragmentos de DNA dentro de diferentes tipos de vectores de manera paralela, mantiene el marco de lectura y la orientación del segmento de DNA transferido, debido a su alta eficiencia minimiza la necesidad de chequeo de colonias transformadas; cualquier vector se puede convertir en un vector compatible con este sistema creando un vector DESTINO; el proceso de clonación es más fácil y rápido. Para cada fragmento (Trehalasa y Lisozima) en el vector de entrada se preparó la siguiente reacción enzimática: en un tubo eppendorf se colocó 1 μ L de vector de entrada pCR®8/GW/TOPO® (50ng/ μ L), 3 μ L vector de pb7 GW2.0 más LR clonasa enzyme mix 1 μ L se dejó incubar ON/ 22-25°C.

Extracción de DNA plasmídico con ZR Plasmid Miniprep

El vector resultante es transformado en *E. coli* DH5 α por choque térmico y sometido a extracción de DNA plasmídico con ZR Plasmid Miniprep en el cual se centrifugó 1,5ml de cultivo bacteriano a 13 000 rpm en un tubo eppendorf de 1,5 ml durante 15 - 20 segundos en una microcentrífuga y descartamos el sobrenadante. Agregar 200 μ L de Buffer P1 (rojo) al tubo y resuspender el pellet completamente con vórtex. Después se añadió 200 μ L de Buffer P2 (verde) y mezclar invirtiendo el tubo 2 - 4 veces lentamente. Las células se lisaron por completo cuando la solución tiene apariencia clara, púrpura y viscosa y esperar de 1-2 minutos. Añadir 400 μ L de Buffer P3 (amarillo) y mezclar suavemente pero a fondo. La muestra se vuelve amarilla cuando se completa la neutralización. Hay que permitir que el lisado de incubar a temperatura ambiente durante 1-2 minutos. Centrifugar durante 2 minutos. Después se colocó la columna TM Zymo-Spin sobre un tubo eppendorf. Se añadió 200 μ L de Endo-Wash Buffer a la columna y se centrifugó durante 30 segundos. Agregar 400 μ L de Plásmid Wash Buffer a la columna y centrifugar nuevamente durante 1 minuto. La columna se transfirió en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y luego añadir 30 μ L de agua destilada y centrifugar durante 30 segundos para eluir el ADN plasmídico.

Clonación de genes en vector de expresión en planta pB7 GW2.0 y pB2GW7.0

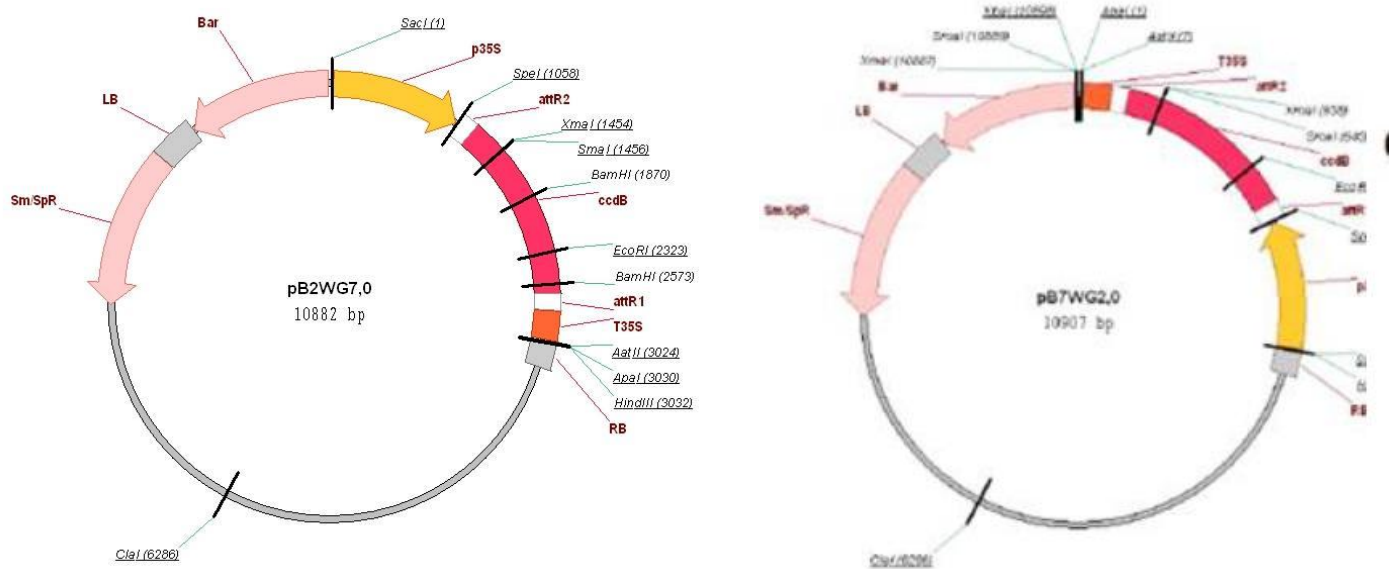


Figura 26.- Representación gráfica de los vectores de expresión pB2WG7.0 y pB7WG2.0 ambos con resistencia a espectinomicina y gen bar

8.2 Etapa 2

Transformación en *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación

En la electroporación se aumenta significativamente la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular mediante un campo eléctrico aplicado externamente. Cuando el voltaje atraviesa a una membrana plasmática ésta excede su rigidez dieléctrica y forma poros. Una vez que las construcciones han pasado del vector de entrada al vector de expresión se procede a la transformación en *Agrobacterium tumefaciens*. Como primer paso se enfrió en hielo por 15 minutos las cubetas para electroporación, después sacar del ultracongelador los tubos con las células competentes de *Agrobacterium* GL1 (50 μ L) y agregar 2 μ L de plásmido a *Agrobacterium*. Se esperó a que se descongele por 5 minutos la bacteria y hay que pipetear a *Agrobacterium* suavemente mezclándola con el plásmido. Después se agregar la mezcla dentro de la celda e introducimos la celda en el electroporador seleccionando el programa de *E.coli* en un voltaje determinado por el equipo de 1800 volts, una vez que ocurrió la descarga hay que agregar 200 μ L de medio SOC y mezclar dentro de la celda pipeteando suavemente, luego regresar cuidadosamente toda la mezcla de medio SOC y *Agrobacterium* GL1 a un tubo eppendorf.

Esto se llevó a incubar 2h a 28°C con agitación constante y se plaqueó 100 µL de las bacterias en medio LB sólido que previamente ha sido adicionada con antibióticos (Kanamicina 25mg/mL Espectinomicina 50mg/mL y Carbemicina 50mg/mL) e incubamos a 28°C durante 3 días o hasta que aparezcan las primeras colonias.

Material biológico

Las plántulas de papa fueron proporcionadas por SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria), estas plantas se encuentran certificadas y libres de patógenos.

Propagación *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum*)

Las plantúlas fueron propagadas en medio de cultivo MS propuesto por Murashige, T. y Shook, F; 1962, (Anexo F) posteriormente fueron sometidas a fotoperiodo continuo de 16 h luz /8 h oscuridad a 26°C en cámara de cultivos vegetales Conviron con una intensidad de luz de 500 micromoles/pulgada 2 y cada quince días son cambiadas a nuevos medios.

Protocolo de transformación de explantes de papa con *Agrobacterium tumefaciens* GL1

Una vez que las plantas han crecido en el medio MS se procedió a su transformación con *Agrobacterium*.

Se incubó *Agrobacterium* GL1 transformada con la construcción deseada en 20 mL de medio LB líquido con los correspondientes antibióticos (Kanamicina 25mg/mL Espectinomicina 50mg/mL y Carbemicina 50mg/mL) en matraces por 1-2 días /28°C. Después se pasó el cultivo a tubos falcon estériles y se centrifugaron a 14 000 rpm/15 minutos.

Se desechó el sobrenadante y resuspendió la pastilla en medio MS (estéril por filtración) con acetociringona (100mg/mL). Cortamos los explantes aproximadamente 2cm con una navaja que previamente ha sido sumergida en la mezcla de *Agrobacterium* GL1 con MS y acetociringona (100mg/mL) y los colocamos en una servilleta estéril. Después los explantes se colocan en medio Co-cultivo (Anexo G) y los colocamos en oscuridad por 25°C/48 h. Transcurrido este tiempo los explantes se lavan con agua estéril y los pasamos a medio SRM (Anexo G) a 28°C / 1 semana con antibióticos (Cefatoxima 100mg/mL, Vancomicina 100mg/mL, Meropenem 100mg/mL). Una vez que la bacteria ha desaparecido se pasan los explantes a SRM sin antibiótico y se deja por 4 semanas en oscuridad, posteriormente pasamos los explantes sobrevivientes a fotoperiodo 16h luz /8h oscuridad a 26°C.

Selección y Regeneración de plantas transformadas

Una vez que los explantes han sido transformados se deben pasar a medios de regeneración SRM sin antibióticos ya que *Agrobacterium* ya se ha eliminado, ahora deben seleccionarse los explantes transformados con un agente como bialaphos, y deben dejarse nuevamente por 2 semanas en fotoperiodo 16h luz /8h oscuridad a 26°C.

8.3 ETAPA 3

Análisis de las plantas genéticamente modificadas

Los test de presencia de OMG se pueden diseñar teniendo en cuenta que son dos las posibles moléculas diana: a) el ADN transgénico que ha sido insertado, mediante técnicas biotecnológicas, en el genoma de una planta natural, o b) la proteína expresada por ese ADN transgénico insertado. Las técnicas basadas en la detección del ADN son las de elección por muchas causas, siendo probablemente la más importante su estabilidad, ya que permite su detección incluso en productos alimentarios procesados.

Extracción de DNA de las plantas GM

Aislamiento de DNA genómico mediante CTAB (Hexadeciltrimetilamonio) (Doyle & Doyle 1987)

Estos autores han usado al bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) para aislamiento de ADN de hojas maduras. El CTAB (Anexo H), se pega fuertemente al DNA, desplaza las proteínas previniendo la degradación del DNA y solubiliza muchos polisacáridos. Además, funciona como detergente que destruye las membranas al momento de moler el material vegetal (Csaiki et al., 1998) y se remueve mediante extracciones con cloroformo (Valadez y Kalh, 2000).

El protocolo para la extracción de DNA fue el siguiente:

Se molió 150-200 mg de tejido fresco con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. De ser posible, tratar de moler en un solo evento y no remoler la muestra excesivamente (esto provoca que el ADN se fraccione). Agregar 500 μ L de CTAB (Anexo H) y mezclar por inversión hasta homogenizar el tejido con la solución amortiguadora. Se incubó los tubos a 65°C/30 minutos y se dejó enfriar por 10 minutos. Posteriormente se adicionó 500 μ L de Fenol Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1) y se agitó por inversión 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar los tubos a 13 000 rpm por 10 minutos obteniendo una fase acuosa (líquido color amarillo) y la fase orgánica (color verde oscuro). Recuperar aproximadamente 750 μ L de la fase superior acuosa y se deposita en un nuevo tubo eppendorf 1.5mL. Se repitió el paso al adicionar Fenol Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1) y después se agregó 2/3 del volumen de sobrenadante obtenido con Isopropanol frío (-20°C), mezclar por inversión suavemente e incubar a -20°C por 10 minutos para favorecer la precipitación del DNA, después de desechó el Isopropanol al centrifugar los tubos a 13000 rpm por 30 minutos y precipitar el DNA. Se Agregó 500 μ L de alcohol al 70% y después se centrifugó nuevamente 2-3 minutos 13 000 rpm y repetir el lavado y después dejamos secar la muestra a temperatura ambiente hasta que la pastilla se seque. Para finalizar se resuspendió la muestra en 30 μ L en agua estéril libre de nucleasas. Almacenar las muestras a -20°C.

PCR para confirmar el fragmento de interés en el ADN extraído

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la herramienta más utilizada para la detección y cuantificación de presencia de cultivos modificados genéticamente en alimentos, plantas y raciones para el ganado. El factor clave que determina la especificidad de la PCR es la elección del fragmento o secuencia de ADN diana en el genoma de la planta modificada sobre el que va dirigido el protocolo que empleemos.

Se usó un par de cebadores o primers para cada construcción Lisozima, Trehalasa y Defensina.

Los **primers para Lisozima** amplifican un fragmento de **930pb**

Oligo directo (5')

ATGGGGATGGGAATGATGGAGGTCCATTTG

Oligo reverso (3')

CTAAACACCGCAACCTTGAACATATTGTCTGCA

Los **primers para Trehalasa** amplifican un fragmento de **684pb**

Oligo directo (5')

TACTTCCTGACAGTCTGCATCACCAGGAAG

Oligo reverse (3')

ATGGTTTTAGAAATATACAGGGCAACTGG

Los **primers para Defensina** amplifican un fragmento de **700pb**

Oligo directo (5')

TATGCCACTTCCAGGTGTTT

Oligo reverse (3')

AAACTGGATGGCAAATAGCAC

Las PCRs se realizaron en un termociclador (Biometra). Todas las amplificaciones se realizaron en volúmenes de 12.5 µL conteniendo: 1 µL Enzima Takara de In Vitro Gen, 1,25 µL Buffer 10X, 1 µL de dNTPs dinucleotidos 25 mM; 1 µL de cada cebador y 1,0 µL de ADN genómico. Se usaron como controles positivos la extracción de ADN plasmídico de cada construcción.

Los productos de las PCRs se observaron después de una electroforesis (60 minutos a 50 voltios) en geles de agarosa al 1% preparados con buffer Tris base, EDTA (ácido etilendiaminotetracético) y Ácido bórico a pH 8. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron a través de un transiluminador (Biometra) con luz ultravioleta.

Traspasso de plantas positivas *in vitro* a invernadero

Cuando las plantas fueron confirmadas positivas al transgen, y la planta *in vitro* mostró una altura de aproximadamente de 8-10 cm y 10 - 15 raíces éstas fueron lavadas con agua estéril hasta eliminar completamente al medio de cultivo para evitar posibles contaminaciones de hongos, todo esto fue hecho en campana de flujo laminar y colocadas en macetas (plásticas con las medidas de 49cm de perímetro en la base X 20cm de altura) limpias con una mezcla de Tierra: Turba: Agrolita en una concentración de 2:2:1. Posteriormente se llevaron a fotoperiodo continuo de 16 h luz /8 h oscuridad a 27°C en cámara de cultivos vegetales CONVIRON con una intensidad de luz de 500 micromoles/ pulgada 2 por ocho días y una vez que las plantas se adaptaron a la tierra fueron trasladadas a invernadero

Fusión de Defensina con el gen reportero GFP (Green Fluorescent Protein)

La construcción Defensina 16K fusionada a GFP Figura 26 fue proporcionada por el grupo de trabajo en *Agrobacterium tumefaciens* GL1, el diseño de la construcción genética fue la siguiente:

Defensina 16K + GFP

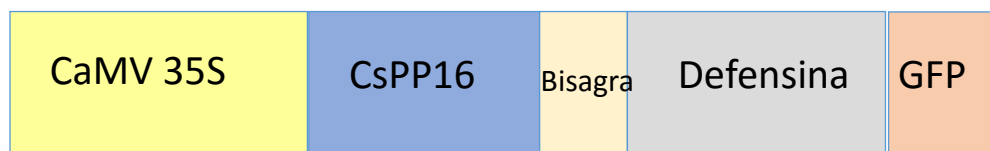


Figura 26.- Construcción genética de Defensina 16k fusionada a GFP.

Posteriormente fue utilizada para la transformación de explantes con el mismo protocolo utilizado anteriormente en las tres construcciones. Subsecuentemente las plantas transformadas con Defensina 16k + GFP fueron sometidas al mismo tratamiento desde su transformación, prosiguiendo con la selección y regeneración de las construcciones anteriores. La mezcla de reacción y las condiciones de amplificación de GFP en PCR se encuentran en el Anexo B.

Detección de la proteína GFP (Green Fluorescent Protein) fusionada a Defensina 16K mediante Western immunoblot

Extracción de proteína

Se pesó aproximadamente 150 mg de hojas y se colocaron en tubos eppendorf estériles, después se lisó la muestra colocando los tubos en nitrógeno líquido y colocados en el equipo tissuelyser por 1 minuto, inmediatamente se le agregó 400µL de buffer de extracción Anexo L. Después se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm y se rescató el sobrenadante, este es almacenado a 4°C o congelado a -20°C hasta su posterior uso.

Electroforesis en gel desnaturizante (SDS-PAGE)

Para evaluar la calidad de la proteína extraída, las proteínas fueron separadas por su peso molecular en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% de acrilamida llamado separador con un 4% de gel concentrador Anexo L , una vez realizado el gel se prosiguió a cargar las muestras (negativo a GFP, positivo a GFP y muestra), estas muestras fueron previamente cargadas con buffer de carga y calentadas a 95°C por 5 minutos en un tubo eppendorf (10µL de buffer Pt 2X + 30 µL de muestra). Se colocaron en el gel y se aplicó un voltaje de 100V por 2hs aproximadamente. Una vez realizada la electroforesis, es necesario marcar la proteína de interés para poder visualizarla, el gel no es una superficie adecuada para poder marcar las proteínas y los anticuerpos no son retenidos en el gel, los geles son frágiles y difíciles de manipular por tanto, es necesario transferir las proteínas a un soporte más adecuado como una membrana, las membranas pueden ser de nitrocelulosa o polifluoruro de vinilideno (PVDF), estas últimas requieren un pretratamiento con metanol y son las que se utilizaron durante el ensayo, Las proteínas se adhieren a la membrana siguiendo la misma disposición que en el gel donde las proteínas cargadas negativamente migran hacia el polo positivo bajo el efecto de un campo eléctrico.

El gel y la membrana se intercalan y fijan firmemente entre finas esponjas y papel absorbente a este montaje se le conoce como “sandwich” y se sumerge en un compartimento que contiene el tampón de transferencia

Anexo L donde se aplica a continuación la corriente eléctrica a 30 Volts durante toda la noche a 4°C.

Inmunodetección

Bloqueo de la membrana

Al día siguiente se lava la membrana 3 veces con TBS Anexo L, cada lavado por 10 minutos y posteriormente se adiciona el primer anticuerpo en una concentración de 1/5000 en TBS e incubar toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavamos nuevamente la membrana 3 veces con TBS y colocamos la membrana con el segundo anticuerpo previamente preparado en leche desnatada a una concentración de 1/5000 y colocar 3h. Una vez que se realizó el contacto con el segundo anticuerpo se hacen aproximadamente 6 lavados con TBS hasta eliminar toda la leche y proseguimos a la detección de la proteína mediante un procedimiento llamado revelado. El revelado consistió en agregar 750 µL de la solución A (Luminol Enhancer solution) y B (Peroxide solution) del kit 1GE Healthcare. Previamente mezclados sobre la membrana y esperar 4 minutos, después escurrir esta solución cuidadosamente sobre una servilleta y colocarlo en una plataforma de revelado, en oscuridad se coloca la radiografía sobre la membrana y después colocarlo en la solución de revelado hasta que la membrana cambie de color e inmediatamente lavarla con agua y pasar a la solución fijadora, nuevamente lavar y dejar secar la radiografía. Todo el revelado se realizó en oscuridad.

Microscopia confocal

Se obtuvieron cortes semifinos de papa GM de la siguiente manera: se incrustaron en una papa hojas y tallos maduros de plantas de papa positivas a GFP+Defensina así mismo también fueron incrustadas hojas del control negativo, a continuación se hizo un corte transversal con un espesor de 60 micras en un micrótopo (modelo 1000; TAAB Ltd, <http://www.taab.co.uk/>) y los cortes fueron colocados en un portaobjetos con glicerol al 50%. El análisis de los tejidos seccionados se realizó mediante el escaneo láser confocal con las siguientes condiciones: 488 nm de excitación; 552nm de emisiones; Ar / láser de He-Ne. Las imágenes se observaron en un objetivo de 40X.

9. Resultados y discusión

En este trabajo se emplearon protocolos para la transformación genética de papa y la regeneración de dichos explantes transformados. Estos eventos incluyeron 3 etapas: **I)** Amplificación de genes, clonación en vectores de entrada y de expresión, transformación por electroporación en *Agrobacterium tumefaciens* GL1 y propagación in vitro de explantes. **II)** Transformación genética de explantes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* GL1, selección y regeneración de explantes transformados **III)** Confirmación de plantas genéticamente modificadas amplificando fragmentos de interés mediante técnicas de PCR.

Etapa 1

Amplificación de genes

Se le realizó una extracción de DNA plasmídico a *Agrobacterium tumefaciens* transformada con el gen de Defensina 16K mediante lisis alcalina y posteriormente el fragmento fue amplificado por la técnica de PCR Anexo B. Una vez realizado esto fue visualizado en un transiluminador después de someterlo a electroforesis en un gel de Agarosa al 1%. En la figura 27 se muestra en el primer carril el ladder 1 Kb plus (Invitrogen) y de los carriles 1-12 muestras positivas a la amplificación del fragmento esperado de Defensina con 720 pb.

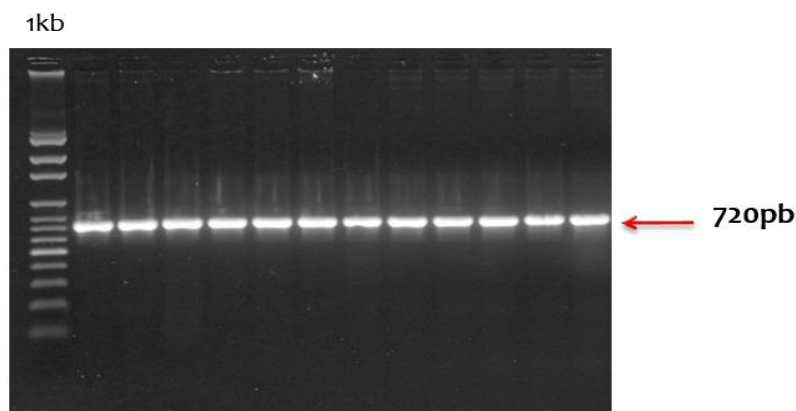


Figura 27.- Confirmación de fragmento Defensina en *Agrobacterium tumefaciens* por PCR, carril 1, ladder 1kb; carril 1-12, Defensina con 720pb.

Amplificación de los genes CsPP16-lisozima y AS-Trehalasa

Se contaba con la bacteria *E.coli* DH5 α transformada anteriormente con las construcciones previamente diseñadas y proporcionadas por el laboratorio, a éstas se les realizó extracción de ADN plasmídico y se verificó la presencia del plásmido recombinante en gel de agarosa. La figura 28 muestra las amplificaciones correctas para ambos genes con pesos aproximados de 929pb para Lisozima y 684pb para AS Trehalasa.

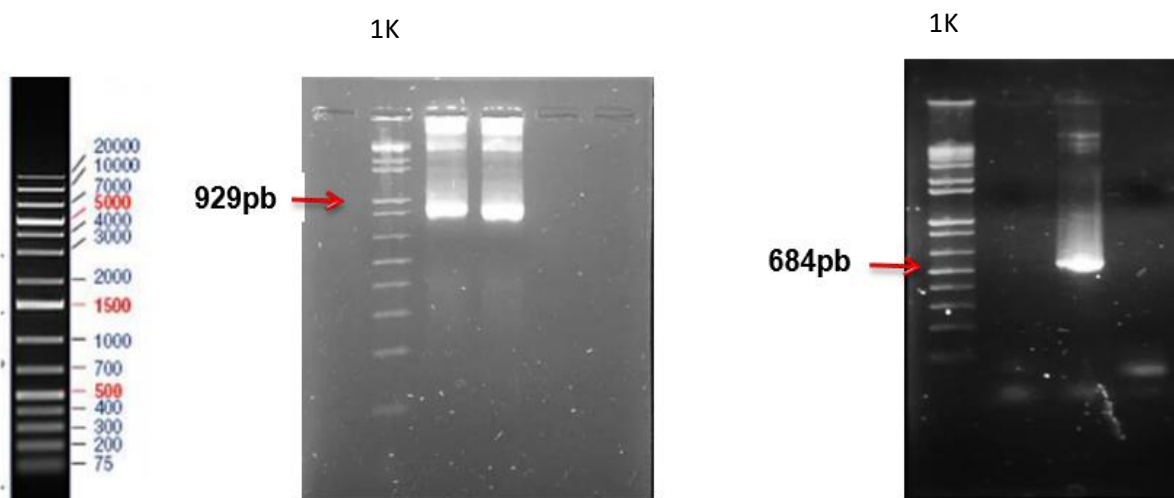


Figura 28.- Amplificación de fragmentos por PCR. Confirmación de fragmento esperado para A) Lisozima con un tamaño de 929pb y B) Antisense Trehalasa con un tamaño de 684pb. En la figura se observa el marcador de peso molecular. de 1Kb de Invitrogen

Se realizó extracción de DNA plasmídico a *E.coli* DH5 α transformada con el vector de ENTRADA pCR8/GW/TOPO y posteriormente se realizó extracción de DNA plasmídico y digestión enzimática con Eco RI comprobando el tamaño del fragmento en un gel de agarosa al 1% y visualizado con luz ultravioleta. En la figura 29 se muestra la representación del vector de entrada y los fragmentos Lisozima y AS Trehalasa liberado con enzimas de restricción EcoRI.

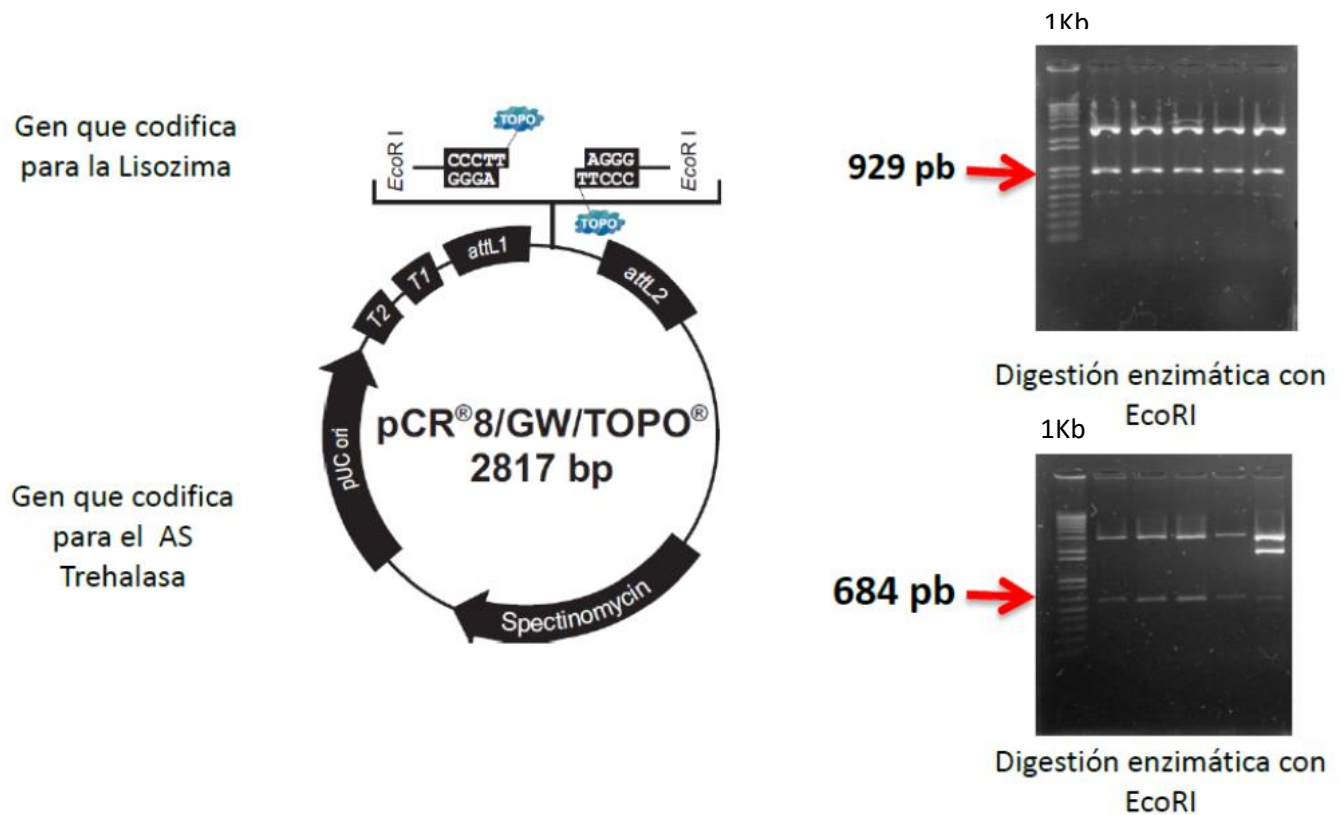


Figura 29.- Representación del vector de entrada. El vector pCR8/GW/TOPO en el cuál fueron clonados los fragmentos Lisozima y Defensina. Geles vistos en transiluminador después de la digestión con la enzima de restricción EcoRI, se observa el fragmento liberado del vector para cada construcción. Para ambos geles; carril 1 ladder 1kb; carriles de 2-6 fragmento liberado por enzimas de restricción.

Determinación de la orientación del inserto

En la Figura 30 se observa la orientación correcta obtenida de AS Trehalasa con un fragmento calculado en 626 pb para los cinco insertos seleccionados, los insertos, 3, 5 y 7 mostraron correcta orientación con un tamaño de 869pb para Lisozima y 2,4,6,8,9,10,y 11 tienen un tamaño no esperado por tanto la orientación es opuesta.

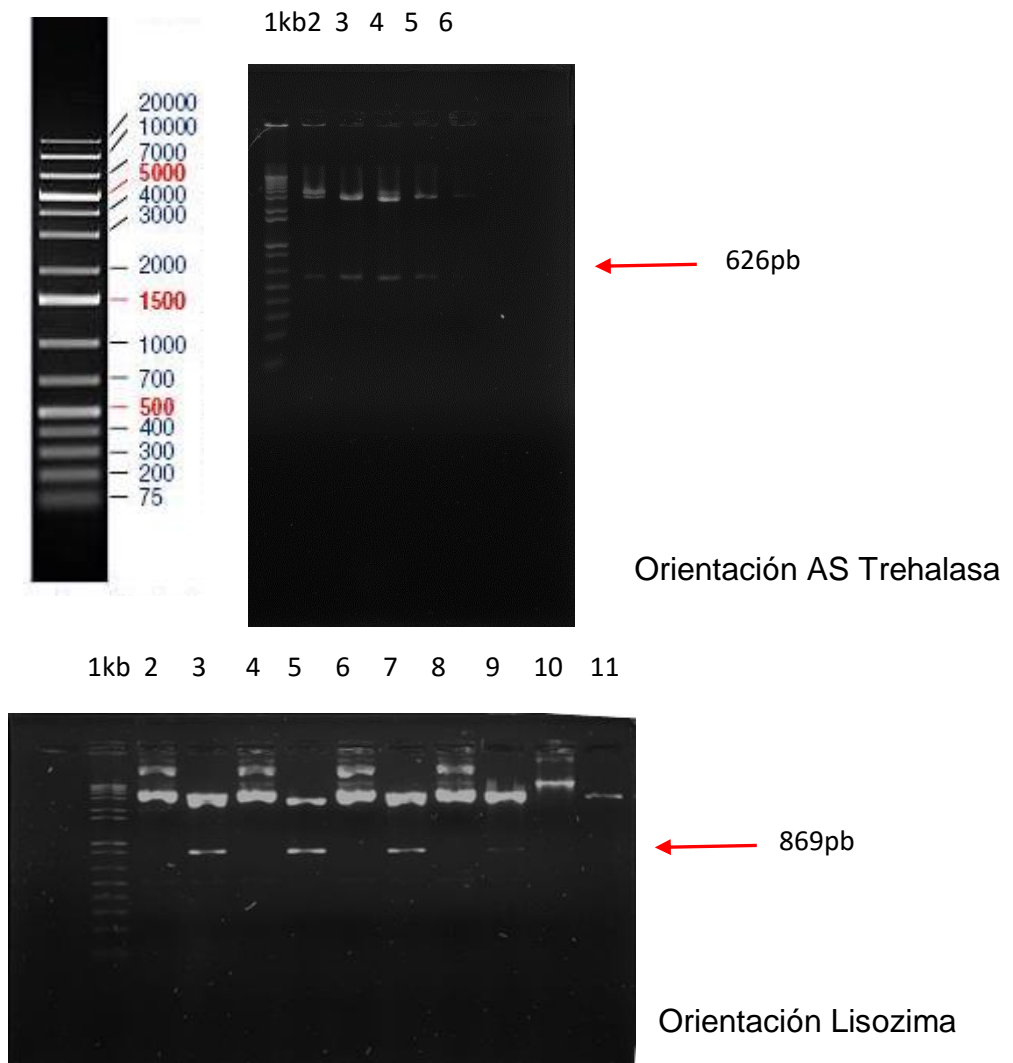


Figura 30.- Orientaciones de AS Trehalasa y Lisozima en el vector de entrada. Para ambos geles; carril 1 ladder 1kb; carriles de 2-6 fragmento orientado correctamente para AS Trehalasa con un tamaño de 626pb. Para la orientación en Lisozima carriles 3, 5 y 7 mostraron tamaño de 869pb correspondiente al fragmento calculado, carriles 2, 5, 6, 8, 9, 10 y 11 orientaciones no esperadas.

Se utilizó la enzima de restricción EcoR V la cuál es caracterizada por hacer un solo corte en extremos romos para que este vector se encuentre de manera lineal y pueda ser subclonado en el vector de expresión por medio de la técnica Gateway LR Clonasa. En la figura 31 se muestra el vector lineal obtenido para ambos insertos y posteriormente estos fragmentos fueron cortados directamente del gel y se purificaron.

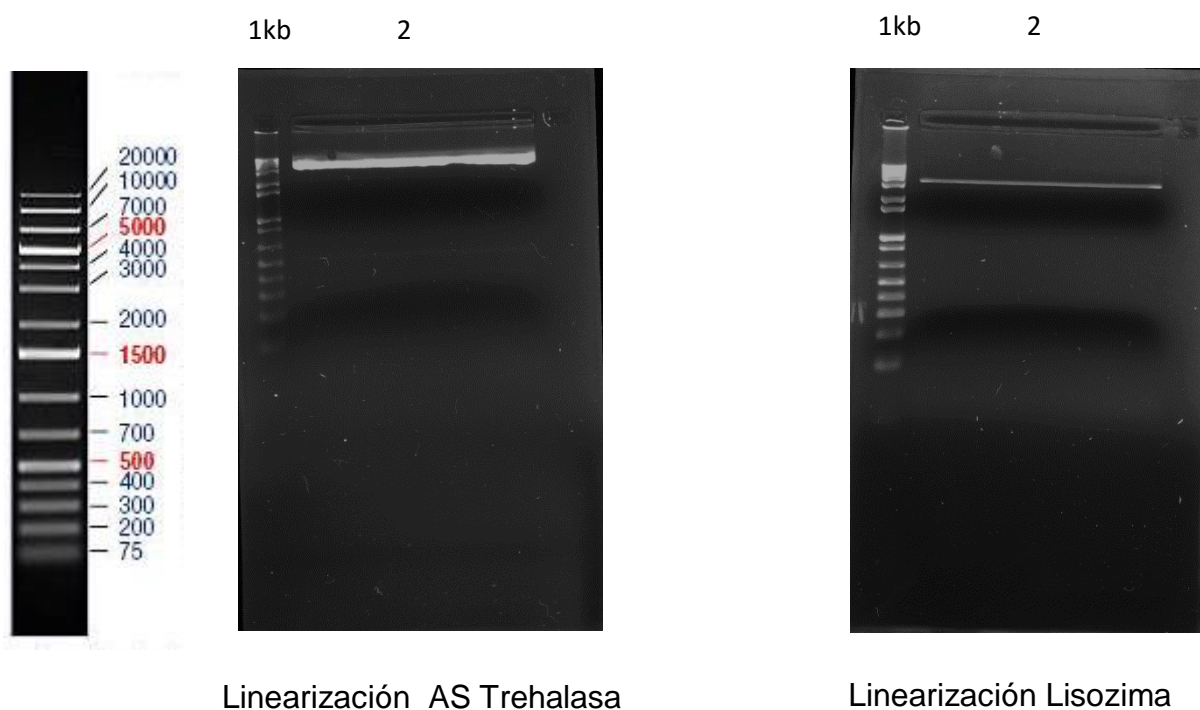


Figura 31.- Linearización de AS Trehalasa y Lisozima en el vector de entrada. Para ambos geles; carril 1 ladder 1kb; carril 2 fragmento lineal para AS Trehalasa.

Después de la recombinación en el vector de expresión, *Agrobacterium tumefaciens* GL1 fue transformada por electroporación. En la figura 32 A y C se representa el vector de expresión usado para cada inserto y en las imágenes B y D se muestra la confirmación de la transformación en *Agrobacterium tumefaciens* GL1 y ésta fue hecha mediante PCR identificando el gen de interés.

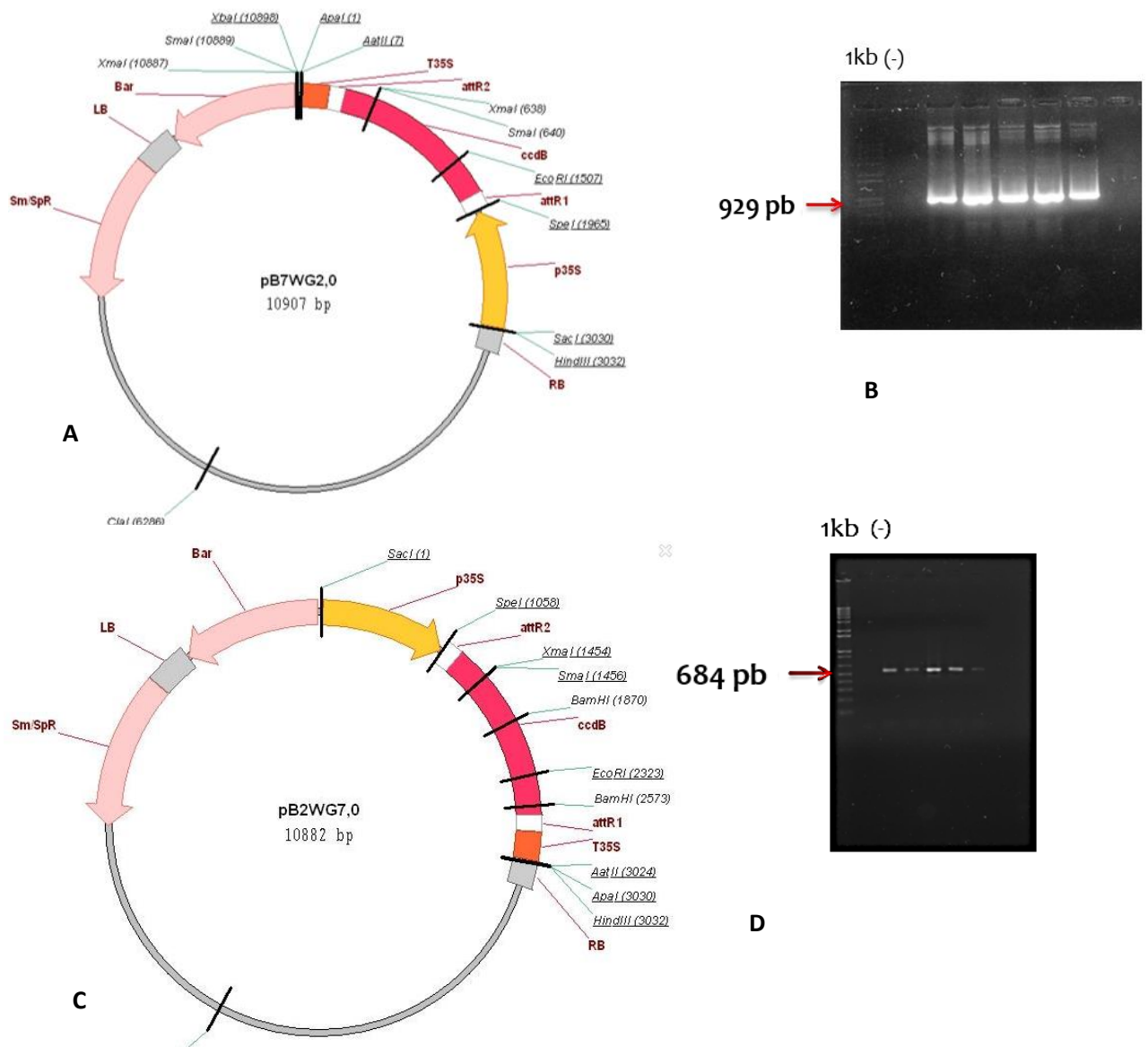


Figura 32.- Vectores de expresión y confirmación de *Agrobacterium* transformada. En la figura A) y C) se observa la representación de los vectores de expresión utilizados para cada fragmento en el vector pB7WG2.0 fue clonado con LYS y para el vector pB2WG7.0 fue clonado Trehalasa. En la figura B) y D) se observa la confirmación de los vectores en *Agrobacterium* GL1 después de su transformación por electroporación.

Etapa 2 Propagación, transformación genética de explantes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* GL1, selección y regeneración de explantes transformados.

En la figura 33 A y B se muestran las plantas de papa que fueron proporcionadas por SENASICA, se proporcionaron dos variedades la 690 (A) y 578 (B) , estas se encontraban en frascos estériles y fueron propagadas posteriormente en nuevos medios MS y en cajas Magenta y colocadas en fotoperiodo en una camara de crecimiento para plantas marca Conviron.



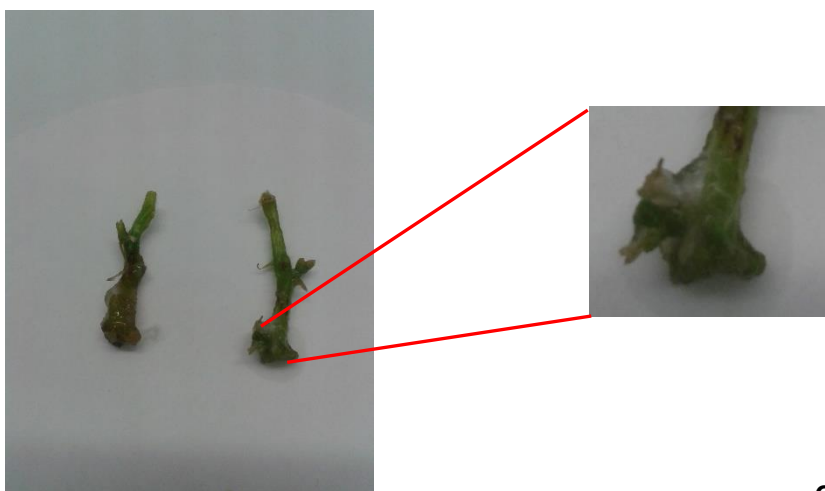
A



B

Figura 33.- Plantas de papa. A papa de la variedad 690 y B variedad 576, ambas proporcionadas por SENASICA en medio MS.

En la figura 33 D se muestran plantas con un tamaño aproximado de 10 cm de longitud, estas se cortarán en fragmentos de 2cm aproximadamente, los cortes fueron realizados preferentemente de manera internodal como se muestra en la figura 33C se ha demostrado que la propagación de plantas a partir de nodulos es m+as efectiva y tiene mas probabilidad de enraizamiento y generando tallos más resistentes conservando la potencialidad de multiplicación y diferenciación celular. En este trabajo se han regenerado de maenra eficiente plantas a partir de nodulos en poco tiempo y con manipulación sencilla del material vegetativo.



C



D

Figura 33.- Propagación de plantas de papa. C) nódulos obtenidos de tallos de papa. D) plántulas con una altura aproximada de 10cm seccionada para su posterior trasplante en medios MS.

En la figura 34 A se muestra el crecimiento de las plántulas en el día 1, 15, y 30 días al ser transferidas en los nuevos medios MS. Estas plantas se mantuvieron en condiciones de esérilidad en camaras CONVIRON en fotoperiodo continuo 16h luz y 8h oscuridad a 26°C.

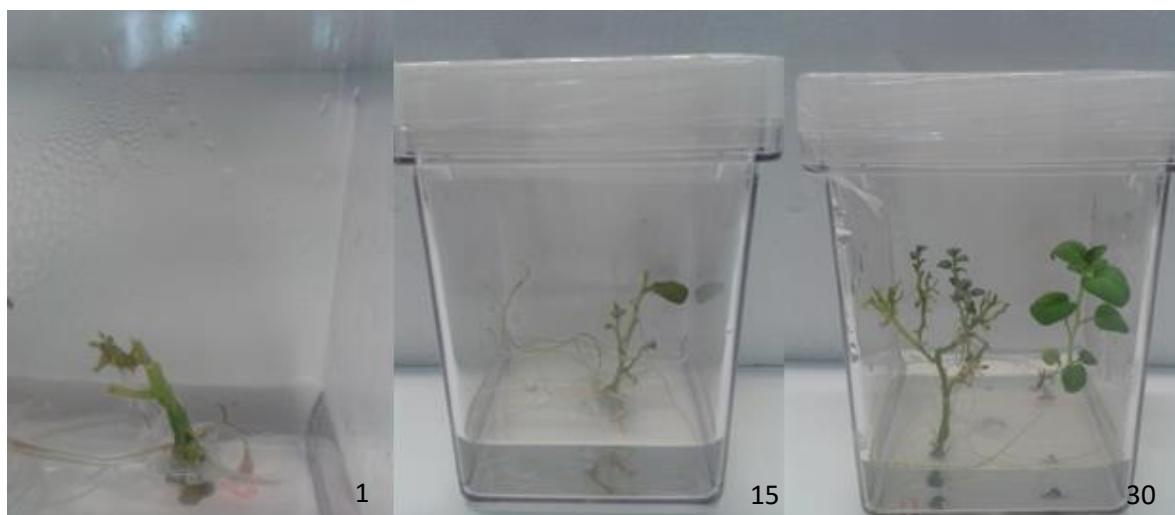
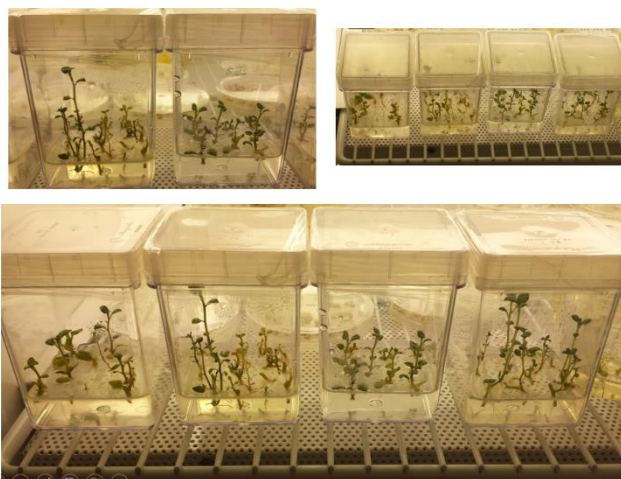
**A****B**

Figura 34.-Propagación de plantas. En la figura A) explantes de aproximadamente 2cm mostrando nódulos. B) propagación de las plantas en nuevos medios en condiciones de fotoperiodo 16h luz/8h oscuridad a 26°C en cámara Conviron.

Transformación genética de explantes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* GL1.

Cuando las plántulas llegaban a un tamaño de aproximadamente 8 - 10cm eran aptas para transformarse. En la figura 35 se muestra que las plantas fueron seccionadas aproximadamente dos centímetros de largo cada una. La transformación con un corte en el tallo de las plantas resultó ser un procedimiento sencillo y rápido. Al evitar el sumergimiento de los explantes en el medio con *Agrobacterium tumefaciens* como se indica en otros protocolos prevenimos que la bacteria invadiera por completo a los explantes y estos murieran en el proceso de transformación.

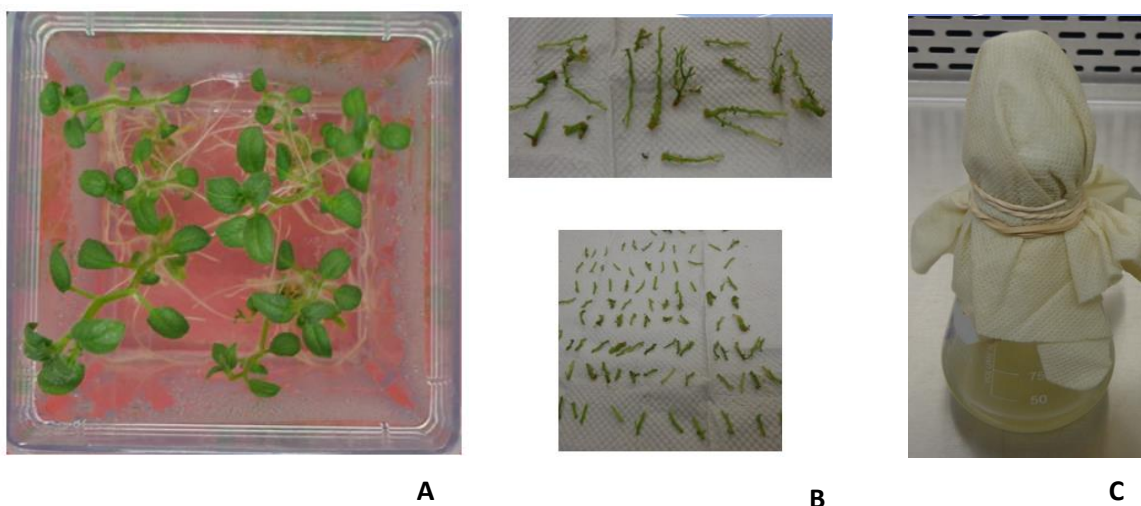


Figura 35.- Transformación de explantes. En la figura A) plantas aptas para la transformación, se observan verdes, con un tallo grueso y con el tamaño aproximado a 8-10cm. B) a las plántulas se les quitan las hojas y son diseccionadas con una navaja la cuál ha sido sumergida en medio LB (C) que tiene *Agrobacterium tumefaciens* GL1 transformada y en el medio se le ha agregado acetosiringona a 140 micromolar en condiciones de esterilidad.

En la siguiente tabla 1 se muestra el número de explantes transformados para cada variedad de papa así mismo el tratamiento que fue utilizado para cada una de las variedades. De cada tallo de las plantas se obtenía aproximadamente 5 segmentos transformados de los cuáles solo había dos segmentos internodales. Se transformaron 160 explantes con el gen Lisozima, para defensina obtuvimos 135 explantes transformados y para AS Trehalasa se transformaron 125 explantes. Estas transformaciones fueron realizadas en diferentes sesiones, en cada sesión se transformaban aproximadamente 25 explantes de cada variedad con cada construcción y en cada transformación se tenían aproximadamente 5 controles.

Gen	Variedad	Numero de explantes transformados	Numero de explantes sin transformar
<i>Lisozima</i>	690	160	32
<i>Defensina</i>	576	135	27
<i>AS Trehalasa</i>	690	125	25

Tabla1.- Explantes transformados. Podemos observar explantes transformados para cada gen y explantes control o no transformados.

Selección y regeneración de explantes transformados.

Los explantes transformados fueron colocados en un periodo de 48h en medio Co-cultivo en oscuridad, en este tiempo el explante tiene contacto en todo momento con *Agrobacterium tumefaciens*. A los medios Co-cultivo se les colocó papel filtro para ser transferidos con mayor facilidad a otro medio, En la figura 36 se puede observar los explantes sobre el papel filtro en el medio de cultivo.

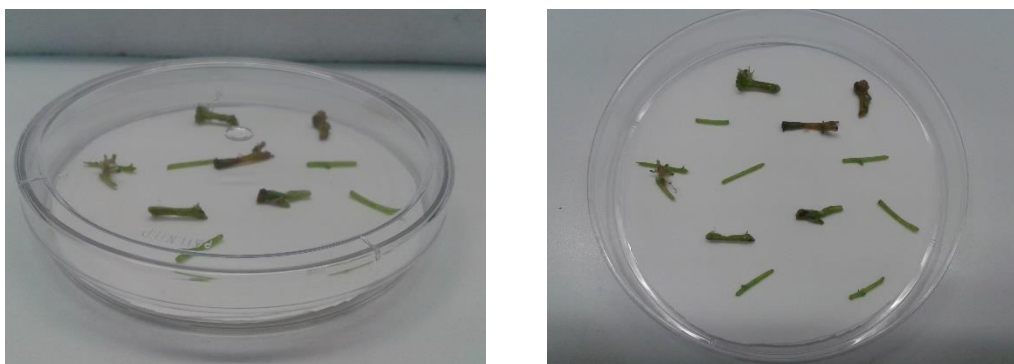


Figura 36.- Explantes en medio Co-cultivo. Se observan explantes sobre el papel filtro estéril previamente colocado sobre el medio de Co-cultivo.

Posteriormente los explantes fueron colocados en medios de selección con glufosinato de amonio, En la figura 37 se observa dentro del ovalo azul explantes muertos que no resistieron el proceso de selección y con la flecha roja se indica un explante vivo en color verde. Esta selección se realizó por 15 días cambiando los explantes cada 5 días a nuevos medios.

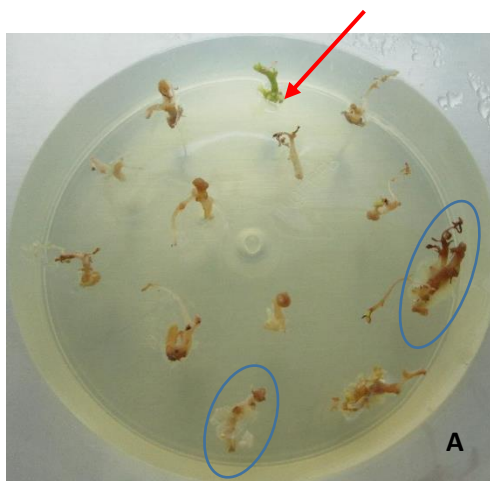


Figura 37.- Medio de selección. En la figura A) se observa que la mayoría de explantes han muerto pues el medio se encuentra adicionado con el agente de selección glufosinato de amonio, el explante señalado es el único explante que sobrevivió y por lo tanto podemos deducir que está transformado genéticamente. Los medios fueron complementados con antibióticos (espectinomicina, Vancomicina y Meropenem para eliminar a *Agrobacterium tumefaciens*, en el ovalo se observa el crecimiento de dicha bacteria en el explante.

En la figura 37 B se muestran explantes sobrevivientes a la selección que fueron pasados a medios de regeneración, el tiempo en el que se mantuvieron estos explantes regenerándose fue de 30 días aproximadamente y fueron cambiados cada 15 días, en la imagen se observa la aparición de raíces y los explantes tienen apariencia verde sin la presencia de *Agrobacterium tumefaciens*.



Figura 37.- Medio de regeneración. B) explantes que después de la selección han sido colocados en medios de regeneración SRM, se observa que la producción de raíces, estos medios tienen aún antibióticos para que no crezca *Agrobacterium tumefaciens*.

En el tiempo de regeneración se observó que seguían muriendo explantes pues el medio también contiene agente de selección, podemos observar en la imagen 37 C y D explantes muertos señalados con flecha azul y plantas regeneradas con la aparición de hojas, la presencia de raíces y hojas se observó después de 15 días de ser colocados en medio de regeneración. Las plántulas sobrevivientes son colocadas en medios de regeneración sin antibióticos y como se muestra en la figura 37 C y D ya no hay crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*, después de aproximadamente dos meses las plantas ya no muestran síntomas de muerte por la bacteria y como un método físico y químico se han obtenido plantas positivas a la transformación.

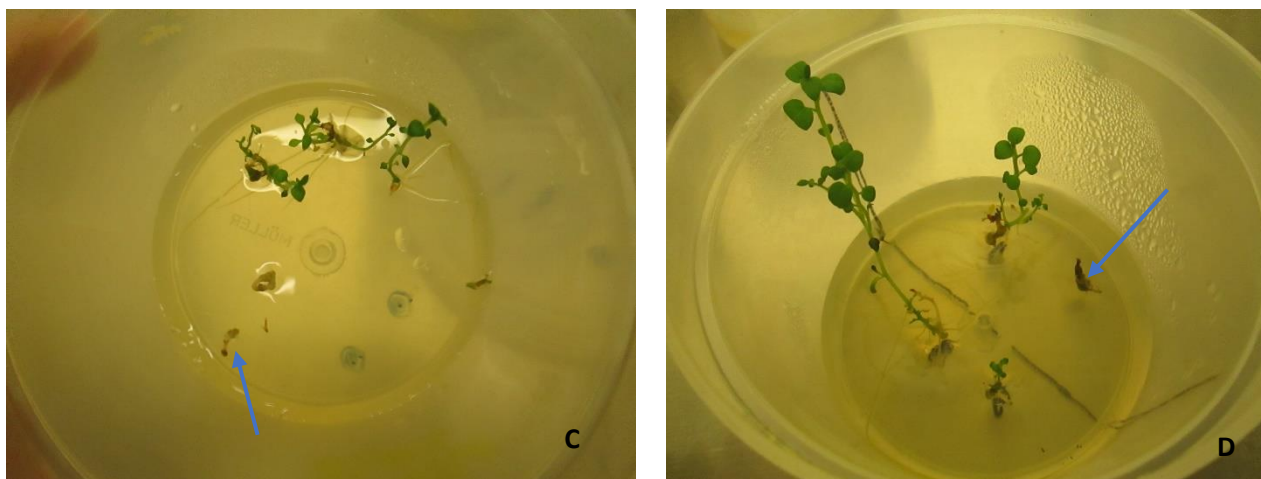


Figura 37.- Medio de regeneración sin antibióticos. C) y D) explantes en medio de regeneración sin antibióticos en el cuál la bacteria ha sido eliminada completamente, los medios contienen aún el agente de selección bialaphos y se observa explantes muertos y plantas que claramente que han sobrevivido a este agente.

En la siguiente tabla 2 se muestra el número de explantes que sobrevivieron en cada tratamiento para Lisozima sobrevivieron 18 explantes, para Defensina se obtuvieron 12 y para el AS Trehalasa 11 explantes.

En esta etapa los explantes no transformados que eran los controles negativos han muerto pues al no tener el plásmido con la resistencia bar no fueron capaces de sobrevivir en un ambiente toxico en el cual existe glufosinato de amonio y por lo tanto murieron.

Gen	Variedad	Numero de explantes transformados	Numero de explantes sobrevivientes
<i>Lisozima</i>	690	160	18
<i>Defensina</i>	576	135	12
<i>AS Trehalasa</i>	690	125	11

Tabla 2.- Explantes sobrevivientes a medios de selección. En la tabla se muestra 18 explantes para lisozima, 12 para Defensina y 11 para AS Trehalasa sobrevivientes a la selección.

Etapa 3

Confirmación de plantas genéticamente modificadas

En la figura 38 observamos hojas de las plantas regeneradas y sobrevivientes a la selección con glufosinato de amonio, se pesó aproximadamente 200mg de hoja a las cuáles se les realizó extracción de DNA con el método de bromuro de cetiltrimetil amonio CTAB y después al DNA genómico obtenido se le realizó PCR para identificar el gen correspondiente. Las hojas fueron obtenidas en un ambiente estéril y se cortaron aproximadamente 2 a 3 de cada planta, inmediatamente fueron colocadas en nitrógeno líquido antes de que empezara el marchitamiento pues fueron recolectadas de plantas in vitro y son muy sensibles al ambiente.



Figura 38.- Muestras de hoja de plantas transformadas. Se pesaron aproximadamente 150-200mg de hojas de las plantas resistentes al tratamiento de selección con Bialaphos para su posterior extracción de DNA por el método CTAB. La colecta de las hojas fue en un área estéril en campana de flujo laminar

PCR de plantas transformadas con la construcción que codifica para la Lisozima

En la figura 39 se muestra los geles después de realizar la técnica de PCR en las plantas sobrevivientes y regeneradas, se utilizaron como controles positivos DNA plasmídico y fueron sometidas a extracción y amplificación, de 18 plantas que sobrevivieron al tratamiento con glufosinato de amonio, solo 10 plantas resultaron positivas a la amplificación por PCR.

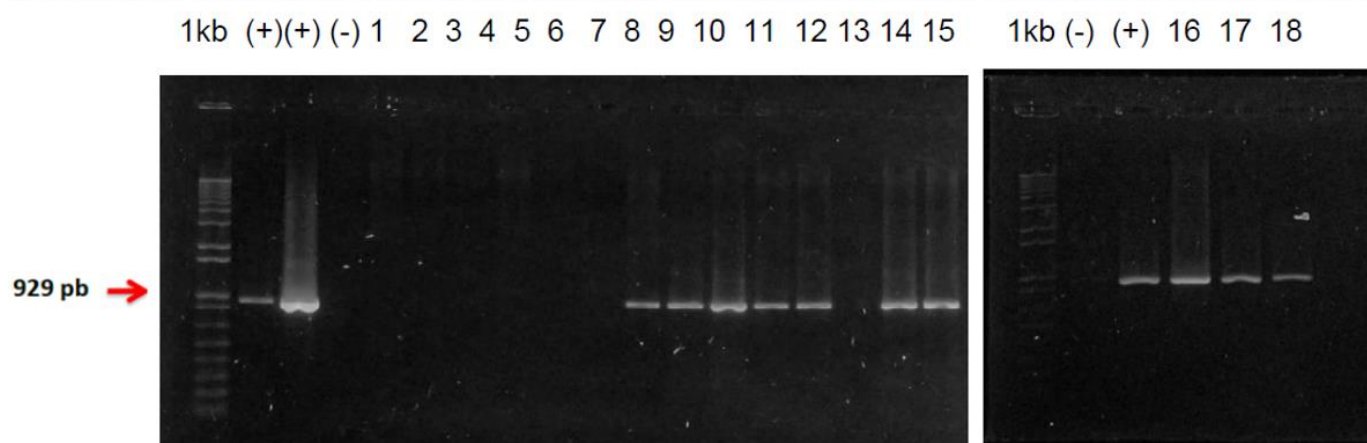


Figura 39.- Muestras positivas en prueba PCR. En la figura se muestra en el primer carril ladder de 1kb de Invitrogen, como muestras positivas se tomaron extracciones de ADN plasmídico y como control negativo plantas no transformadas, el fragmento obtenido corresponde a Lisozima, y de 18 plantas que sobrevivieron al tratamiento de selección solo 11 resultaron positivas al análisis.

A continuación se observa en la figura 40 que en la amplificación del gen Defensina se obtuvieron diez plantas positivas de doce sobrevivientes al tratamiento de selección.

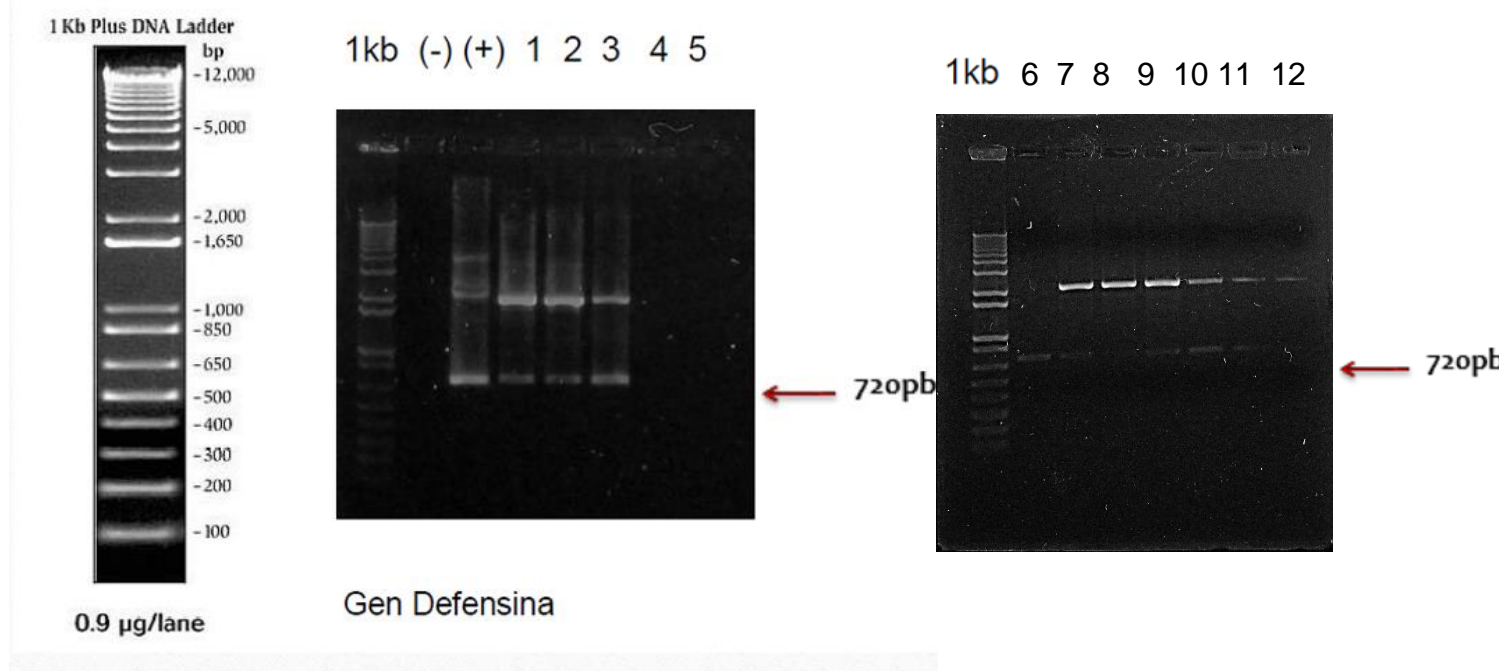


Figura 40.- Plantas positivas a prueba PCR de Defensina. En la figura se muestra en el primer carril ladder de 1kb de Invitrogen, como muestras positivas se tomaron extracciones de ADN plasmídico y como control negativo plantas no transformadas, el fragmento obtenido corresponde a 720pb de Defensina, y de 12 plantas que sobrevivieron al tratamiento de selección 10 resultaron positivas al análisis.

Como resultado de la amplificación de Trehalasa AS obtuvimos cinco plantas positivas de doce sobrevivientes al tratamiento de selección, observaron diferentes fragmentos amplificados pero el fragmento buscado de 684pb si se obtuvo entonces estas plantas se tomaron como positivas a la transformación.

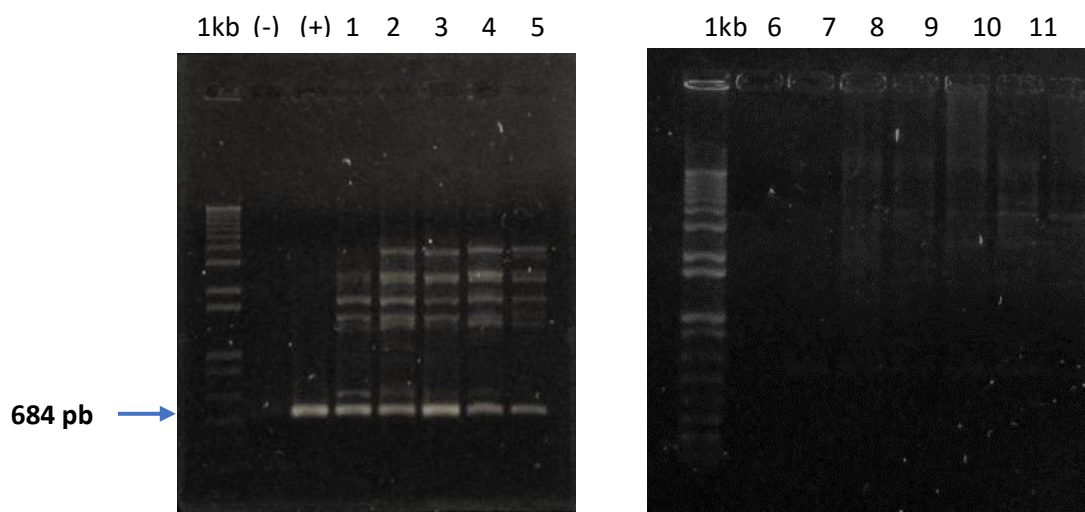


Figura 41.- Plantas positivas al AS Trehalasa. En la figura se muestra en el primer carril ladder de 1kb de Invitrogen, como muestras positivas se tomaron extracciones de ADN plasmídico y como control negativo plantas no transformadas, el fragmento obtenido corresponde a 684pb de Trehalasa, y de 12 plantas que sobrevivieron al tratamiento de selección 5 resultaron positivas al análisis.

En la siguiente tabla se muestra el número de plantas positivas a la transformación así como el porcentaje de transformación. Es interesante el porcentaje pues se obtuvo excelentes eficiencias al obtener del 4% a 7.4% respectivamente y en reportes se obtiene como máximo 2% de eficiencia de transformación, incremento en el porcentaje de material transformado puede ser a causa de la cepa *Agrobacterium tumefaciens* GL1 que es considerada una cepa hipervirulenta y que con estos resultados se demuestra su eficiencia.

Gen	Variedad	Numero de explantes transformados	Numero de explantes sobrevivientes	Numero de explantes positivos a la transformación	Porcentaje de transformación
<i>Lisozima</i>		690	18	11	6.87%
<i>Defensina</i>		576	12	10	7.4%
AS		690	11	5	4%
<i>Trehalasa</i>					

Tabla 3.- Explantes positivos a la transformación. Se observan los números positivos al gen buscado mediante PCR y el porcentaje de transformación para cada construcción.

Al saber cuales eran las plantas que fueron positivas a la transformación y confirmadas molecularmente; estas fueron plantadas en tierra y preparadas para sobrevivir en condiciones de invernadero.

En la imagen 42 A y B se muestran plantas después de dos meses desde su transformación, estas plantas con la presencia de abundantes raíces fueron lavadas con agua estéril para eliminar todo el medio de cultivo y así evitar posteriores contaminaciones, después fueron colocadas en tierra estéril y llevadas a cámara Conviron por dos semanas hasta su posterior aclimatación.

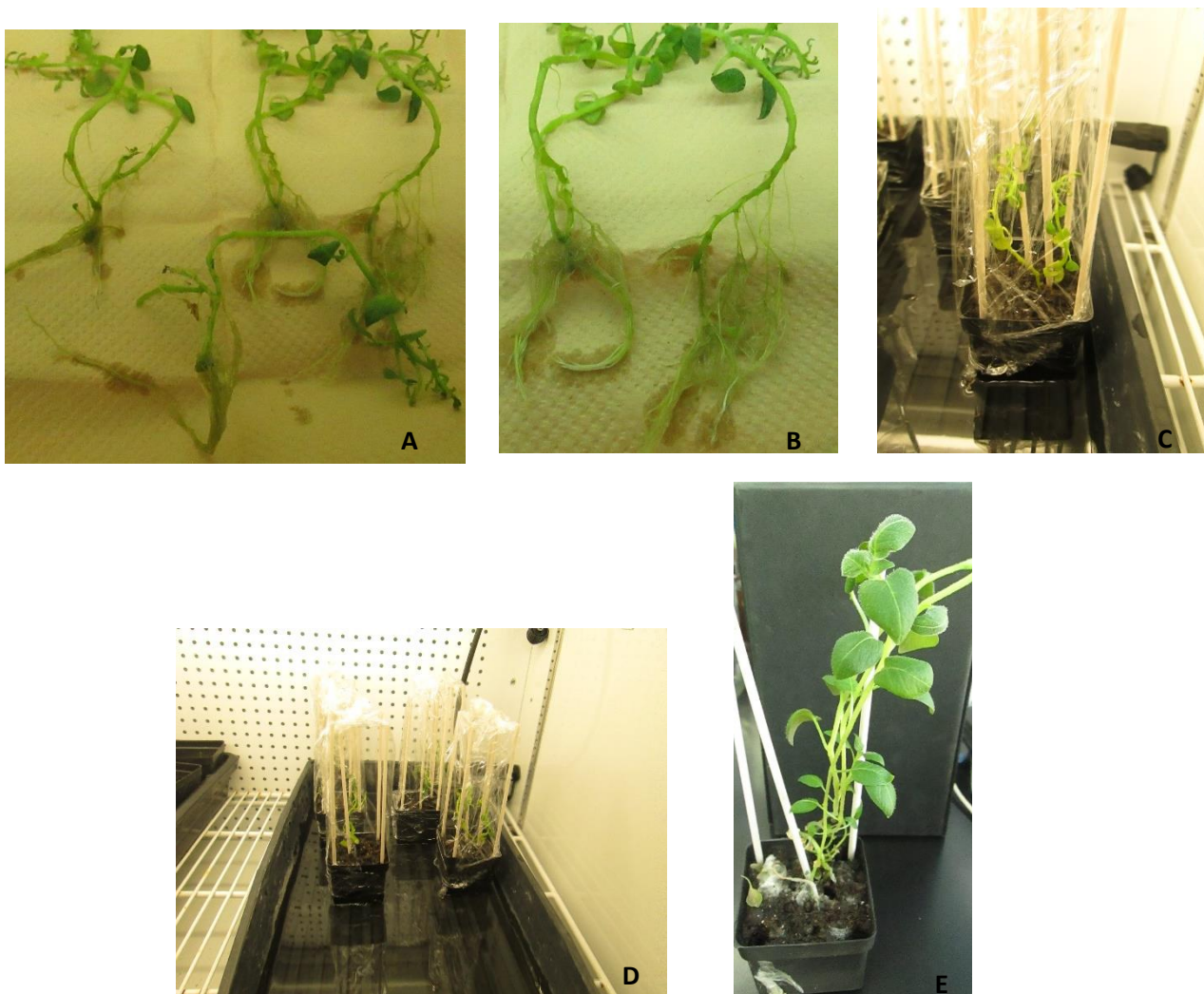


Figura 42.- Pase de plantas a invernadero. A) y B) lavado de raíces con agua estéril hasta eliminar todo el medio de cultivo. C) y D) plantas en cámara Conviron después de colocarlas en tierra. E) planta aclimatada y lista para llevar al invernadero.

Fusión del gen de la Defensina con el gen reportero GFP (Green Fluorescent Protein)

En la siguiente tabla se encuentra representado el número de explantes transformados con la construcción Defensina 16K fusionada a GFP en la variedad de papa 576, el número de explantes transformados fue de 50 de los cuáles sólo sobrevivieron 3 al tratamiento de selección y a su vez los tres explantes sobrevivientes fueron positivos en la prueba molecular PCR dando un fragmento de 700pb, esto nos da como resultado un 6% de transformación total.

<i>Tratamiento</i>	<i>Variedad</i>	<i>Número de explantes transformados</i>	<i>Número de explantes sobrevivientes</i>	<i>Número de explantes positivos a la transformación</i>	<i>Porcentaje de transformación</i>
<i>Defensina 16K + GFP</i>	576	50	3	3	6%

Tabla 4.- Explantes transformados con GFP. Se muestra al igual que las anteriores construcciones el número de explantes sobrevivientes, positivos a PCR y el porcentaje de transformación.

A los explantes se les realizó extracción de ADN genómico y posteriormente se confirmó el fragmento GFP con un peso aproximado de 700pb por medio de PCR, esto mostrado en la siguiente imagen, se observa en el primer carril el marcador de 1kb plus de INVITROGEN, en el carril 2 la muestra positiva y en el carril 3, 4 y 5 el fragmento esperado de DEF16K + GFP en tres explantes seleccionados y regenerados.

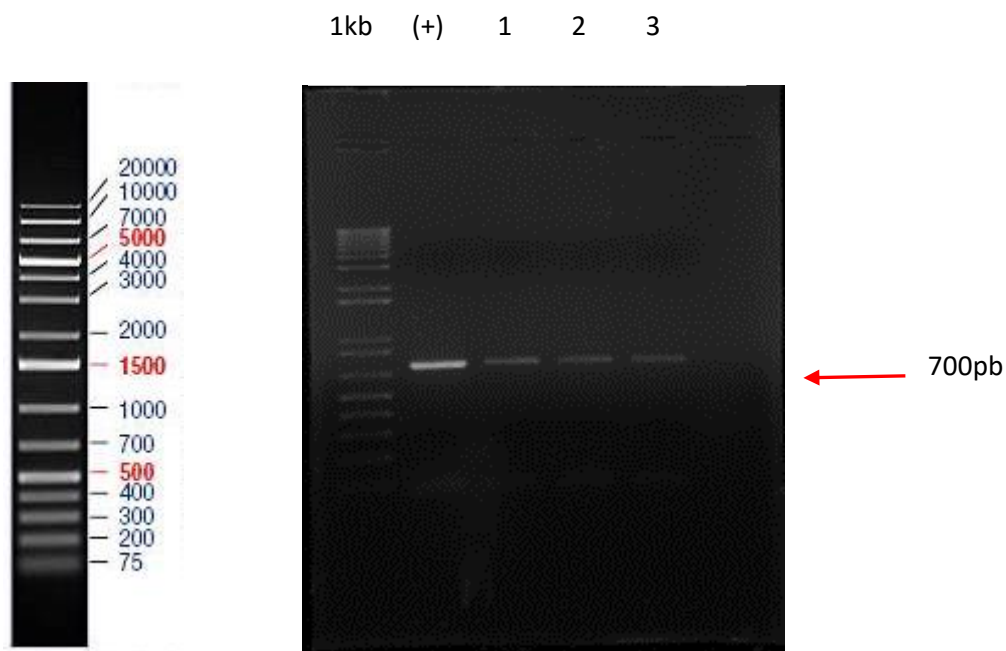


Figura 43.- Detección de GFP. En la imagen se observa la amplificación de GFP en los carriles 3, 4 y 5 y en el carril inicial se encuentra el ladder de 1kb y en el segundo la muestra positiva.

Detección de la proteína GFP (Green Fluorescent Protein) fusionada a Defensina 16K mediante Western blot.

Utilizando anticuerpos GFP rabbit policlonal IgG y Anti rabbit IgG HRP fue posible visualizar la proteína GFP mediante la técnica Western blot, esta proteína se encontraba en todo el extracto proteico extraído de la planta positiva al transgén y esta proteína se detectó con un tamaño aproximado de 42 KDa (GFP 22KDa + CsPP16 16KDa + Def 4KDa). La asignación de valores del peso molecular se realizó tomando como referencia al marcador comercial Marker, Amplia Gama (7-175 KDa) observando que la proteína obtenida si corresponde al valor esperado Figura 44.

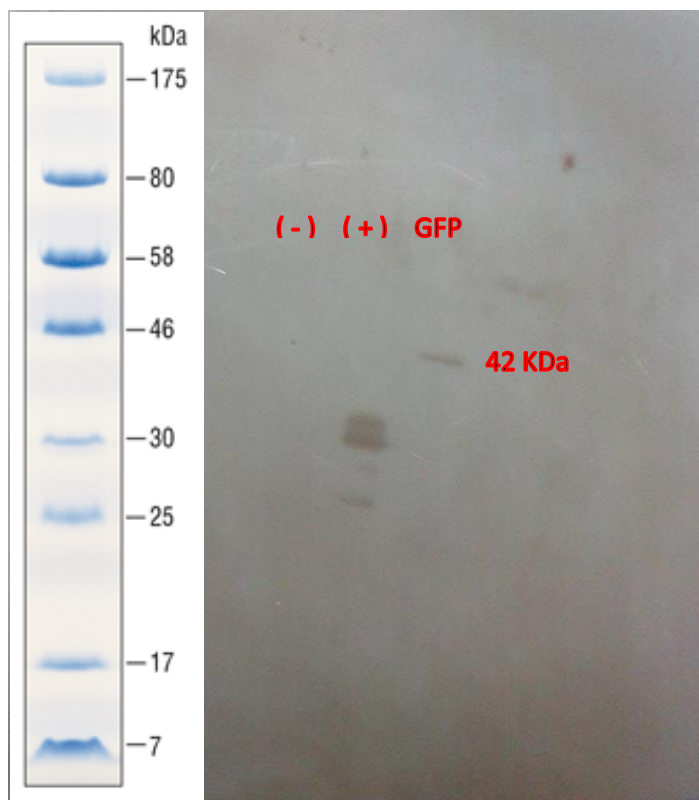


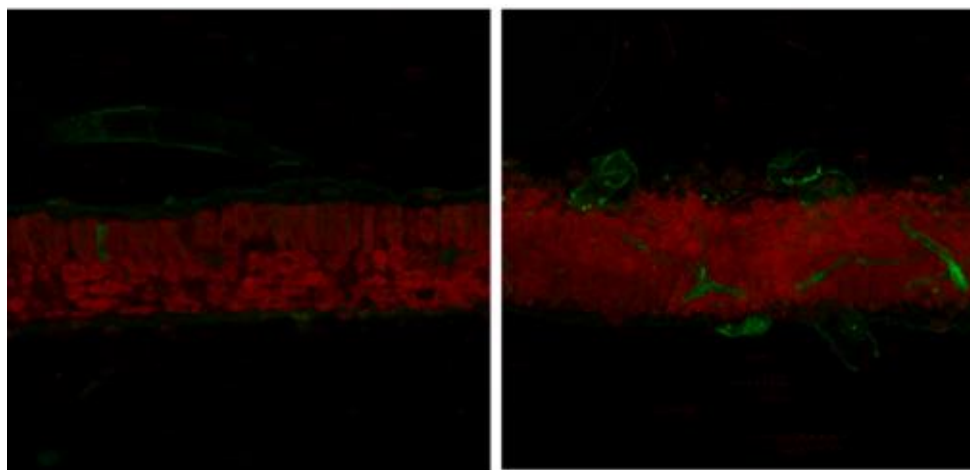
Figura 44.- Detección de GFP. En la imagen se observa la amplificación de GFP en los carriles 3, 4 y 5 y en el carril inicial se encuentra el ladder de 1kb y 96 en el segundo la muestra positiva.

Microscopia confocal

Una vez realizada la detección de GFP por Inmunodetección, se realizaron cortes transversales de hoja y tallo en la muestra positiva, y posteriormente fueron observadas por la técnica de microscopia confocal, en la figura 45 observamos para ambos cortes el control negativo a GFP y las muestras positivas observando en estas claramente la presencia de GFP por la emisión de luz por parte de la proteína verde fluorescente.

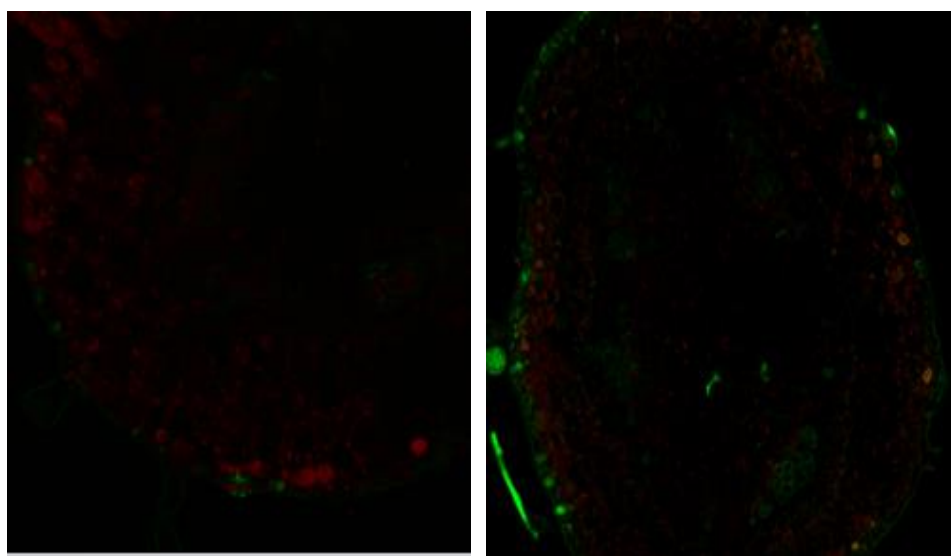
La eficiencia de transformación con GFP como gen marcador fue alta y una de las ventajas de usar genes reporteros es el discriminar eventos no transgénicos al observar la expresión del gen reportero.

En este estudio se mostró la distribución subcelular fluorescente en diferentes tejidos de las plantas en hojas maduras y en tallos que expresan GFP + Defensina. la expresión de este antimicrobiano se visualizó en venas y tricomas así como en el tejido vascular. Se usaron plantas no transformadas con GFP+Defensina como controles negativos ajustando de esta manera los parámetros de fluorescencia de GFP, en los controles pudimos observar autofluorescencia que emite la planta.



Control GFP-CsPP16-def
corte trasversal de hoja

GFP-CsPP16-Def
corte trasversal de hoja



Control GFP-CsPP16-def
corte trasversal de tallo

GFP-CsPP16-Def
corte trasversal de tallo

Figura 45. Imagen confocal de corte transversal de hoja y tallo de papa. A la izquierda se muestra en control con autofluorescencia asociada a cutícula y tricoma en la región abaxial. A la derecha se muestra un corte de papa GM expresando la fusión GFP-Def-CsPP16, mostrando la movilización de la fusión proteica hacia las venas de último orden. Se muestran tricomas con autofluorescencia similar a la presente en el control observado en hojas y tallos.

10. Conclusiones

En este trabajo se han transformado eficientemente plantas de papa (*Solanum tuberosum*) con la cepa hipervirulenta de *Agrobacterium tumefaciens* GL1.

Fue posible obtener plantas transformadas con Defensina, Lisozima y AS Trehalasa, asimismo se ha comprobado molecularmente la inserción del gen.

Al transformar plantas con Defensina 16K + GFP se ha demostrado por PCR la inserción del gen así como la expresión de la proteína por la técnica de Western blot.

Mediante el uso de microscopía de barrido láser confocal, se analizó la distribución subcelular de la proteína GFP + Defensina.

La expresión de péptido antimicrobiano fusionado a GFP fue localizado en el tejido vascular, en venas y tricomas utilizando un promotor constitutivo 35S.

La expresión de péptidos antimicrobianos nos ofrece una estrategia para mejorar la resistencia a Zebra Chip sin cambiar las propiedades del cultivo causando en este una aceptación para el consumo humano.

Se ha confirmado la transformación de las plantas a través de la localización de la proteína GFP.

Se ha obtenido un porcentaje alto en la transformación con la cepa *Agrobacterium tumefaciens* GL1, utilizando un protocolo rápido y sencillo produciendo transformaciones exitosas.

Se ha demostrado la confiabilidad del uso de Glufosinato de amonio como factor de selección en las plantas transformadas.

11. Perspectivas a futuro

Como planes a futuro se quiere que estas plantas transformadas puedan ser retadas contra el psílido *Bactericera cockerelli* responsable de la transmisión de *Candidatus Liberibacter solanacearum*.

12. Anexos

Anexo A

Secuencias y oligos para amplificación de CsPP16- lisozima, Trehalasa y Defensina

CsPP16- lisozima

Secuencia:

ATGGGGATGGGAATGATGGAGGTCCATTTGATTAGTGGTAAAGGACTTC
 AAGCCCACGACCCTCTTAATAAACCAATTGACCCTTATGCTGAGATCAAC
 TTCAAGGGCCAAGAACGCATGAGCAAAGTTGCTAAAAATGCAGGACCAA
 ATCCATTATGGGATGAGAAATTTAAATTCCTAGCCGAGTACCCTGGGAG
 CGGTGGTGACTTCCATATCTTATTCAAGGTCATGGACCATGACGCTATAG
 ATGGTGATGATTACATTGGCGATGTCAAATAGATGTCAAGAATTTATTA
 GCGGAAGGAGTTAGAAAAGGAAAGTCGGAGATGCCGCCTAGAATGTAC
 CATGTCTTAGCACACAAAATCCACTTCAAGGGAGAAATTGAAGTTGGAGT
 GTCCTTCAAGCTGCAAGGCGGCGGGGGATGTGGAGGATGTTACCCATG
 GGAAAACCTTAGCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGG
 TGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGTAGCGCTGCTGCTAAGGTTTTTCGAAAG
 ATGCGAACTTGCTAGAACACTTAAGAGACTTGGTATGGATGGTTATAGAG
 GTATTAGCCTTGCTAATTGGATGTGCCTTGCTAAGTGGGAAAGCGGTTAT
 AATACAAGAGCTACAAATTATAATGATAGAAGCACAGATTATGGTATTTTC
 CAAATTAATAGCAGATATTGGAGATGCAATGATGGTAAGACACCAGGTG
 CTGTTAATGCTTGCCATCTTAGCTGCAGCGCTCTTCTTCAAGATAATATT
 GCTGATAATATTGCTGATGCTGTTGCTTGCGCTAAGAGAGTTGTTAGAGA
 TCCACAAGGTATTAGAGCTTGGGTTGCTTGGAGAAATAGATGCCAAAATA
 GAGATTGCAGACAATATGTTCAAGGTTGCGGTGTTTAG

Oligo directo (5')

ATGGGGATGGGAATGATGGAGGTCCATTTG

Oligo reverso (3')

CTAAACACCGCAACCTTGAACATATTGTCTGCA

Gen Trehalasa*Secuencia:*

TACTTCCTGACAGTCTGCATCACCAGGAAGCCTATCCCTGCGGCATGAA
 GTAATCCAGATGCCTTGAGGCTCGCCATGACTCGGAATGGTATGCATTT
 AGCCACAGCGGAACGAAGTTGGAAGCAAATATGTTGCGGTTCTGTGAGT
 TAGGCTTCCATTTCGTGCAATAGTCAAGCCACTGTTCCATCTCAGAGTTCC
 AAAAAATAGAGTCAATTGCAATATGACGTGCTTTCGAAGCATTAAAAAA
 AATTCTGAAGTCGCATTATCTCCTACGACTTTAGCCAAGGCACCAATATC
 CAGCTCCATCTTAAAAAGAAATGTGTTCAAGTCCACAGGTATTATGTAAG
 TGGTTGCCAATGTTGTCATGTCAGTAGATTTCCATCCATCGAGAGCTG
 AAATCCCATCCCGATTCTGCCGTTGAAGCAATTTTCGCAGTACAGTTTTTC
 CTTAGCTGCCATAGATTTCAACTTCGAAGCCAGTTCCTCATCAATTGTCG
 CACTTTCAGGCCTAGGTTTGTCCACCTGGCCTGATACCGAGATAAATTA
 TGGACCCGACCATGATTGTCTGCTATAGCAACATTATGAATCTCTGACAT
 CCAGAAGCTATGCTCTTTAAGCAGAGAGTGGAATACTGTCTAACAACT
 CCACATCACCAGT TGCCCTGTATATTTCTAAAACCAT

Oligo directo (5')

TACTTCCTGACAGTCTGCATCACCAGGAAG

Oligo reverse (3')

ATGGTTTTAGAAATATACAGGGCAACTGG

Defensina*Secuencia:*

ATGAGAGTTCTTTATCTTCTTTTCAGCTTCCTTTTCATTTTCCTTATGCCA
 CTTCCAGGTGTTTTCGGTGGTATTGGTGATCCAGTTACATGCCTTAAGAG
 CGGTGCTATTTGCCATCCAGTTTTCTGCCAAGAAGATATAAGCAAATTG
 GTACATGCGGTCTTCCAGGTACAAGATGCTGCAAGAAGAAGTAG

Oligo directo (5')

TATGCCACTTCCAGGTGTTT

Oligo reverse (3')

AAACTGGATGGCAAATAGCAC

Anexo B**Mezcla y condiciones de PCR para las construcciones Lisozima,
Defensina y Trehalasa****Condiciones de PCR*****Programa de amplificación para Lisozima******Temperatura de la tapa del termociclador 96°C***

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94°C	3:00 minutos
2	94°C	0:35 minutos
3	64°C	0:35 minutos
4	72°C	2:00 minutos
5	72°C	8:00 minutos
6	16°C	Pausa (0:00) minutos

Condiciones de PCR

Programa de amplificación para Trehalasa

Temperatura de la tapa del termociclador 96°C

<i>Paso</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>
<i>1</i>	94°C	3:00 minutos
<i>2</i>	94°C	0:35 minutos
<i>3</i>	60°C	0:35 minutos
<i>4</i>	72°C	2:00 minutos
<i>5</i>	72°C	8:00 minutos
<i>6</i>	12°C	Pausa (0:00) minutos

Condiciones de PCR***Programa de amplificación para Defensina******Temperatura de la tapa del termociclador 96°C***

<i>Paso</i>	Temperatura	Tiempo
1	94°C	3:00 minutos
2	94°C	0:35 minutos
3	58°C	0:35 minutos
4	72°C	2:00 minutos
5	72°C	8:00 minutos
6	16°C	Pausa (0:00) minutos

Condiciones de PCR***Programa de amplificación para GFP******Temperatura de la tapa del termociclador 96°C***

<i>Paso</i>	Temperatura	Tiempo
1	94°C	4:00 minutos
2	94°C	0:30 minutos
3	60°C	0:30 minutos
4	72°C	0:45 minutos
5	72°C	4:00 minutos
6	16°C	Pausa (0:00) minutos

Mezcla de reacción

Reactivo	1 Reacción
Buffer 10X	1.25µL
dNTPs	1.00 µL
Oligo F 5´	0.25 µL
Oligo R 3´	0.25 µL
Enzima Takara	0.06 µL
cDNA	1.0 µL

La mezcla de reacción para PCR es igual para las tres construcciones y GFP

Anexo C**Medio LB (Luria Bertani)**

Para preparar 100 mL de medio:

Medio LB (Luria Bertani)

<i>Reactivo</i>	Concentración gr/100mL
<i>Triptona</i>	1 gr
<i>Extracto de levadura</i>	0.5 gr
<i>NaCl</i>	1 gr
<i>Agarosa</i>	1.5 gr

Diluir en 100mL de agua y esterilizar en autoclave 121°C durante 20 minutos.

Anexo D**Medio SOC****Medio SOC**

Reactivo	Concentración gr/1L
<i>Triptona</i>	20 gr
<i>Extracto de levadura</i>	5 gr
<i>NaCl</i>	0.5 gr

- ✦ Disolver todos los elementos en 950mL de agua.
- ✦ Agregar 10mL de KCl 250 mM a pH:7
- ✦ Adicionar 25mL de agua y esterilizar en autoclave 121°C durante 20 minutos.
- ✦ Una vez estéril adicionar 5mL de MgCl 2M previamente estéril.
- ✦ Finalmente se agregó 20mL de Glucosa 1M que fue previamente esterilizada por filtración.

Anexo E

Soluciones de lisis alcalina

Solución	Concentración
<i>Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico</i>	(25:24:1)
<i>Etanol (CH₃-CH₂-OH)</i>	Absoluto
<i>Etanol (CH₃-CH₂-OH)</i>	70 %
Solución de lisis alcalina 1	
<i>Glucosa (C₆H₁₂O₆)</i>	50 mM
<i>Tris H Cl pH 8</i>	25 M
<i>EDTA pH 8 (ácido etilendiaminotetra acético)</i>	10 mM

Solución de lisis alcalina 2

<i>Hidróxido de sodio (Na OH)</i>	0.2 N
-----------------------------------	-------

<i>SDS (Dodecilsulfato sódico)</i>	1 %
------------------------------------	-----

Solución de lisis alcalina 3

<i>Acetato de potasio (CH₃-CO₂-K)</i>	30 mL
---	-------

<i>Ácido acético glacial (CH₃-COOH (C₂H₄O₂))</i>	11.5 mL
--	---------

<i>Agua (H₂O)</i>	28.5mL
------------------------------	--------

Anexo F**Composición de solución 1MS (Murashige, T. y Skoog, F; 1962)**

<i>Reactivo</i>	<i>Formula</i>	<i>[mM]</i>	<i>g/L</i>
<i>Nitrato de amonio</i>	NH ₄ NO ₃	20.6	8.25
<i>Nitrato de potasio</i>	KNO ₃	18.8	9.5
<i>Cloruro de calcio</i>	CaCl ₂ .H ₂ O	3.0	2.2
<i>Sulfato de magnesio</i>	MgSO ₄ .7H ₂ O	1.5	1.85
<i>Yoduro de potasio</i>	KI	0.005	0.0041
<i>Ácido bórico</i>	H ₃ BO ₃	0.1	0.031
<i>Sulfato manganoso</i>	MnSO ₄ .7H ₂ O	0.1	0.0845
<i>Sulfato de zinc</i>	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.03	0.043
<i>Molibdato de sodio</i>	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O*	0.001	0.5 mL
<i>Sulfato cúprico</i>	CuSO ₄ .5H ₂ O**	0.0001	0.5 mL
<i>Cloruro de cobalto</i>	CoCl ₂ .6H ₂ O**	0.0001	0.5 mL

* preparar una solución 2.5 mg/mL

** preparar una solución de 0.25 mg/mL

Composición de solución 2MS (Murashige, T. y Skoog, F; 1962)

Reactivo	Fórmula	[mM]	g/100mL
<i>Fosfato monobásico de potasio</i>	KH ₂ PO ₄	1.15	1.7

Composición de solución 3MS (Murashige, T. y Skoog, F; 1962)

Reactivo	Formula	[mM]	g/100 MI
<i>Sulfato Ferroso</i>	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1	0.139
<i>EDTA</i>	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0.1	0.1865
<i>Inositol</i>	C ₆ H ₁₂ O ₆	0.5	
<i>Glicina</i>	NH ₂ CH ₂ COOH	0.01	
<i>Clorhidrato de piridoxina</i>	C ₈ H ₁₂ ClNO ₃	5.0 mL	
<i>Acido nicotínico</i>	C ₆ H ₅ NO ₂	0.5 mL	
<i>Clorhidrato de tiamina</i>	Tiamina H Cl ** C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	0.5 mL	

* Preparar una solución que contenga 5 mg/mL

** Preparar una solución que contenga 1 mg/mL

Las tres soluciones MS se esterilizan por filtración con equipo milipore y con me

mbrana de 0.45 o 0.22 micras previamente estéril. Mantener las soluciones en refrigeración a 4°C.

Para preparar 1 Litro de medio MS se necesita:

Solución 1MS 200mL /L

Solución 2MS 10mL/L

Solución 3MS 20mL/L

Disolver en 1L de agua y agregar 30 gr de Sacarosa (SIGMA).

Ajustar pH: 5.8

Agregar 3gr de Phytigel (SIGMA). Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C a 15 libras de presión.

Anexo G

Medio Co-cultivo

Para preparar 1Litro de medio:

- ✦ Solución 1MS 200mL /L + Solución 2MS 10mL/L + Solución 3MS 20mL/L
- ✦ Disolver en 1L de agua

- ✦ Agregar 30 gr de Sacarosa. (SIGMA)
- ✦ Ajustar pH: 5.8
- ✦ Agregar 3gr de Phytigel (SIGMA) y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C a 15 libras de presión.
- ✦ Cuando el medio está estéril se le agregan las siguientes fitohormonas: Ácido Indol Acético (AIA), 2 Isopentiladenin (2IA)
SIGMA

100 µL de hormonas / 100mL de medio.

Medio SRM “Regeneración”

Para preparar 1Litro de medio:

- ✦ Solución 1MS 200mL /L + Solución 2MS 10mL/L + Solución 3MS 20mL/L
- ✦ Disolver en 1L de agua
- ✦ Agregar 30 gr de Sacarosa.
- ✦ Ajustar pH: 5.8
- ✦ Agregar 10 gr de Phytigel y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C a 15 libras de presión.
- ✦ Cuando el medio está estéril se le agregan la siguiente fitohormonas:
Bencilaminopurina (BAP) SIGMA

100 µL de hormona / 100mL de medio.

Medio SRM “Regeneración” adicionado con antibióticos

Para preparar 1Litro de medio:

- ✦ Solución 1MS 200mL /L + Solución 2MS 10mL/L + Solución 3MS 20mL/L
- ✦ Disolver en 1L de agua
- ✦ Agregar 30 gr de Sacarosa.
- ✦ Ajustar pH: 5.8
- ✦ Agregar 10 gr de Phytigel (SIGMA) y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C a 15 libras de presión.
- ✦ Cuando el medio está estéril se le agregan la siguiente fitohormonas:
Bencilaminopurina (BAP) SIGMA ,100 µL de hormona / 100mL de medio.
- ✦ **Adicionar Vancomicina (50mg/ML), Cefatoxima (100mg/ML) y Meropenem (100mg/ML)**

Anexo H

Solución CTAB Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio “Buffer de extracción”

Para preparar 100mL de CTAB al 2%

En un matraz agregar

✦ Tris 1M pH:8 : 10mL

✦ EDTA 0.5 M pH:8 : 4mL

✦ NaCl 5N: 28mL

✦ H₂O: 40mL

Homogenizar y adicionar

✦ 2gr de CTAB

✦ 1gr de PVP (Polivinilpirrolidona)

✦ Aforar volumen a 100mL y esterilizar por autoclave

Anexo I

Concentraciones a las que se utilizaron los antibióticos

Espectinomicina, 100mg/mL.

Kanamicina 25mg/mL

Espectinomicina 50mg/mL

Carbemicina 50mg/mL

Acetociringona 100mg/mL

Vancomicina 50mg/mL

Cefatoxime 100mg/mL

Meropenem 100mg/mL

Filtrar los antibióticos con membrana de 0.45 o 0.22 micras y colocarlos en tubos eppendorf estériles. Almacenar a -20°C

Anexo J

Soluciones

CaCl₂ (Cloruro de Calcio) 100Mm

$$100mM \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mM}} \frac{110.9gr}{1 \text{ mol}} = 11.09gr/1000mL$$

KCl (Cloruro de potasio) 250 mM

$$250mM \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mM}} \frac{74,5513gr}{1 \text{ mol}} = 18.63gr/1000mL$$

MgCl (Cloruro de magnesio) 2M

$$50mL \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} \frac{95,211 \text{ gr}}{1 \text{ mol}} = 4.76055gr/50mL$$

C₆H₁₂O₆ Glucosa 1M

$$50\text{mL} \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} \frac{180,1559\text{gr}}{1\text{mol}} = 9.0077\text{gr}/50\text{mL}$$

C₆H₁₂O₆ Glucosa 50 mM

$$50 \text{ mM} \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mM}} \frac{180,1559\text{gr}}{1\text{mol}} = 9.077\text{gr}/1000\text{mL}$$

Tris 1M pH: 8

$$50\text{mL} \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} \frac{121.14 \text{ gr}}{1\text{mol}} = 6.057\text{gr}/50\text{mL} \quad \text{Ajustar pH con HCl}$$

Tris HCl 25 M pH: 8

$$200\text{mL} \frac{25 \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} \frac{121.14 \text{ gr}}{1\text{mol}} = 605.7\text{gr}/50\text{mL} \quad \text{Ajustar pH con HCl}$$

EDTA (ácido etilendiaminotetra acético) 0.5M pH: 8

$$50\text{mL} \frac{0.5 \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} \frac{292 \text{ gr}}{1\text{mol}} = 7.3\text{gr}/50\text{mL} \quad \text{Ajustar pH con NaOH}$$

EDTA (ácido etilendiaminotetra acético) 10 mM pH: 8

$$10mM \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mM}} \frac{292gr}{1 \text{ mol}} = 2.92gr/1000mL \quad \text{Ajustar pH con NaOH}$$

NaOH (Hidróxido de Sodio) 0.2 N

$$50mL \frac{0.2N}{1000 \text{ mL}} \frac{39,997gr}{1 \text{ NaOH}} = 0.39gr/50mL$$

NaCl (Cloruro de Sodio) 5N

$$50mL \frac{1N}{1000 \text{ mL}} \frac{58.44 \text{ gr}}{1N \text{ NaCl}} = 2.9gr/50mL$$

Agarosa al 1% con bromuro de etidio

Pesar 1 gr de Agarosa grado biología molecular y diluir en 99 mL de buffer

TBE más 1 μ L de Bromuro de etidio y calentar hasta disolver los componentes.

Buffer TBE

1 litro 10X de TBE.

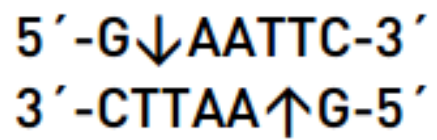
Reactivo Concentración

<i>Tris Base</i>	108 g
<i>Ácido Bórico</i>	55 g
<i>EDTA (pH 8.0)</i>	40 ml

Anexo K

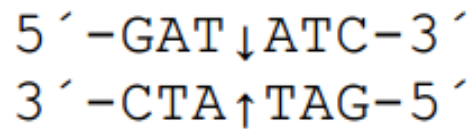
Enzimas y sus sitios de corte o restricción

EcoRI



Incubar a 37°C

EcoRV



Incubar a 37°C

Anexo L SDS-PAGE/glycerol

Buffer de extracción de proteína

Para 10mL de buffer agregar

2mL de Tris HCl 100mM

2mL de SDS al 2%

4mL de Glycerol al 20%

2mL de DTT a 200mM ó β -mercaptoetanol al 20mM (10 μ L)

Buffer de transferencia

Para 200mL agregar:

15 gr de Glycina

3.02 gr de Tris base

200mL de metanol.

12% Resolving

1.0 mL de Agua

1.25mL de Glicerol al 50%

1.25mL de Resolving Gel Buffer Stock

1.9mL de 40T:3C Acrilamida

25 μ L de APS

2.5 μ L de TEMED

4% Stacking gel

1.3mL de Agua

0.5mL de Stacking Gel Buffer Stock

0.2mL de 40T:3C Acrilamida

20 μ L de APS

2 μ L de TEMED

13. Bibliografía

1. **Almeyda L., I. H.; Rubio C., O. A. y Zavala Q., T. (1999).** Determinación de la implicación de fitoplasmas con la expresión sintomatológica de punta morada en papa (*Solanum tuberosum* L.). In: IV Simposio de Ciencia y Tecnología. Desarrollo Agropecuario. Secretaría de Educación Pública, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Monterrey, Nuevo León. p. 45.
2. **Almeyda-León, I., Sánchez-Salas, J. y Garzón-Tiznado, J. (2008).** Vectores causantes de punta morada de la papa en Coahuila y Nuevo León, México. Agricultura. Tec. Mex. 34(2):141-150.
3. **Alberts y cols. (2002).** Molecular Biology of the Cell. 4th ed
4. **Argen Bio; (2007).** Consejo Argentino para la información y el desarrollo de la Biotecnología.
5. **Ana Valderrama F; Rafael Arango I; Lucia Afanador Kafuri. (2005).** Transformación de plantas mediada por Agrobacterium: “ingeniería genética natural aplicada”
6. **ANMAT Argentina; (2010).** Centro colaborador de la Administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnología Médica
7. **Atkinson, H. J., Grimwood S., and Green J. (2004).** Prototype demonstration of transgenic to the nematode *Radopholus similis* conferred on banana by a cystatin. Transgenic Research 13: 135-142.
8. **Azcón, B.J.; Talón, M. (2000).** Fundamentos de Fisiología Vegetal. Barcelona, España. Ediciones Mc Graw Hill Interamericana. Pág. 416

9. **Bové, J. M. (2006).** Huanglongbing: a destructive, newlyemerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88: 7–37
10. **Bravo, M. E. y López, L.P. (2007).** Principales plagas del chile de agua en los Valles Centrales de Oaxaca.
11. **Bray, E.A.; Bailey, S.; Weretilnyk, E. (2000).** Responses to abiotic estresses. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Editorial Grissem W, Buchanan B & Jones R, eds. American Society of Plants Physiologists, Rockville, MD. 103, 1035- 1040.
12. **Bujanos, R., Garzón, J. A. y Marín, A. (2005).** Manejo Integrado del pulgón saltador *Bactericera Paratrioza cockerelli* Sulc Hemiptera: Triozidae en los cultivos de solanáceas en México. *Second World Pepper Convention* pp. 93-99.
13. **CAB International. (2011).** *Candidatus Liberibacter solanacearum*.
14. **Cadena-Hinojosa, M. A. (1996).** La punta morada de la papa en México: Efecto de cubiertas flotantes, genotipos y productos químicos. *Rev. Mex. Fitopatol.* 14:20-24.
15. **Cedillo Jiménez y col., (2012); Agreda Laguna y col., (2012).** Transformación genética de maíz (*Sea mays*) para conferirle tolerancia a sequías.
16. **Centro Internacional de la Papa. (2008).** Manual del tizón tardío (*Phytophthora infestans*). Información Técnica. Bayer de México, S. A. de C.V. Lima, Perú. 25-26. Bayer, 45p.
17. **Crowe L.M.; Crowe J.H.; oliver A.E.; Tsvetkova N.; Wolkers W. and Tablin F. (2001)** The trehalose myth revisited: introduction to a

symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*. 43, 89-105.

- 18. Csaikl u., M.; Batian, H.; Hrettschneider, r.; Gauch, S.; Meir, A.; Schauerte, M.; Scholz, F.; Uperisen, C.; Vornam, B. Y Ziegenhagen, B. (1998).** Comparative analysis of different DNA extraction protocols: A fast, Universal maxi-preparation of High quality plan DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies. *Plant Molecular Biology Reporter*. 16: 69-86.
- 19. Davies, P.J. (1995).** The Plant Hormones: Their Nature, Occurence And Factors In Plant Physiology. *Biochemistry And Molecular Biology* 2nd Edition, Khwer Academic Publishers.1-5.
- 20. Díaz, C.; Antón D. (2002).** Sequía en un mundo sin agua. Edición en línea. CIRA-UAMEX. México. Recuperado de <http://www.cosmovisiones.com>
- 21. Divo, D.C.; Vilella, F.; D'ambrogio, A. (2003).** Determinación del momento óptimo de aplicación de 6-Bencilaminopurina y correspondencia con la secuencia histológica en el proceso de enraizamiento de estacas semileñosas de *Jazminum Mesnyi* Hanse. In Mascarini, L., Vilella, F., & Wright, J. (Eds), *Floricultura En La Argentina: Investigación Y Tecnología De Producción*. Buenos Aires. (Facultad De Agronomía De La Univ. Buenos Aires). 2, 81-89
- 22. FAO; (2008).** Año internacional de la papa <http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/cultivo.html>
- 23. Flores, O.A., Alemán, N.I.A. y Notario, Z.M.I. (2008).** Alternativas para el manejo de la punta morada de la papa. Pp. 66-89. In: Flores Olivas, A. y Lira Saldivar, R.H. (eds). *Detección, Diagnóstico y Manejo de la Enfermedad Punta Morada de la Papa*. Ed. Parnaso. Málaga, España.

- 24. Garza, L.J.C. (1999).** Control de la marchitez de la planta y necrosis interna del tubérculo en papa en Coahuila y Nuevo León. Campo Experimental Saltillo, INIFAP. 11.
- 25. Garzón-Tiznado, J., Cárdenas-Valenzuela, O., BujanosMuñiz, R., Marín-Jarillo, A., Becerra-Flora, A., Velarde-Felix, S., Reyes-Moreno, C., GonzálezChavira, M. y Martínez-Carrillo, J. L. (2009).** Asociación de Hemiptera: Triozidae con la enfermedad "Permanente del tomate" en México. Agricultura Técnica en México 35: 61-72
- 26. Gómez, G. Y., Jaramillo, O. E., Jaramillo, S., Hoyos, S. R. (1997).** Regeneración de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) a partir de hojas foliar en las variedades Diacol Capiro y Parda pastusa. Revista papa, 17: 2-6.
- 27. Gudmestad, N. C., Secor, G. A. (2007).** Zebra Chip: A new disease of potato. Nebr Potato Eyes 19:1- 4.
- 28. Hansen, A.K., Trumble, J.T., Stouthamer, R. and Paine, T.D. (2008).** A new Huanglongbing (HLB) species, "Candidatus Liberibacter psyllaurous," found to infect tomato and potato, is vectored by psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). Applied Environmental Microbiology 74:5862- 5865.
- 29. Hernández, C.M.E.; Torres, T.L.A.; Valdez, M.G. (1992).** Sequía meteorológica. Recuperado de http://www.atmosfera.unam.mx/libros/cambio_climatico/sequia.pdf. 28-33.
- 30. ITESM. (2003).** Informe del Foro Cadena Agroalimentaria de Papa (Alta Tecnología). Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey Campus Saltillo. Saltillo, Coah., México. 35

- 31. José F. Morales. (2006).** Transformación genética de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) con el gen que codifica para el inhibidor de cisteín proteinasas de origen humano; Cistatina. Universidad de Colima.
- 32. Lacey, L. A., Liu, T. X., Buchman, J. L., Munyaneza, J. E., Goolsby, J. A., and Horton, D. R. (2011).** Entomopathogenic fungi (Hypocreales) for control of potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) in an area endemic for zebra chip disease of potato. *Biological Control* 56: 271-278.
- 33. Lawrence, P. K., and Koundal, K. R. (2002).** Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* 5 (1): 93-109.
- 34. Liefing, L.W; Perez-Egusquiza, Z.C; Clover, G.R.G; Anderson, D.A.D. (2008).** New "Candidatus Liberibacter" species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease*. 92:1474.
- 35. Liefing, L. W., Weir, B. S., Pennycook, S. R., and Clover, G. R. G. (2009).** "Candidatus Liberibacter solanacearum", a liberibacter associated with plants in the family Solanaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:2274-2276
- 36. Maramorosch, K. (1998).** Current status of potato purple top wilt. *Inter. J. Trop. Plant Dis.* 16:61–72.
- 37. Maramorosch, K. (1988).** Potato purple top wilt. Entomology Department, Cook College, Rutgers-The State University. NJ, USA. 456p.
- 38. María de J. Santiago Cruz; José García Salazar Revista (2001).** Latinoamericana de la Papa. Vol-especial: 21-43 21 Economía de la Agroindustrialización de la Papa en México.

- 39. María P Millán; Damasia Becú; (2009).** La proteína verde fluorescente ilumina la biociencia. Instituto de Biología y Medicina Experimental. IBYME CONICET, Buenos Aires.
- 40. Mora-Herrera M E, H López-Delgado, A Castillo-Morales, C H Foyer (2005).** Salicylic acid and H₂O₂ function by independent pathways in the induction of freezing tolerance in potato. *Physiol. Plant.* 125:430-440
- 41. Munyaneza, J.E; Crosslin, J.M; Upton, J.E. (2007).** Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with "zebra chip," a new potato disease in southwestern United States and Mexico. *Journal of Economic Entomology.* 100:656-663.
- 42. Munyaneza, J. E., Sengoda, V. G., Crosslin, J. M., Garzón-Tiznado, J. A., and CardenasValenzuela, O. G. (2009).** First report of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*“ in tomato plants in Mexico. *Plant Disease* 93(10): 1076.
- 43. Munyaneza, J. (2010).** Zebra Chip/Psyllid Research Update. Presentación oral. Taller Regional de Zebra chip. Honduras.
- 44. Murashige, T. y Skoog, F. (1962).** A revised médium for growth and bioassays with tobacco tissue ciltures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- 45. NOAA. (2003).** All about droughts. National Oceanic and Atmospheric Administration. USA. Recuperado de <http://www.nws.noaa.gov>. 29, 25-27.
- 46. Parga, T.V.M. (2008).** Mejoramiento genético por resistencia a punta morada de la papa (*Solanum tuberosum* L.). In: Flores Olivas, A. y Lira Saldivar, R.H. Detección, Diagnóstico y Manejo de la Enfermedad Punta Morada de la Papa. Ed. Parnaso. Málaga, España. 49- 56.

- 47. Rease, J. y E. Burst. (1983).** Increased yield and suppression of shoot growth and nute populations of anjou pear trees with nitrogen and paclobutrazol. Hort Science 18, 212-214
- 48. Rodríguez fragoso, L., Jurado León (2000).** La proteólisis en la invasión y metástasis de la célula tumoral. Revista del instituto nacional de cancerología mex. Vol. 46: 33-46.
- 49. SAGARPA. (2009).** Boletín informativo. Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx>
- 50. Salazar, L.F. (1995).** Los virus de la papa y su control. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 226
- 51. Salisbury, F.B.; Ross, C.W. (1994).** Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamericana. 293-317, 395-451.
- 52. Salvador Resino; (2010).** Epidemiología molecular de enfermedades infecciosas.
- 53. Salud Pública México (2006).** Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas 48:1, 62-71
- 54. Secor, G.A; Rivera, V.V; Lee, I.M; Clover, G.R.G; Liefting, L.W; Li, X; De Boer, S.H. (2009).** Association of "CandidatusLiberibacter solanacearum" with zebra chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy, and PCR. Plant Disease. 93(6):574-583.

- 55. SEMARNAT, (2012).** Informe de la Situación del Medio Ambiente en México Compendio de Estadísticas Ambientales Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental.
- 56. Sheppard, C.J.R. (1993).** Confocal Microscopy - Principles, Practice and Options. Fluorescent and Luminiscent Probes for Biological Activity. Edited by W.T. Watson. Academic Press.
- 57. Snyder, W. C., Thomas, H. E, and Fairchild, S. J. (1946).** A type of internal necrosis of the potato tuber caused by psyllids. *Phytopathology* 36: 480- 481
- 58. Tanaka, F. A. O., Colleta-Filho, H. D., Alves, K. C. S., Spinelli, M. O., Machado, M. A., and Kitajima, E. W. (2007).** Detection of the „Candidatus Liberibacter americanus” in phloem vessels of experimentally infected *Catharanthus roseus* by scanning electron microscopy. *Fitopatol. Bras.* 36, 519–520.
- 59. Towbin. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(9):4350-4.
- 60. Trujillo, C., Rodríguez, E., Jaramillo, S., Hoyos, R., Orduz, S. and Arango, R. (2001).** One-step transformation of two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. subsp andigena). *Plant cell Rep* 20: 637-641.
- 61. Valadez, M. E. (2000).** Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio), Mundi-Prensa, México, D.F, 147.
- 62. Weaver, J.R (1990).** Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Trillas. Séptima impresión. 9-40.

- 63. Wenbin L, A., Abad B, A. R., French-Monar, R. D., Rascoe, D., Aimin-Wen, A., Gudmestad, N. C., Secor, G. A., Ming-Lee, F., Duan, Y., Levy, L. (2009).** Multiplex real-time PCR for detection, identification and quantification of „*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in potato plants with zebra chip. *Journal of Microbiological Methods* 59–65.