

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

ESCUELA DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS



Desarrollo y pruebas funcionales de un vector binario para la intragénesis de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lamarck, 1793)

Presentado por: Biol. José Carlos Tovar Rodríguez
20080146

Patrocinador: PhD. Raúl Blas Sevillano
Facultad de Agronomía
Universidad Nacional Agraria La Molina

Co-Patrocinador: PhD. Marc Ghislain
Laboratorio de Biotecnología Aplicada
Centro Internacional de la Papa (CIP)

Lima, 2011

DEDICATORIA

Al profesor Jorge Nakaodo, que en paz descansa.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a Marc Ghislain y Jan Kreuze por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis, así como por haberme asesorado durante su realización.

A mi asesor en la Universidad Agraria, Raúl Blas, quien tuvo la amabilidad de siempre apoyarme y aconsejarme durante la realización y sustentación de esta tesis.

A Kathy Prentice y a Cristina Rivera, por haberme apoyado muchas veces con experimentos de esta tesis.

A los miembros del jurado calificador Jorge Jiménez, César López y William Roca, por sus acertadas observaciones y apoyo durante el proceso de sustentación.

A CONCYTEC, por el apoyo económico que me brindó para los estudios de maestría y la realización de la tesis.

A mi novia, Elizabeth Castillo, por ayudarme con los trámites para la sustentación de esta tesis y por siempre apoyarme en todo.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo.....	2
1.2 Objetivos específicos.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Generalidades del camote.....	3
2.2 La ingeniería genética en el mejoramiento del camote.....	4
2.3 Nuevas estrategias de modificación genética mediante biotecnología.....	4
2.3.1 La cisgénesis.....	5
2.3.2 La intragénesis.....	5
2.4 Desarrollo de vectores binarios para intragénesis.....	6
2.4.1 Los bordes de transformación.....	7
2.4.2 El marcador de selección.....	8
2.4.3 El sitio de clonamiento múltiple.....	8
III. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. Materiales.....	9
3.1.1. Material biológico.....	9
3.1.2. Material de vidrio.....	10
3.1.3. Material de plástico.....	10
3.1.4. Reactivos.....	10
3.1.5. Equipos.....	10
3.1.6. Otros.....	10
3.2. Métodos.....	11
3.2.1 Diseño del vector.....	11
3.2.2 Construcción del vector.....	11
3.2.3 Secuenciamiento.....	12
3.2.4 Expresión transitoria de GFP.....	13
3.2.5 Evaluación de la expresión transitoria de GFP.....	13
3.2.6 Funcionalidad del sistema Cre- <i>lox</i>	13
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	15
4.1 Diseño del vector.....	15
4.2 Construcción del vector.....	16
4.3 Secuenciamiento del vector.....	20
4.4 Funcionalidad del sistema Cre- <i>lox</i>	21
4.5 Funcionalidad de los bordes del P-ADN.....	23
V. CONCLUSIONES	26
VI. RECOMENDACIONES	27
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

RESUMEN

La intragénesis es un método de mejoramiento genético de plantas. Utiliza la tecnología del ADN recombinante para introducir modificaciones genéticas llamadas “ADNs derivados de planta” (P-ADNs). La peculiaridad de la intragénesis radica en que utiliza exclusivamente secuencias del genoma de la planta a mejorar. La intragénesis es una alternativa a la transgénesis, propuesta con el fin de disminuir el costo regulatorio de los cultivos biotecnológicos y mejorar su aceptación. El desafío para usar intragénesis es que se necesita un vector binario específicamente desarrollado para la especie que se desea mejorar. En este trabajo construí un vector binario para hacer intragénesis en camote. Para conseguir esto, ensamblé secuencias de camote imitando las secuencias borde de *Agrobacterium tumefaciens*, que delimitarán el P-ADN. También construí sitios de recombinación (*lox*) modificados que permitirán usar el sistema *Cre-lox* para escindir las secuencias que no sean de camote, que incluyen al marcador de selección; y un sitio de clonamiento múltiple, que permitirá insertar genes de interés. Encontré que los sitios *lox* modificados fueron funcionales, pero los bordes del P-ADN no. La falta de funcionalidad de los bordes diseñados puede deberse a secuencias aledañas faltantes, las cuales aún no han sido caracterizadas. Sugiero obtener una mayor diversidad de secuencias genómicas de camote para ensamblar bordes más similares a los de *A. tumefaciens*. En este trabajo reporto la primera demostración del uso del sistema de escisión *Cre-lox* en intragénesis.

ABSTRACT

Intragenesis is a crop improvement method that utilizes recombinant DNA technology to produce genetic modifications known as Plant-derived-DNAs (P-DNAs). Its singularity is that it uses sequences exclusively from the plant's own genome. Intragenesis is proposed as an alternative to transgenesis to reduce deregulation costs and increase public acceptance of biotechnology crops. The limitation of intragenesis is the need for a binary vector specially designed for the species to be improved. In this work, I constructed a binary vector for intragenesis of sweetpotato. To this end, I assembled sweetpotato sequences mimicking the border sequences of *Agrobacterium tumefaciens*, which will delimit the P-DNA. I also designed modified recombination (*lox*) sites, which allow use of the Cre-*lox* system for excision of non-sweetpotato sequences, including the selectable marker, as well as a multiple cloning site that allows the insertion of genes of interest. The modified *lox* sites resulted functional but not so the P-DNA border sequences. The lack of functionality of the border sequences could be due to the occurrence of surrounding uncharacterized sequences not present in my vector, which are needed for P-DNA transference into the plant. I propose to obtain additional sweetpotato sequences for the design of borders that resemble more closely commercial binary vectors. In this work I report the first functional use of the Cre-*lox* system in intragenesis.

I. INTRODUCCIÓN

La incorporación y expresión de genes foráneos a organismos vivos, de modo que estos puedan adquirir una o más características nuevas es uno de los avances más importantes de la biotecnología moderna (Vasil, 2008). A estos organismos genéticamente modificados (OGM) se les conoce también como organismos vivos modificados (OVM) u organismos transgénicos. La definición vigente de OVM en el Perú está dada por el Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad: “Por "organismo vivo modificado" se entiende cualquier organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético que se haya obtenido mediante la aplicación de la biotecnología moderna.” (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2000).

Para obtener un OVM, en el caso de especies vegetales, la biotecnología más usada en la actualidad es la transformación mediada por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y la regeneración subsiguiente de plantas transgénicas (Vega *et al.*, 2008).

Agrobacterium transfiere a la planta una porción de su genoma plasmídico conocida como ADN-T. En esta porción se ubican secuencias de diferente origen, incluyendo las secuencias que corresponden al gen de interés, los bordes derecho e izquierdo, entre otras (Gelvin, 2003).

El uso de genes o secuencias de ADN que no pertenecen al organismo hospedero es una de las razones por las que se desarrolló un sistema de evaluación de riesgo para los OVMs y no para los organismos que podrían contener la misma modificación genética pero obtenida por métodos convencionales. Este sistema de evaluación de riesgo resulta altamente costoso para quien desarrolla el cultivo OVM, al punto de ser un impedimento para la utilización de esta tecnología (con fines comerciales) por instituciones de escasos recursos, como los organismos estatales de países en desarrollo (Bayer *et al.*, 2010). En muchos países existen regulaciones que imponen

la trazabilidad de los productos derivados de OVMs, durante toda la cadena productiva, llevando a incrementos significativos en el costo del producto, que debe asumir el consumidor final (Menrad *et al.*, 2009). También existe una percepción pública negativa hacia los productos transgénicos basada en el simple hecho de contener ADN foráneo (Conner *et al.*, 2007).

Con el fin de desarrollar cultivos modificados por biotecnología que tengan una evaluación de riesgo más simple, se está buscando estrategias de modificación genética alternativas que imiten al mejoramiento convencional y además ayuden a aumentar la confianza del público en los OVMs. Una de ellas es la intragénesis.

La intragénesis consiste en transferir al organismo hospedero únicamente secuencias que pertenezcan a su misma especie, llamadas P-ADNs (Rommens *et al.*, 2007); pero para hacer esto, se necesita desarrollar vectores del P-ADN específicos para el cultivo a mejorar.

En el presente trabajo se diseñó y construyó un vector binario para realizar la intragénesis del camote.

1.1 Objetivo

Diseñar, desarrollar y probar la funcionalidad de un vector binario que permita realizar intragénesis en camote (*Ipomoea batatas* L.).

1.2 Objetivos Específicos

- a. Diseñar la secuencia de ADN de transferencia (T-ADN) basada exclusivamente en secuencias del genoma de *Ipomoea batatas* L., de modo que sea un P-ADN;
- b. Construir un vector binario que lleve el P-ADN diseñado en el objetivo específico a;
- c. Probar la funcionalidad de los elementos funcionales del P-ADN.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del camote

El camote (*Ipomoea batatas* L.) es uno de los seis cultivos alimenticios más importantes, versátiles y menos aprovechados del mundo. Con una producción anual de más de 106 millones de toneladas en el 2008, actualmente se ubica en el sexto lugar en importancia entre los cultivos alimenticios, a nivel mundial, después del maíz, arroz, trigo, papa, y yuca. Se cultiva en 112 países, entre los que destacan principalmente varios países del Asia y del África. China es el principal productor mundial con más de 80 millones de toneladas producidas en 2008. Le siguen Nigeria, Uganda, Indonesia, Vietnam, Tanzania, India y Japón, todos con más de 1 millón de toneladas producidas en 2008. Entre los países de América Latina, destacan Brasil, Cuba y Argentina con más de 300 000 toneladas producidas en 2008. A estos países los sigue el Perú con 189 869 toneladas producidas en el mismo año (FAOSTAT, 2010).

La importancia del camote radica en ser una fuente primordial de calorías y vitaminas. Posee un ciclo corto, alta producción de proteínas en las hojas nuevas y de carbohidratos en las raíces; además posee un rico y variable germoplasma. La región de Centro América es considerada como el centro de origen, siendo además la zona donde se encuentra la mayor diversidad genética de camote; mientras que la región Perú-Ecuador, así como el Pacífico Sur y el archipiélago indonesio-malayo, son considerados como centros secundarios y terciarios de diversidad (Zhang *et al.*, 2000).

Este cultivo es afectado por muchas plagas y enfermedades, entre las que destacan los virus (principalmente la enfermedad viral del camote [SPVD]) los insectos (principalmente los gorgojos *Cylas* spp.), nemátodos (principalmente *Meloidogyne* spp.), así como bacterias y hongos (como el hongo *Ceratocystis fimbriata*) (Stathers *et al.*, 2005).

2.2 La ingeniería genética en el mejoramiento del camote

La ingeniería genética podría jugar un papel importante en aminorar los daños económicos causados por todos los problemas mencionados. Sin embargo, la utilización de la transformación genética, para mejorar un cultivo, trae consigo engorrosos procedimientos de análisis de riesgo y trazabilidad, además de problemas de percepción que se traducen en su falta de aceptación por parte de muchos consumidores y políticos (Conner *et al.*, 2007).

En Alemania, se ha estimado que el incremento en el precio final de algunos productos alimenticios, debido a la necesidad de mantener la trazabilidad de los OVMs, varía entre 2 y 13%, promediando en 6.8%. Estos costos se transfieren enteramente al consumidor final (Menrad *et al.*, 2009). En países en desarrollo como el Perú, estas alzas en los costos de los alimentos pueden tener un gran impacto en la pobreza.

Otra peculiaridad de las regulaciones de productos derivados o que contienen OVMs es que su comercio transfronterizo sigue normas que varían mucho de país a país. Si bien el Protocolo de Cartagena (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2000) establece ciertos criterios para este fin, los gobiernos locales establecen el grueso de las regulaciones. Esto puede llevar a cerrar mercados para agricultores en países en desarrollo, debido a que otros países no aceptarán sus productos si son OVM. Estas regulaciones mercantiles afectan negativamente el comercio de OVMs e imposibilitan la utilización de ingeniería genética para resolver algunos problemas de la agricultura de países en desarrollo, debido a la falta de un mercado para vender o distribuir el producto (Stewart, 2009).

La utilización de la ingeniería genética está limitada en los países en desarrollo, por los análisis de riesgo que se implementan en estos países. La limitación está en que la culminación de estos análisis resulta extremadamente costosa y es requisito para la comercialización del cultivo OVM. Kalaitzandonakes *et al.* (2007) estiman entre 6.18 y 15.44 millones de dólares en gastos para este fin, por cada cultivo OVM que se produce.

Las entidades, mayormente del sector público, que desarrollan estos cultivos de interés para la seguridad alimenticia (como el camote), en su gran mayoría no pueden asumir ese gasto. Así, los costos de cumplir con las regulaciones de los OVM se convierten en un impedimento para la utilización de la ingeniería genética en los cultivos que no son de interés para la empresa privada, pero que son esenciales para los campesinos y consumidores más pobres (Bayer *et al.*, 2010; Kalaitzandonakes *et al.*, 2007).

Para enfrentar estos problemas, se está diseñando nuevas estrategias de modificación genética, que ayuden a hacer más sencillos y menos costosos los análisis de riesgo, además de aminorar la desconfianza de ciertos sectores del público.

2.3 Nuevas estrategias de modificación genética mediante biotecnología

Algunas estrategias nuevas que están tomando importancia en el mejoramiento de cultivos son la cisgénesis y la intragénesis.

2.3.1 La cisgénesis

La cisgénesis es la modificación genética de un cultivo mediante la incorporación de genes (conteniendo sus respectivos intrones y secuencias flanqueantes como promotor y terminador, en orientación sentido) aislados de un donante que puede ser usado para mejoramiento por cruza (Schouten *et al.*, 2006). Esta estrategia fue planteada por científicos de la universidad de Wageningen, en Holanda, como una alternativa a la transgénesis, que utiliza genes de otros organismos, e inclusive genes sintéticos (es la razón del prefijo *trans*). La desarrollaron para tener mayor aceptación de los consumidores europeos y para disminuir la carga regulatoria. El raciocinio es que el resultado final imita muy fielmente el mejoramiento convencional por introgresión, pero lo hace más preciso (Jacobsen y Schouten, 2008). Este grupo de científicos ha avanzado considerablemente en la aplicación de la cisgénesis, en el desarrollo de una papa con resistencia a la rancha (*Phytophthora infestans*) (Haverkort *et al.*, 2008).

En la cisgénesis, sólo se considera los elementos genéticos funcionales en la planta, es decir los genes introducidos que los mejoradores convencionales usarían. Por eso, los marcadores de selección que se usan en el proceso de producción de las plantas transgénicas están excluidos de una estrategia por cisgénesis, en la que simplemente no se usa marcador de selección (de Vetten *et al.*, 2003).

2.3.2 La intragénesis

La intragénesis es un concepto similar al de la cisgénesis. Nielsen definió la intragénesis como la modificación genética utilizando secuencias genéticas pertenecientes al mismo genoma de la planta receptora (Nielsen, 2003). Posteriormente, Rommens amplió las posibilidades de la intragénesis, definiéndola como la modificación genética, insertando en el organismo únicamente secuencias que pertenezcan a su grupo de especies sexualmente compatibles (Rommens *et al.*, 2007). Así, la intragénesis evoluciona el raciocinio empleado para la cisgénesis, pues permite hacer ingeniería genética del cultivo, siempre y cuando se utilicen exclusivamente secuencias de ADN provenientes del grupo de compatibilidad sexual. Este simple cambio abre un abanico de posibilidades que no son propias de la cisgénesis, pero sí de la ingeniería genética. Por ejemplo, se puede combinar un promotor de un gen, con la secuencia codificante y el terminador de otro, modificando su expresión; entre otras aplicaciones.

Al igual que los cultivos cisgénicos, los científicos que los generaron han propuesto que los cultivos intragénicos tengan una regulación mucho menos rígida que sus equivalentes transgénicos (Rommens *et al.*, 2007; Conner y Jacobs, 2006), lo cual disminuiría significativamente el costo de mejoramiento de cultivos por esta biotecnología. Además, los consumidores muestran una predisposición a aceptar este tipo de productos mucho más fácilmente que los transgénicos (Conner *et al.*, 2007). Esto hace que la intragénesis resulte interesante como alternativa a la transgénesis, por su menor costo y su mayor aceptación.

La principal limitación para la utilización de la intragénesis es que requiere del desarrollo de vectores de transformación particulares para cada especie que se desee modificar. Hasta la fecha no existe ningún vector binario para la intragénesis de camote (Conner y Jacobs, 2006; Rommens *et al.*, 2011).

2.4 Desarrollo de vectores binarios para intragénesis

Un vector binario es un plásmido que lleva el ADN que será transferido a la planta (ADN de transferencia o T-ADN) durante la transformación genética, realizada por *Agrobacterium tumefaciens*. Un vector binario se compone de dos regiones: el T-ADN, y el resto del plásmido, llamado esqueleto (Figura 1).

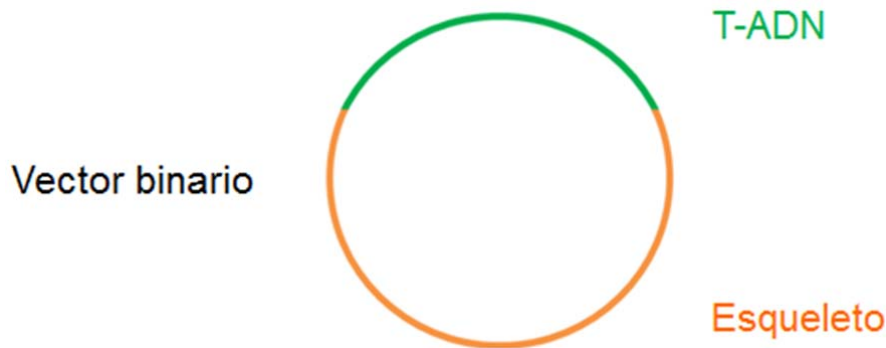


Figura 1. Esquema de un vector binario mostrando sus dos partes: el T-ADN (en verde) y el esqueleto (en naranja).

El T-ADN está delimitado por unas secuencias conocidas como bordes (Ream, 2008). Dentro del T-ADN, se encuentran los elementos que se desea transferir a la planta, los cuales suelen ser un gen de interés y un gen marcador de selección (que permite seleccionar a las células de la planta que han recibido el T-ADN). Sin embargo, en un vector binario comercial, no se encuentra gen de interés alguno. En su lugar, hay varios sitios de restricción en una región llamada sitio de clonamiento múltiple (SCM). El SCM permite que el investigador inserte su gen de interés. Así, en el T-ADN de un vector binario comercial, como el que se construyó en este trabajo de tesis, se encuentran los bordes que lo delimitan, un gen marcador de selección y un SCM, como sus elementos funcionales (Figura 2).

En el esqueleto (que no se transfiere a la planta) se encuentran los elementos funcionales que requieren las bacterias *Escherichia coli* (donde se construye el vector binario) y *Agrobacterium tumefaciens* (que lleva el vector binario ya construido y transfiere el T-ADN a la planta) para su replicación y selección. Estos elementos funcionales incluyen orígenes de replicación y marcadores de selección para reconocer a las células bacterianas que llevan el plásmido luego de ser transformadas (Figura 2).

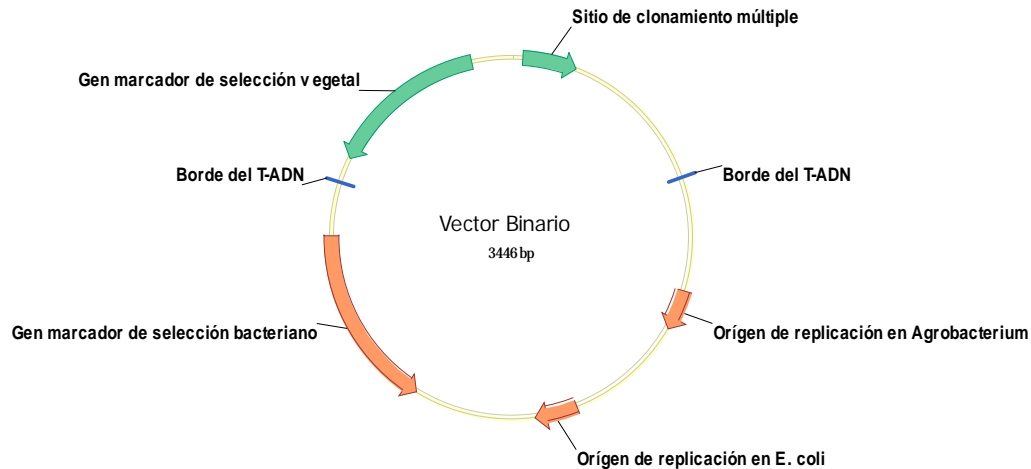


Figura 2. Esquema de un vector binario mostrando sus principales elementos funcionales.

La intragénesis requiere del desarrollo de vectores binarios específicos, para su realización. Actualmente existen vectores binarios para la intragénesis de papa (Rommens *et al.*, 2006), tomate, canola (Rommens, 2007), manzana (Viswanath y Strauss, 2010), arroz (Thilmony *et al.*, 2010), alfalfa (Weeks *et al.*, 2008) y su pariente cercano, la leguminosa *Medicago truncatula* (Confalonieri *et al.*, 2010), así como la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Conner *et al.*, 2007).

El desarrollo de estos vectores requiere de la utilización de secuencias específicas, para ensamblar determinados elementos. Estos elementos son, cuando menos, aquellos que se transferirán a la planta; es decir, el T-ADN. Al ser el T-ADN ensamblado con secuencias pertenecientes a la planta receptora, este es llamado P-ADN, para diferenciarlo de los T-ADNs ensamblados con secuencias provenientes de diversos orígenes.

Un P-ADN contiene los siguientes elementos, para ser de utilidad en intragénesis:

1. Bordes de transformación;
2. Un marcador de selección;
3. Un sitio de clonamiento múltiple.

El resto de elementos propios de un vector binario (aquellos que están fuera del P-ADN, en el esqueleto) pueden ser modificados para que también sean ensamblados con secuencias propias de la planta, en caso de que se den transferencias, de *Agrobacterium* a la planta, que incluyan estas secuencias (Ramanathan y Veluthambi, 1995). Existen algunas iniciativas para conseguir este tipo de vectores que están enteramente ensamblados con secuencias del cultivo receptor, sin embargo existen limitaciones para su desarrollo, ya que requieren del ensamblaje de varios otros elementos funcionales (Conner *et al.*, 2007). Debido a estas limitaciones, y al escaso beneficio de ensamblar dichos vectores, en el presente trabajo, me centré en el P-ADN, y el esqueleto del vector lo tomé de otro ya existente.

2.4.1 Los bordes de transformación

Los bordes de transformación se componen de una secuencia de unas 25 pares de bases (pb), compuesta de tres segmentos: una secuencia conservada de 13 pb,

seguida de otra no conservada, de 5 pb, y una última de 7 pb, medianamente conservada (Conner *et al.*, 2007).

2.4.2 El marcador de selección

El marcador de selección es un gen que permite seleccionar las células, y después las plantas, que han recibido el P-ADN desde etapas muy tempranas en su desarrollo. En la transgénesis, generalmente se usa genes de resistencia a antibióticos o herbicidas, provenientes de bacterias, por ser los más eficientes. Para la intragénesis es necesario utilizar alternativas. Estas pueden ser genes de resistencia a herbicidas obtenidos por mutación del genoma de la misma planta (Thilmony *et al.*, 2010) o genes de pigmentación (Kim *et al.*, 2010).

Debido a la dificultad de encontrar genes marcadores de selección apropiados para la intragénesis, se ha propuesto otras alternativas. Una de estas alternativas es la utilización de dos vectores separados (co-transformación), en donde uno lleva el maracador y otro el P-ADN. Mediante la selección transitoria (solo durante unos 5 días), se permite que el gen marcador no se llegue a insertar en el genoma de la planta y finalmente se llega a obtener plantas con solo el P-ADN, aunque la eficiencia es baja. Aproximadamente 20% de las plantas transformadas llevan solo el P-ADN (Richael *et al.*, 2008).

Otra alternativa es la utilización de un marcador de selección convencional, pero flanqueado por secuencias de recombinación que permiten su escisión del genoma de la planta. Los sistemas de uso más común para este fin son el Cre-*lox* (Dale y Ow, 1991; Cuéllar *et al.*, 2006) y el *FLP/FRT* (Lloyd y Davis, 1995). Esta alternativa requiere de la modificación de estas secuencias de recombinación de modo que, luego de que se escinda el marcador de selección, las secuencias que permanezcan en la planta sean propias de ella. Para este trabajo, utilicé esta alternativa, con el sistema Cre-*lox*.

2.4.3 El sitio de clonamiento múltiple

El sitio de clonamiento múltiple (SCM) es una región del vector binario donde se encuentran varios sitios de restricción únicos. Este permite la inserción de un gen de interés en el vector. Generalmente se encuentran, dentro del SCM, sitios de restricción para enzimas que reconocen secuencias de 6 o más pares de bases (Conner *et al.*, 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

- Plantas de tabaco *Nicotiana benthamiana*, mantenidas en los invernaderos del CIP.
- Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa EHA105), mantenidas en la colección de bacterias del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del CIP.
- Cultivo de *Escherichia coli* (cepa DH5 α), mantenidas en la colección de bacterias del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del CIP.
- Cultivo de *Escherichia coli* (cepa DH5 α), conteniendo el plásmido pCAMBIA2300, mantenidas en la colección de bacterias del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del CIP.
- Cultivo de *Escherichia coli* (cepa DH5 α), conteniendo el plásmido pCIP54, mantenidas en la colección de bacterias del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del CIP.
- Cultivo de *Escherichia coli* (cepa DH5 α), conteniendo el plásmido pAGFP, mantenidas en la colección de bacterias del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del CIP.

3.1.2 Material de Vidrio:

- Beakers de 100, 500, y 1000 ml.
- Probetas de 25, 50, 100, 250, 500, y 1000 ml.
- Matraces de 250 ml.
- Botellas autoclavables de 100, 250, 500, y 1000 ml.
- Termómetros ambientales de mercurio.
- Placas Petri de 100 x 15 mm y de 150 x 20 mm.
- Bandejas.

3.1.3 Material de Plástico:

- Tubos de microcentrífuga de 0.5, 1.5, 2.0 ml (Eppendorf).
- Tips de 10, 200, y 1000 µl para micropipetas.
- Tiras para PCR.
- Placas Petri estériles de 100 x 15 mm.
- Pipetas de 10 ml.
- Beakers de 1, 2, y 4 l.
- Probetas de 1, y 2 l.
- Tubos plásticos Falcon de 15 y 50 ml estériles.
- Bidones de 10 y 20 l.
- Cubetas descartables para espectrofotómetro.
- Bolsas.
- Bolsas autoclavables.
- Bandejas.

3.1.4 Reactivos:

Medio de cultivo para bacterias LB, agentes gelificantes agar, sales, vitaminas, antibióticos, ácidos, bases, alcoholes, revelador y fijador fotográfico, cebadores (ADN), enzimas de restricción, nitrógeno líquido, equipo de extracción de ADN de bacterias, equipo de PCR.

3.1.5 Equipos:

Centrífuga, microcentrífuga, horno de hibridación, transiluminador UV, refrigeradora y congeladora, balanzas, cámara de flujo laminar, autoclave, microondas, horno, destilador de agua, termociclador, incubadoras, electroporador, espectrofotómetro, micropipetas, máquina productora de hielo, contenedor de nitrógeno líquido, agitador mecánico, cámaras para electroforesis horizontal y fuentes de poder, equipo digitalizador de imágenes, cámara fotográfica digital.

3.1.6 Otros:

Guantes de jebe descartables, mangos y hojas de bisturí, gradillas, Parafilm[®], etiquetas de codificación, plumones indelebles, lápiz, lapicero, cinta adhesiva, tijeras, regla, calculadora, cronómetro, pinzas, cubetas de cuarzo para espectrofotómetro, cubetas de electroporación, algodón, papel aluminio, Saran Wrap, papel luminiscente, película fotográfica, cajas de tecnopor.

3.2 Métodos

3.2.1 Diseño del vector:

Se utilizó secuencias de camote, publicadas en GenBank, la base de datos del Centro Nacional para la Información de Biotecnología de Estados Unidos (NCBI) (Benson *et al.*, 2008), para formar las estructuras de un vector binario (bordes derecho e izquierdo, sitio de clonamiento múltiple y sitios *lox*) (Conner y Jacobs, 2006), mediante el uso del programa Paracel Blast (Rieffel *et al.*, 2009). Se formó estas estructuras pegando 2 secuencias de camote, ya que no se encuentran en una sola secuencia.

Se diagramó el vector binario, usando las secuencias de camote seleccionadas, en el programa Vector NTI (Lu y Moriyama, 2004). Usando dicho programa, diagramamos el segmento correspondiente al P-ADN de vector intragénico, considerando que las secuencias de camote deben llegar más allá de los bordes del P-ADN, debido a posibles inserciones en el genoma de la planta, de estas secuencias (Ramanathan y Veluthambi, 1995; Gelvin, 2003; Conner y Jacobs, 2006). Además, se usó el sistema *Cre-lox* para escindir el marcador de selección en planta (Dale y Ow, 1991; Conner y Jacobs, 2006). Para clonar el sistema *Cre-lox*, se usó la enzima *Cla* I, del vector pCIP54 (Cuellar *et al.*, 2006), por lo que colocamos el sitio de restricción respectivo en el diagrama. El fragmento extraído con *Cla* I de pCIP54 no contendría los sitios *loxP* ni una región del gen *cre*, entonces fueron añadidos a la secuencia diagramada. Además, los sitios *loxP* no se encuentran en camote, por lo que se usó sitios mutantes (Missirlis *et al.*, 2006) que sí se pueden encontrar en camote. Por último, para clonar esta secuencia diagramada en el esqueleto de un vector binario, se incluyó dos sitios de restricción a los extremos de la secuencia: *Bcl* I y *Sca* I. La secuencia final diagramada fue sintetizada por la compañía Entelechon Ltd. (Regensburg, Alemania).

Para la región que se encuentra fuera del P-ADN, usamos la región correspondiente del vector comercial pCAMBIA2300 (Jefferson y Smith, 2009). Esta la clonamos usando las enzimas de restricción *Bcl* I y *Sca* I. Con esto, completamos el mapa del vector binario.

3.2.2 Construcción del vector:

Se utilizó el sistema de enzimas de restricción y ligación, según las recomendaciones del proveedor respectivo para las reacciones: New England Biolabs (Massachusetts, Estados Unidos) para las enzimas de restricción y Promega (Wisconsin, Estados Unidos) para la T4 Ligasa.

Luego de cada ligación, insertamos el plásmido obtenido en *E. coli* mediante el método de choque térmico (Holsters *et al.*, 1978). Crecimos *E. coli* en medio LB con agar (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) con 100 ppm de kanamicina, en placas Petri, durante 18 horas a 37 °C. Cultivamos las colonias obtenidas en medio LB líquido (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) durante 18 horas a 37 °C en agitación. Analizamos las colonias, extrayéndoles el plásmido con el equipo Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Estados Unidos), y digiriéndolo con

enzimas de restricción que generaran un patrón de bandas distintivo. Posteriormente, corrimos las digestiones en geles de agarosa al 1% en tampón TBE (87.5 mM TRIS-base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA), mediante electroforesis horizontal a 70 V durante 1 hora.

Luego de que obtuvimos el vector binario, clonamos en él (con *Hind* III y *Sbf* I) el gen reportero *gfp* (proteína de fluorescencia verde) obtenido del plásmido pAGFP, para realizar las pruebas de eficiencia de transformación en *N. benthamiana*. Para esto, usamos el procedimiento descrito en el párrafo anterior, excepto que el antibiótico usado para el cultivo de *E. coli* que contenía al plásmido pAGFP fue 100 ppm de espectinomicina (Sigma, Estados Unidos). Esta modificación de antibiótico solo fue utilizada para esta cepa.

Una vez que obtuvimos el vector intragénico con GFP (pCIP103), lo insertamos en *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación (Neuman *et al.*, 1982). Las condiciones de cultivo de *A. tumefaciens* fueron las mismas que para *E. coli*, excepto que la temperatura usada fue de 28 °C y el tiempo fue de 36 a 48 horas.

3.2.3 Secuenciamiento

Se utilizó el secuenciamiento de ADN para comprobar la integridad de las secuencias luego de las clonaciones. Se secuenció dos clones del vector intragénico, cuando se hubo confirmado su integridad mediante digestiones con enzimas de restricción. El secuenciamiento fue realizado en Macrogen (Seúl, Corea del Sur). Se alineó las secuencias obtenidas con el programa Codon Code Aligner, usando la secuencia que se diagramó en Vector NTI como templatado para el alineamiento. Cada segmento de la secuencia fue cubierto entre 2 y 4 veces por el secuenciamiento.

Los cebadores utilizados para el secuenciamiento del P-ADN fueron

Nombre	Secuencia	
	Sentido	Antisentido
S1	GGACAGGTCGGTCTTGACAA	TGAGCGGAGAATTAAGGGAGT
S2	AACAAGACGAACTCCAATTCCTG	TACCGACAGGCAAATCATACTCC
S3	AGAGAGCGAACAAGGAGATCAAT	TGGAGGGAGTTCAGCAACG
S4	AATGCTGGTGTGTTTCGCTTCC	GGTTCTGGTGGCGGCTCTGA
S5	CACTAATGCTCTCTCACTCTGTCACAC	TGTCCATCAGGTTCTTGCGAAC
S6	TACTGACGGTGGGAGAATGTTAATC	AGACTGGTGATTTGCGGACTCTAG
S7	TGCTGGAAGATGGCGATTAGC	TGCGTACTGGATTTGTGTTTGTAATG
S8	CTTGACGATTTTCAGCACCCTCTC	TGCTTCATCTCCAATTACACACACA
S9	TTCGGCATTGGATTGGAATTG	GTCAAGTCCTGGTCGTCGGTG

Los cebadores usados para el secuenciamiento de los vectores que llevaban GFP (pCIP103 y pAGFP) fueron:

Nombre	Secuencia
GFP1	CGCCTCAACATGGTGGAGCA
GFP2	CGCAAGACCCTTCCTCTAT
GFP3	AGAGGGTGAAGGTGATGCAA
GFP4	GCTAACTTCAAAAATTCGCCA
GFP5	GCTTGGACTATAATACCTGAC

3.2.4 Expresión transitoria de la Proteína Fluorescente Verde (GFP)

Se infiltró hojas de *N. bentamiana* utilizando un caldo de *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo al vector intragénico con GFP (pCIP103), para analizar la expresión de GFP en esta planta. Esta sería la evidencia de la transferencia del P-ADN a la planta, lo cual demostraría la funcionalidad de los bordes del P-ADN.

Se utilizó un caldo de *A. tumefaciens* con el plásmido pAHCpro (Kreuze *et al.*, 2005), para evitar el silenciamiento del gen *gfp* por exceso de expresión (Napoli *et al.*, 1990). Se mezcló los caldos de *A. tumefaciens* con pAHCpro y pCIP103 en cantidades iguales antes de infiltrar. Los controles utilizados fueron pAGFP (el plásmido de donde originalmente clonó el gen *gfp*) mezclado con pAHCpro y pAHCpro solo. Se infiltró el envés de las hojas con una jeringa sin aguja, insertando ligeramente la punta de la jeringa en la hoja, de modo que el caldo de *A. tumefaciens* entrara directamente en la hoja. Luego se esperó 24 horas para analizar la expresión de GFP.

3.2.5 Evaluación de la expresión transitoria de GFP

Se analizó la expresión transitoria de GFP en *N. bentamiana* al iluminar las hojas con luz ultravioleta a las 24 horas de la agroinfiltración. Por simple observación se pudo ver si las hojas fluorescían, si lo hacían era debido a la GFP. Esta fluorescencia sería la indicación de la transferencia del P-ADN a la planta.

3.2.6 Funcionalidad del sistema Cre-lox

Se probó la funcionalidad de este sistema, cultivando la cepa de *E. coli* que llevaba el vector intragénico construido. Este sistema se activa por calor, gracias al promotor *hsp70*, que controla la expresión de la recombinasa Cre (Cuellar *et al.*, 2006). Se cultivó *E. coli* a 37 °C; temperatura suficiente para activar al promotor.

Luego del cultivo, se extrajo el plásmido del caldo, como se describió anteriormente. Se usó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que flanquearan los sitios *lox* mutantes. Ya que la polimerasa que se utilizó para la PCR no amplifica fragmentos mayores a 2 kilobases, solo se obtendría una banda si hubo escisión del fragmento Cre-lox. Luego de la escisión, el amplicón (la región de ADN amplificada por la PCR) se hacía lo suficientemente pequeño para poder ser amplificado por la polimerasa. Así, la obtención de un amplicón por PCR evidenciaría la escisión del fragmento entre los sitios *lox*. De no obtener

ninguna banda, se sabría que no hubo escisión. Como control, se utilizó un cultivo de pCIP35, plásmido que lleva exactamente el mismo sistema, y para el cual el CIP ya disponía de los cebadores necesarios para este experimento. Además este pCIP35 ya había sido probado para este fin, usando este mismo protocolo, exitosamente.

Los cebadores utilizados fueron:

Nombre	Secuencia
pCIP97 escisión F	ATGAAGAGACGAGAAAGCTC
pCIP97 escisión R	AGCAAGTCTAGCCTAGGAAG
pCIP35 escisión F	TCGATGAAGTGACAGATAGCTGG
pCIP35 escisión R	GAACGTGGCGAGAAAGGAAGG

Luego de la PCR, se corrió los productos en un gel de agarosa, como se describió anteriormente. El amplicón esperado con la pareja de cebadores pCIP97 tiene un tamaño de 783 pares de bases; y con la pareja de cebadores pCIP35, 371 pares de bases.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Diseño del vector

Se encontró secuencias de ADN de camote con las que se podía armar el P-ADN. Sin embargo, nunca se encontró una secuencia funcional completa, de las que se necesitaba (como un borde de transformación), en las secuencias públicas de camote. El no haber encontrado las secuencias que se buscaba se debe a que el conocimiento del genoma del camote es relativamente limitado. Con un mayor conocimiento de secuencias de camote se podría haber encontrado estas secuencias funcionales, como se ha hecho en muchos otros cultivos para los que existen vectores intragénicos (Rommens *et al.*, 2011). Lo que se hizo fue pegar dos secuencias de camote para armar una estructura (como los sitios *lox*, por ejemplo). Así, se ensambló todo el P-ADN, excepto la sección del sistema *Cre-lox* que luego se clonaría de pCIP54. La secuencia final que obtuvimos por diagramación se representa en la Figura 1. Nótese el sitio de restricción *Cla* I que servirá para insertar el resto del sistema *Cre-lox*.

La longitud mínima de cada fragmento de ADN de camote que se podía utilizar para la construcción del vector binario no había quedado definida en ninguna publicación, mientras se hacía esta tesis. Sin embargo, recientemente Thilmony *et al.* propusieron que la longitud mínima debía ser 20 pb (Thilmony *et al.*, 2010). La longitud del fragmento más pequeño que utilizamos fue 55 pb, de modo que este nuevo criterio fue respetado. Vale aclarar que este nuevo criterio es solo una propuesta de este grupo de investigadores, y no es considerado una norma.

Recientemente, se ha publicado un gen que podría ser usado como marcador de selección para un vector intragénico de camote (Kim *et al.*, 2010). Si bien esta es una buena alternativa, no fue considerada en esta tesis, porque la información recién estuvo disponible luego de culminados nuestros experimentos. En esta tesis, utilizamos al gen de resistencia a la kanamicina (*nptII*) como marcador de selección

y al sistema Cre-*lox* para escindirlo del genoma del camote, dejando insertadas solo secuencias propias del camote.

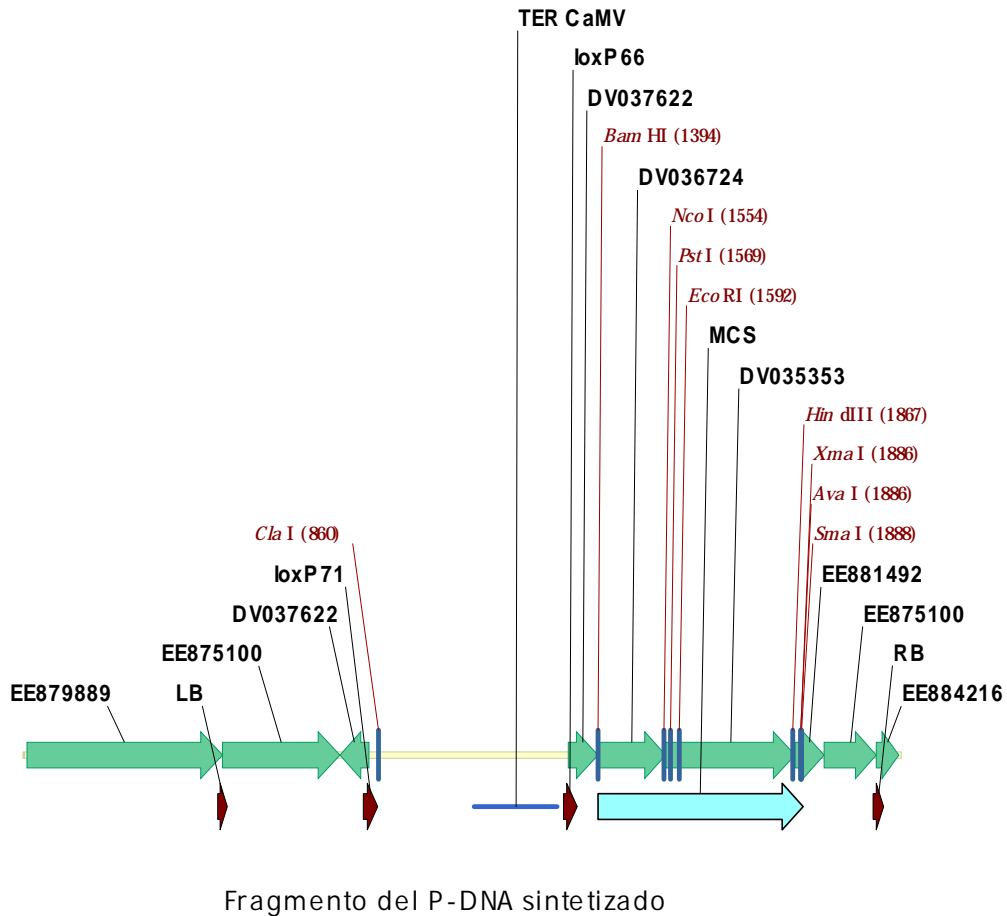


Figura 1. Esquema del segmento del P-ADN del vector intragénico que fue sintetizado. La orientación de las flechas indica si la secuencia tomada está en la hebra sentido (derecha) o antisentido (izquierda). Las flechas verdes son secuencias de camote, nombradas según su accesión en NCBI. Las flechas marrones son los bordes del P-ADN (LB: borde izquierdo y RB: borde derecho) y los sitios *lox* mutantes (*loxP71* y *loxP66*). La flecha celeste es la región del sitio de clonamiento múltiple (MCS). La raya azul indica la región correspondiente al terminador que luego se acoplará al gen *cre* (TER CaMV: terminador del virus del mosaico de la coliflor). Los nombres en letras rojas señalan sitios de restricción, siendo el nombre la enzima respectiva.

4.2 Construcción del vector

La secuencia diseñada fue sintetizada y clonada en el vector pCR4®-TOPO. Clonamos en este plásmido el fragmento faltante del sistema Cre-*lox*, obtenido de pCIP54, extrayendo el fragmento con *Cla* I. La figura 2 muestra el mapa de pCIP54, señalando los sitios *Cla* I, que delimitan el fragmento que extrajimos de este plásmido.

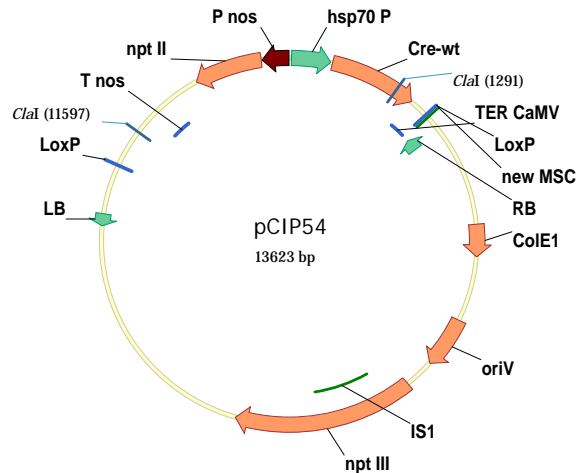


Figura 2. Plásmido pCIP54, mostrando los sitios de restricción *Cla* I, que flanquean el fragmento que extraje. Leyenda: hsp70 P + Cre-wt + TER CaMV: gen de la recombinasa Cre, LoxP: sitios de recombinación, new MSC: sitio de clonamiento múltiple, RB: borde derecho del T-ADN, Col E1: origen de replicación en *E. coli*, oriV: origen de replicación en *Agrobacterium*, IS1: transposón de *E. coli* que aumenta la expresión. Npt III: gen de resistencia a la kanamicina en bacterias, LB: borde izquierdo, T nos + npt II + P nos: gen de resistencia a la kanamicina en plantas.

Al clonar el fragmento de pCIP54 en el vector pCR4®-TOPO que llevaba la secuencia sintética, se completó el P-ADN. En la figura 3, se muestra el P-ADN completo.

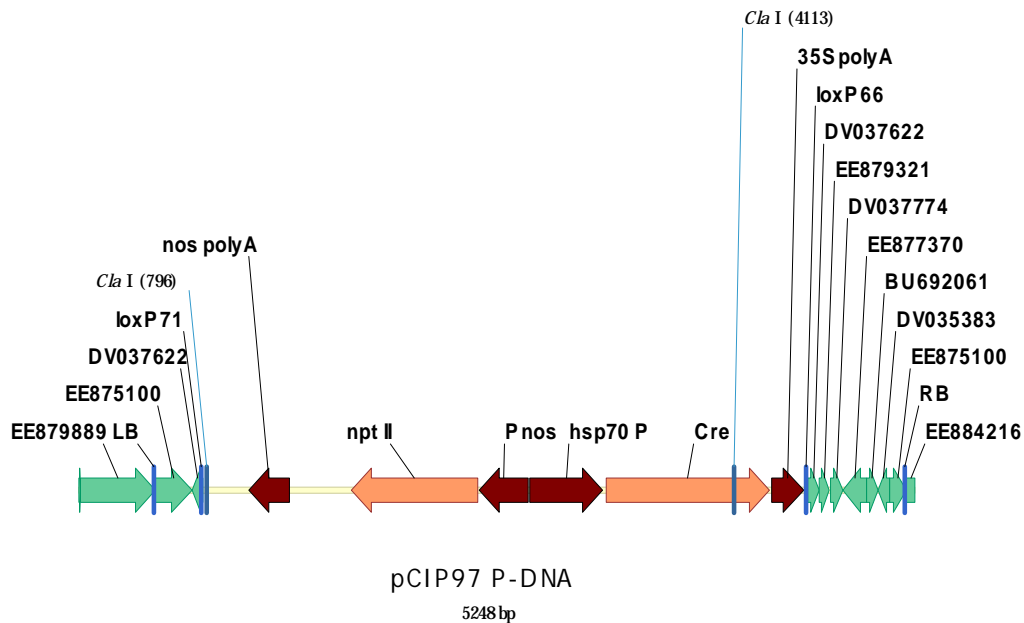


Figura 3. Mapa del P-ADN del vector intragénico (pCIP97). Se muestra los sitios *Cla* I que usé para el clonamiento del fragmento de pCIP54. Las flechas verdes son secuencias de camota, al igual que en la figura 1. Los demás elementos son del sistema Cre-lox: nos poly A: terminador proveniente del gen *nos* de *A. tumefaciens*; npt II: secuencia codificante del gen de resistencia a kanamicina, proveniente de *E. coli*; Pnos: promotor del mismo gen; hsp70 P: promotor inducible por calor, proveniente de *E. coli*; Cre: secuencia codificante de la recombinasa Cre, proveniente del bacteriófago P1; 35 S poly A: terminador proveniente del gen *35S* proveniente del virus del mosaico de la coliflor.

Confirmamos este paso de clonamiento por restricciones. Al clonar con una sola enzima de restricción (*Cla* I) el fragmento se podría insertar en orientación sentido o antisentido. Entonces, usamos enzimas de restricción que cortaran dentro del fragmento. Así, dependiendo de la orientación del fragmento, se tendría un patrón de bandas (producto de la digestión) diferente. En la figura 4 se muestra el gel, resultado del análisis de diferentes colonias obtenidas luego de hacer este paso de clonamiento.

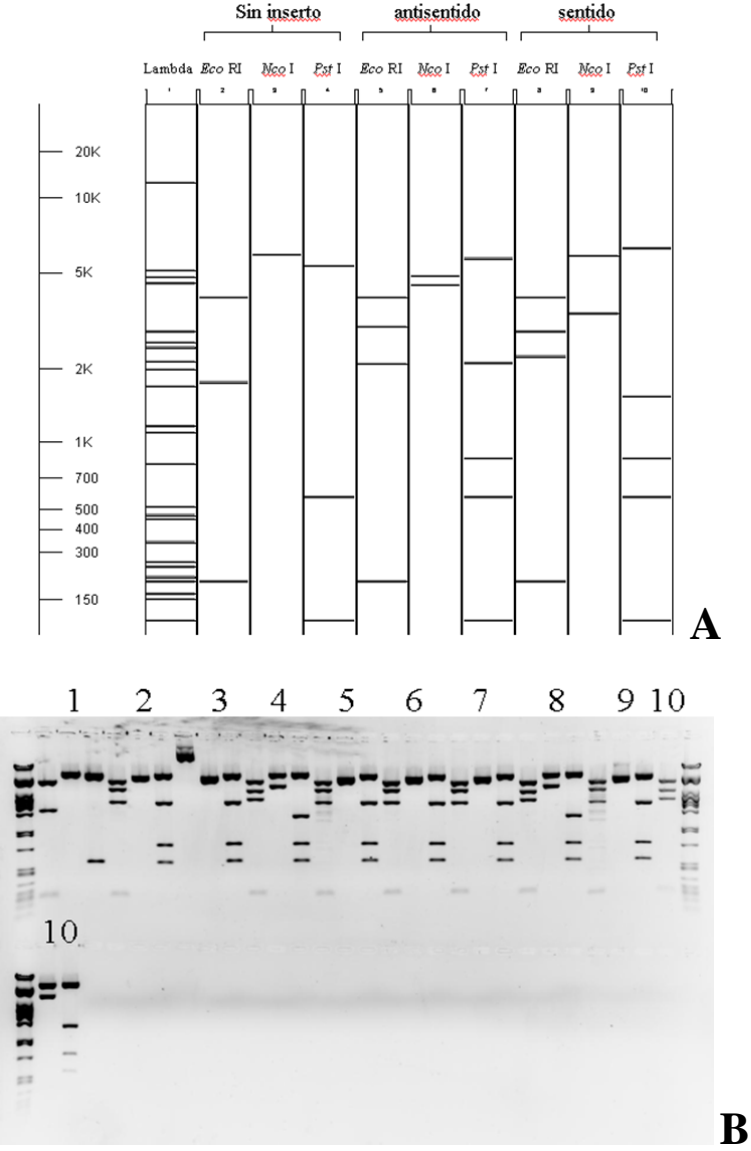


Figura 4. Gel de electroforesis, producto de digestiones de los plásmidos aislados de diferentes colonias obtenidas luego de clonar el fragmento *Cre-lox* con *Cla* I en el P-ADN. A: patrón de bandas esperado, según la orientación del fragmento y la enzima usada. B: gel obtenido de la digestión de diferentes colonias. Cada número indica una colonia diferente, y cada colonia fue digerida con las tres enzimas indicadas en A. Se muestra las digestiones con enzimas en el mismo orden que se muestran en A. En A y B se muestra el marcador de peso molecular en el carril de la izquierda. Este marcador fue creado digiriendo el ADN del fago lambda con *Pst* I.

A partir del análisis mostrado en la figura 4, encontramos 3 colonias que llevaban el inserto en orientación sentido: las colonias 4, 8 y 10. A pesar de que las tres colonias no presentaban ninguna diferencia, escogimos solo la 4 para continuar con el clonamiento.

El siguiente paso fue clonar el P-ADN en el esqueleto de pCAMBIA2300, para convertirlo en un vector binario completo. Esto se hizo con las enzimas *Bcl* I y *Sca* I. Sin embargo, *Bcl* I es sensible a la metilación, por lo que para digerir con esta enzima, tuvimos que clonar los plásmidos pCAMBIA2300 (donador del esqueleto) y pCR4®-TOPO+P-ADN (donador del P-ADN) en una cepa de *E. coli* que no metila su ADN. Esta cepa es la K12 ER2925, obtenida de New England Biolabs (Estados Unidos). Una vez clonados los plásmidos en esta cepa, hicimos las digestiones con las enzimas *Bcl* I y *Sca* I.

Luego de la ligación de los fragmentos respectivos, para obtener el vector binario intragénico, analizamos una colonia. En la figura 5 se muestra el análisis respectivo.

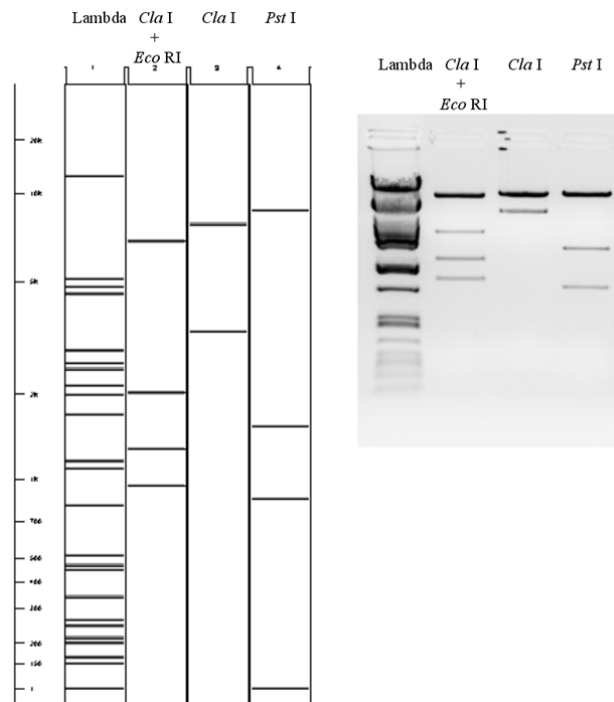


Figura 5. Análisis de restricción de una colonia obtenida de la ligación del esqueleto de pCAMBIA2300 con el P-ADN que construí. A la izquierda se muestra el patrón de bandas esperado al digerir con diferentes enzimas de restricción. A la derecha se muestra el análisis de la colonia obtenida. Se indica los nombres de las enzimas utilizadas para la digestión. Lambda es el marcador de peso molecular: el ADN del fago lambda digerido con *Pst* I.

La colonia analizada mostró el patrón esperado, indicando que la ligación había sido exitosa. Entonces esta fue la confirmación de que ya se tenía el vector intragénico completo. En la figura 6, se muestra el mapa del vector intragénico, al que llamamos pCIP97.

En conclusión, se había construido el vector, pero faltaba confirmar la integridad de la secuencia del P-ADN, para descartar mutaciones producidas por el clonamiento,

las cuales se suelen dar en *E. coli*, por errores naturales que se producen durante el proceso de replicación del plásmido.

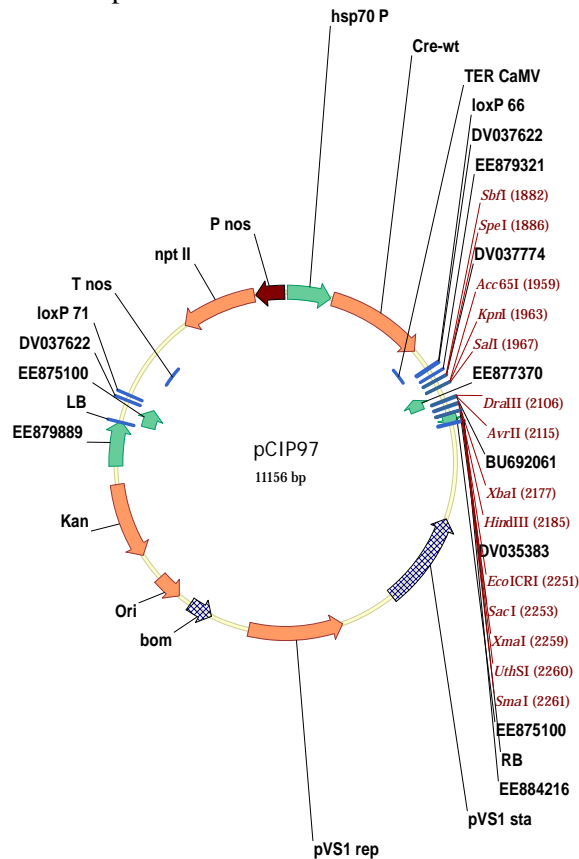


Figura 6: mapa del vector intragénico. Secciones señaladas: DV037622, EE879321, DV037774, EE877370, BU692061, DV035383, EE875100, EE884216 y EE879889: accesiones del NCBI correspondientes a las secuencias de camote utilizadas; pVS1 sta: aumentador de la replicación; pVS1 rep: origen de replicación en *Agrobacterium*; bom: aumentador de la replicación en *E. coli*; Ori: origen de replicación en *E. coli*; kan: gen de resistencia a la kanamicina en bacterias; y otras secuencias idénticas a las ya señaladas en la figura 3. En letras rojas, se indican los sitios de restricción únicos que pueden ser aprovechados para el clonamiento de genes de interés.

4.3 Secuenciamiento del vector

El siguiente paso fue secuenciar todo el P-ADN de pCIP97, incluyendo las secuencias de camote que estaban fuera del P-ADN. Esto se hizo para verificar que no hubiera habido mutación alguna y que las secuencias se mantuvieran intactas. Esto es de particular importancia para mantener el concepto de intragénesis, al mantener las secuencias de camote intactas.

En la figura 7, se muestra un alineamiento de las secuencias obtenidas. Se puede observar que diseñamos los cebadores para obtener una mayor cobertura de la secuencia. Nótese como en la mayor parte de la secuencia la cobertura es, cuando menos, 2X. Las secuencias que no fueron cubiertas cuando menos dos veces, son aquellas que estaban fuera del P-ADN o dentro del sistema *Cre-lox*, cuya integridad no era de gran importancia.

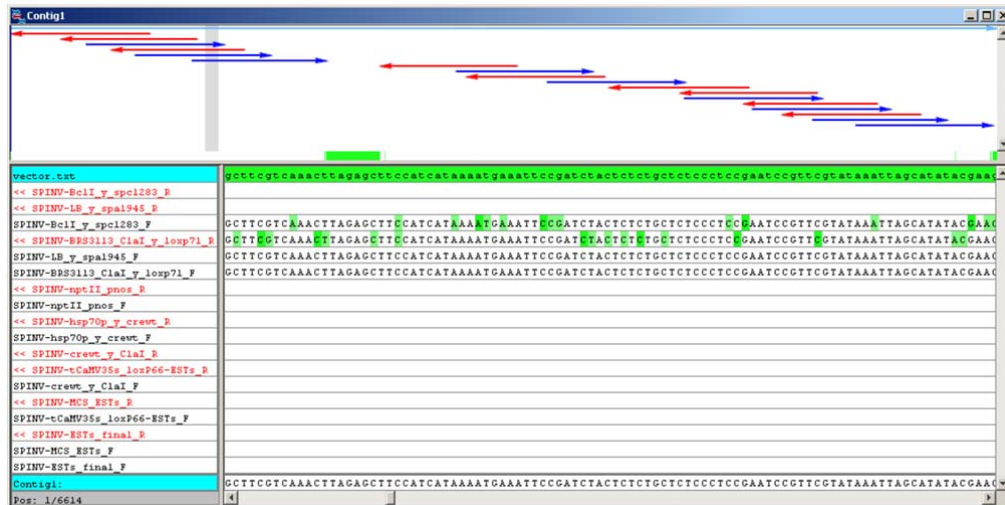


Figura 7. Alineamiento de las secuencias obtenidas de pCIP97. Las secuencias fueron alineadas usando la secuencia esperada como guía. Cada flecha es una secuencia obtenida. Las flechas rojas indican secuencias obtenidas con cebadores antisentido y las azules, sentido.

El secuenciamiento reveló que no hubo ninguna mutación. Es decir, las secuencias de camote se mantuvieron intactas, respetando el concepto de intragénesis.

En conclusión, se había construido el vector, manteniendo la característica de intragénico.

4.4 Funcionalidad del sistema Cre-lox

El siguiente paso fue verificar la funcionalidad del sistema Cre-lox. Para esto, se utilizó la PCR, como se describió en la sección de métodos. Analizamos el producto de PCR bajo el criterio de que al observar una banda de tamaño esperado en pCIP97 sabemos que el sistema Cre-lox funciona. Esto se debe a que los cebadores utilizados flanqueaban la región a escindir; así, si hubo escisión (si el sistema Cre-lox funcionaba), se vería una banda porque el amplicón sería lo suficientemente pequeño para ser amplificado por la polimerasa usada. De no haber habido escisión (si el sistema Cre-lox no funcionaba), no se observaría banda alguna, porque el fragmento completo (sin escisión) es demasiado grande para ser amplificado por la polimerasa usada.

En la figura 8, se muestra el resultado de este análisis. Nótese que la banda obtenida de pCIP97 es bastante menos intensa que la obtenida del control pCIP35. Esto se interpreta como que el sistema Cre-lox en pCIP97 es funcional, pero su eficiencia es menor que la original, en pCIP35. Esta interpretación se basa en que la cantidad de producto de PCR obtenido es proporcional a la cantidad de templado que se colocó en la reacción.

Esta diferencia en la eficiencia la atribuimos a las mutaciones en los sitios lox. Los sitios lox que se utilizó estaban basados en las pruebas realizadas por Missirlis *et al.* (2006), pero no fueron idénticos a los publicados por este grupo de científicos. Tuvimos que hacer mutaciones en la región espaciadora de los sitios lox, para poder encontrar las secuencias en camote. Las mutaciones que se hizo estuvieron basadas en la misma publicación de Missirlis *et al.* (2006), pero pudieron afectar la

eficiencia. En esta publicación se reporta que las secuencias mutantes son más eficientes que las silvestres, pero no hemos encontrado ninguna publicación que corrobore esta afirmación.

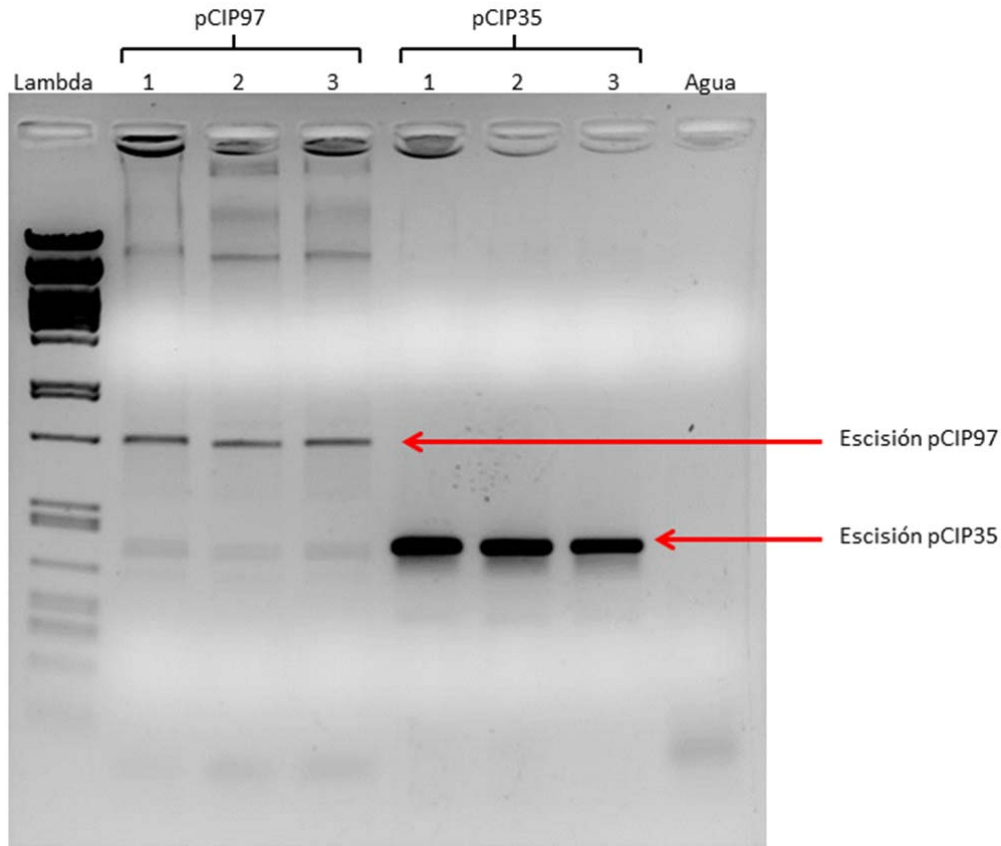


Figura 8. Análisis de escisión del sistema Cre-*lox*. Las bandas señaladas con flechas rojas corresponden a las bandas que muestran la escisión. La diferencia en el tamaño de las bandas de escisión entre pCIP97 (783 pb) y el control pCIP35 (371 pb) se debe al lugar en que aparecen los cebadores en la secuencia. La diferencia en la intensidad de las bandas de pCIP97 y pCIP35 señala una diferencia en la eficiencia de escisión. Leyenda: Lambda: marcador de peso molecular; 1, 2 y 3: cultivos independientes de *E. coli* llevando el plásmido indicado sobre los números; Agua: control de contaminación de la PCR.

La eficiencia disminuida de los sitios *lox* de pCIP97 implica que se requerirá un mayor número de repeticiones durante los ensayos de activación del sistema Cre-*lox* para obtener plantas sin marcador de selección. Si bien esto puede representar un mayor costo que el que se podría esperar, al tener que hacer más repeticiones, pensamos que esto se compensa con los beneficios de obtener camotes intragénicos.

En la figura 8, se puede observar que aún se ve el plásmido pCIP97 luego del PCR (banda superior, no señalada en la figura). Esto indica que se puso más templado en la reacción de pCIP97 que en la de pCIP35, lo cual incrementa las diferencias en la eficiencia de la escisión entre ambos plásmidos.

En conclusión, los sitios *lox* fueron funcionales, aunque con menor eficiencia que los sitios silvestres. Lo importante de este logro es que no conocemos otra publicación donde se describa la construcción de sitios *lox* intragénicos. Otros

grupos de científicos que trabajan en intragénesis utilizan la co-transformación con vectores que llevan separadamente el marcador de selección y el P-ADN. Luego hacen selección transitoria para el gen de selección y finalmente seleccionan a las líneas que no llevan el marcador de selección, pero sí el P-ADN, mediante análisis moleculares (Rommens *et al.*, 2004; Richael *et al.*, 2008). Otra alternativa que usan algunos científicos para la selección de plantas intragénicas es un marcador de selección creado a partir de mutaciones de genes propios del genoma de la planta intragénica (Thilmony *et al.*, 2010). Finalmente hay otros grupos que simplemente no utilizan marcador de selección, y es justamente esto lo que hacen los científicos que trabajan en cisgénesis (de Vetten *et al.*, 2003). Por esto, hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer trabajo que demuestra la posibilidad de utilizar el sistema *Cre-lox* en intragénesis, para escindir el marcador de selección del genoma de la planta intragénica.

4.5 Funcionalidad de los bordes del P-ADN

El siguiente paso fue probar si los bordes del P-ADN funcionaban. Para esto, se clonó el gen de la GFP en pCIP97. El vector obtenido al insertar *gfp* en pCIP97 fue llamado pCIP103. Se verificó por secuenciamiento la correcta inserción de *gfp* en pCIP103.

Una vez que se tuvo el vector pCIP103, lo agroinfiltramos en *N. benthamiana*. Agroinfiltramos también pAHCpro, que es un inhibidor de silenciamiento, para asegurar la expresión de GFP. Como control usamos pAGFP, el plásmido de donde se clonó *gfp*. Analizamos la expresión de GFP por simple observación al iluminar con luz ultravioleta las hojas agroinfiltradas. GFP produce una fluorescencia verde, al ser iluminado con luz UV.

Nuestra hipótesis de trabajo fue que, para que haya expresión transitoria de GFP en las hojas agroinfiltradas, tiene que haber habido transferencia del P-ADN a las células de *N. benthamiana* (Kreuze *et al.*, 2005). La transferencia del P-ADN depende de sus bordes, dado que son señales que *Agrobacterium* reconoce durante el proceso de transformación, necesarias para la separación del P-ADN del resto del vector binario y su posterior transferencia a la planta (Ream, 2008). Por esto, la expresión de GFP en *N. benthamiana* sería evidencia de la funcionalidad de los bordes.

En la figura 9, se muestra el resultado del análisis de expresión de GFP. Se ve que los bordes de pCIP103 no funcionaron. Esto indica que los bordes del vector intragénico (pCIP97) no son funcionales.

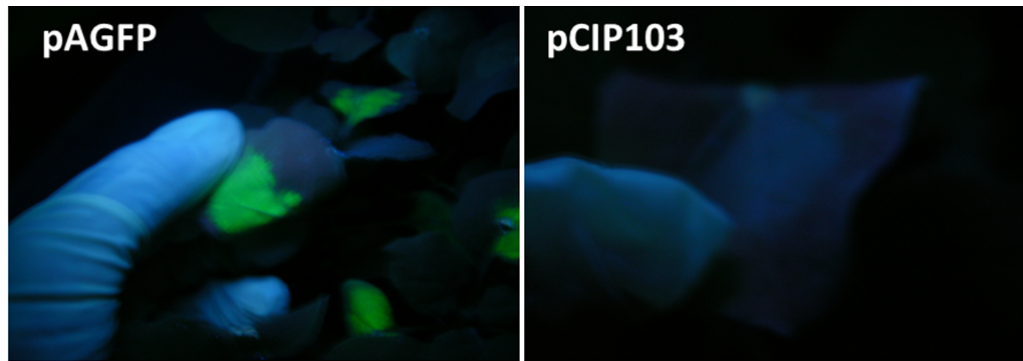


Figura 9. Análisis de expresión transitoria de GFP en *N. benthamiana*. A la izquierda se ve el control de expresión, pAGFP, y a la derecha, el vector intragénico. La fluorescencia verde no se observa en el vector intragénico.

La razón por la que no funcionaron los bordes no la conocemos. Las secuencias borde que utilizamos tienen las estructuras que se reconocen generalmente como necesarias. Incluso tienen las mismas estructuras que el grupo que trabaja en intragénesis de arroz ha reportado con uso exitoso en su vector intragénico (Thilmony *et al.*, 2010). Aunque este grupo reportó gran frecuencia de inserciones de P-ADNs acarreado secuencias más allá de los bordes, incluso inserciones del vector entero (Cook y Thilmony, 2009).

Un elemento que faltó en los bordes que diseñamos fue la secuencia que en inglés se conoce como “overdrive” (cuya traducción al español sería “a toda marcha”). Sin embargo, esta secuencia overdrive, solo se reporta como un elemento que mejora la eficiencia de la transferencia, y nunca como uno indispensable para esta. Los únicos elementos indispensables para la transferencia del T-ADN (o, en este caso, el P-ADN), desde *Agrobacterium* a la planta, son los bordes derecho e izquierdo. Incluso en ausencia de un borde izquierdo se puede generar la transferencia del plásmido entero (no solo del T-ADN), aunque la eficiencia de transferencia disminuye significativamente (Ream, 2008).

Una comparación de los bordes de diferentes vectores binarios de uso frecuente en el CIP mostró que diferentes vectores usan bordes diferentes. Algunos vectores comparten una secuencia conservada de unos 130 pares de bases. Otros vectores tienen otra secuencia igual de grande, pero diferente. Entonces no hay un patrón que indique qué secuencias faltó añadir. Sin embargo, la secuencia conservada de 25 pares de bases que se colocó en el vector intragénico de esta tesis está presente en varios vectores comerciales sin ninguna diferencia. Esto refuerza la idea de que hay otras secuencias en los bordes, que también son importantes pero que no han sido identificadas, probablemente porque más de una secuencia puede cumplir esa función.

Rommens (2010) dice que al flanquear el borde derecho con una secuencia de 79 pb, rica en AT, se puede incrementar su efectividad en la transformación de papa. Sin embargo, este es otro caso en el que se incrementa la eficiencia de intragénesis pero no es un elemento indispensable para que esta se dé.

Sin embargo, en el caso de tomate, Rommens (2010) dice que sí fue necesario añadir un fragmento a las 25 pbs del borde derecho, además de poner estas 25 pbs repetidas. Es decir que el borde derecho en el vector intragénico de tomate consiste en las 25 pbs “núcleo”, repetidas (haciendo 50 pbs), seguidas de una secuencia de 164 pbs rica en AT. Solo este fragmento de, en total, 214 pbs funcionó como borde derecho intragénico en tomate. El borde izquierdo de este mismo vector consistió de los mismos 25 pbs núcleo, acompañados de una secuencia de 189 pbs, también rica en AT.

En la misma publicación, Rommens (2010) describe los bordes utilizados para el vector intragénico de canola. En este caso se observa lo mismo, que la secuencia de 25 pbs está flanqueada por una secuencia rica en AT, tanto en el bore derecho como en el izquierdo.

Los casos de los vectores de canola y tomate indican que, en algunos casos, es necesario colocar secuencias ricas en AT, más allá de los 25 pbs que forman el núcleo del borde. Específicamente, las secuencias ricas en AT usadas en estos vectores tienen un contenido de AT de alrededor de 75%, mientras que las secuencias que rodean al borde derecho usado en el vector de esta tesis tienen un contenido de AT de alrededor de 40%.

Sin embargo, al analizar las secuencias flanqueantes a los 25 pbs del borde derecho del vector binario comercial pCAMBIA2300, se encuentra solo alrededor de 50% de AT. Entonces, si bien las secuencias ricas en AT pueden ser de ayuda, en este caso no deberían ser indispensables para la transferencia del T-ADN, ya que el contenido de AT que se encuentra en pCIP97 es muy similar al que se encuentra en pCAMBIA. Considerando que los vectores pCAMBIA tienen una eficiencia de transformación probada (Jefferson y Smith, 2009) y que los 25 pbs que componen el núcleo de los bordes es idéntico en ambos vectores, el contenido de AT no debería ser un factor para la disfuncionalidad de los bordes de pCIP97.

En conclusión, la disfuncionalidad de los bordes que diseñamos se debe a razones que aún no han sido estudiadas. Sin embargo, la solución es generar más secuencias de camote disponibles para poder encontrar secuencias más grandes que se asemejen a lo que los vectores binarios comerciales usan. Actualmente no existe nada similar a los bordes de estos vectores comerciales en el genoma del camote conocido.

La solución es secuenciar el genoma del camote u obtener muchas secuencias de él, para poder llegar a encontrar los bordes del P-ADN en camote. Esta es la estrategia que han utilizado los creadores de la mayoría de vectores intragénicos. Esta estrategia ha resultado ser exitosa, ya que se suelen encontrar secuencias tipo borde en los genomas de las plantas, como lo han demostrado estos trabajos (Conner y Jacobs, 2006; Rommens, 2010; Rommens *et al.*, 2011). Además esta estrategia tiene la ventaja de usar secuencias más largas del genoma, evitando pegar secuencias cortas para formar los bordes. Esto puede tener un beneficio en la percepción de los consumidores, ya que mientras más largas sean las secuencias usadas, menos dudas habrá sobre su origen en el camote.

V. CONCLUSIONES

- El vector intragénico fue diseñado y construido con éxito.
- El sistema *Cre-lox* utilizado es funcional.
- Al pegar dos secuencias de camote se logra ensamblar elementos que no se encuentran enteros en el genoma del camote.

VI. RECOMENDACIONES

1. Probar la eficiencia de obtención de líneas intragénicas cuando se usa un marcador de selección negativo fuera del T-ADN, para descartar las líneas que recibieron ADN foráneo (Richael *et al.*, 2008). Esta estrategia permite disminuir el número de eventos con inserciones de ADN fuera del P-ADN, como suele suceder en la transformación mediada por *Agrobacterium* (Ramanathan y Veluthambi, 1995). Esto es de especial interés para la intragénesis, pues elimina líneas que no son intragénicas por haber recibido ADN foráneo (el ADN que está más allá del P-ADN en el vector binario).
2. Probar la eficiencia de obtención de líneas intragénicas cuando se usa la cotransformación y la expresión transitoria para deshacerse del marcador de selección (Rommens *et al.*, 2004). Esta estrategia permite no usar el sistema Cre-lox que demostró tener una eficiencia relativamente baja. Convendría comparar las eficiencias de ambos sistemas para determinar cuál es el mejor.
3. Probar la eficiencia de selección al usar el gen *IbMYB1* como marcador de selección (Kim *et al.*, 2010). Esta es una alternativa a la recomendación 2. La desventaja de este sistema es que el *IbMYB1* es un gen que da coloración, lo cual puede generar un problema de percepción, por resultar algo raro para el consumidor.
4. Obtener más secuencias del genoma del camote, para poder construir bordes funcionales. Así se podría encontrar secuencias tipo borde en el genoma del camote y utilizarlas en el vector intragénico. Esta estrategia se ha usado en la mayoría de vectores intragénicos (Rommens, 2010; Rommens *et al.*, 2011).

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bayer JC, Norton GW, Falck-Zepeda JB (2010) Cost of compliance with biotechnology regulation in the Philippines: implications for developing countries. *AgBioForum* 13:53-62.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2008). GenBank. *Nucleic Acids Research (serial online)* 36:D25-D30. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=2238942&blobtype=pdf> Consultado el 6 de enero de 2009.
- Confalonieri M, Borghetti R, Macovei A, Testoni C, Carbonera D, Fevereiro MPS, Rommens C, Swords K, Piano E, Balestrazzi A (2010). Backbone-free transformation of barrel medic (*Medicago truncatula*) with a *Medicago*-derived transfer DNA. *Plant Cell Reports* 29:1013-1021.
- Conner AJ, Barrell PJ, Baldwin SJ, Lokerse AS, Cooper PA, Erasmuson AK, Nap JP, Jacobs JME (2007). Intragenic vectors for gene transfer without foreign DNA. *Euphytica* 154:341-353.
- Conner AJ, Jacobs JME (2006). GM plants without foreign DNA: implications from new approaches in vector development. En: A. Roberts (Ed.) *Proceedings of the 9th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*. Isla Jeju, Corea del Sur. pp. 195-201.
- Cook M, Thilmony R (2009). Intragenic tools for improved rice biotechnology and biosafety. Poster presentado en el Congreso Internacional de Biología Molecular de Plantas (IPMB), St. Louis, Missouri, Estados Unidos. 25-30 octubre, 2009.
- Cuellar W, Gaudin A, Solórzano D, Casas A, Ñopo L, Chudalayandi P, Medrano G, Kreuze J, Ghislain M (2006). Self-excision of the antibiotic

resistance gene *nptII* using a heat inducible Cre-*loxP* system from transgenic potato. *Plant Molecular Biology* 62:71-82.

- Dale EC, Ow DW (1991). Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:10558-10562.
- FAOSTAT (2010). *Prodstat: crops* (en línea). FAO Statistics Division. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx> Consultado el 26 de enero de 2011.
- Gelvin SB (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67:16-37.
- Haverkort AJ, Boonekamp PM, Hutten R, Jacobsen E, Lotz LAP, Kessel GJT, Visser RGF, van der Vossen EAG (2008). Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Research* 51:47-57.
- Holsters M, De Waele D, Depicker A, Messens E, Van Montagu M, Schell J (1978) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 163:181–187
- Jacobsen E, Schouten HJ (2008). Cisgenesis, a new tool for traditional plant breeding should be exempted from the regulation on genetically modified organisms in a step by step approach. *Potato Research* 51:75-88.
- Jefferson R, Smith L (2009). pCAMBIA Legacy Vectors (en línea). CAMBIA. Canberra, Australia. Disponible en: http://www.cambia.org/daisy/bioforge_legacy/3724.html Consultado el 6 de enero de 2009.
- Kalaitzandonakes N, Alston JM, Bradford KJ (2007). Compliance costs for regulatory approval of new biotech crops. *Nature Biotechnology* 25(5):509-511.
- Kim CY, Ahn YO, Kim SH, Kim Y, Lee H, Catanach AS, Jacobs JME, Conner AJ, Kwak S (2010). The sweet potato *IbMYB1* as a potential visible marker for sweet potato intragenic vector system. *Physiologia Plantarum* 139:229-240.
- Kreuze JF, Savenkof EI, Cuellar W, Li X, Valkonen JPT (2005). Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing. *Journal of Virology* 79(11):7227-7238.
- Lloyd AM, Davis RW (1995). Functional expression of the yeast FLP/FRT site-specific recombination system in *Nicotiana tabacum*. *Molecular Genetics and Genomics* 242:653-657.
- Lu G, Moriyama EN (2004). Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Briefings in Bioinformatics* 5:378-388.
- Menrad K, Gabriel A, Zapilko M (2009). Cost of GMO-related co-existence and traceability systems in food production in Germany. Contributed Paper prepared for presentation at the International Association of Agricultural Economists Conference, Beijing, China, August 16-22, 2009.

- Missirlis PI, Smailus DE, Holt RA (2006). A high-throughput screen identifying sequence and promiscuity characteristics of the *loxP* spacer region in Cre-mediated recombination. *BMC Genomics* 7:73.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2(4):279-289.
- Neuman E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high-electric fields. *EMBO J* 1(7):841-845.
- Nielsen KM (2003). Transgenic organisms - time for conceptual diversification? *Nature Biotechnology* 21:227-228.
- Ramanathan V, Veluthambi K (1995). Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of T_L-DNA. *Plant Molecular Biology* 28:1149-1154.
- Ream W (2008). Production of a mobile T-DNA by *Agrobacterium tumefaciens*. En: Tzfira T, Citovsky V (Editores). *Agrobacterium from Biology to Biotechnology*. Springer Science + Business Media, LLC. Nueva York, Estados Unidos.
- Richael CM, Kalyaeva M, Chretien RC, Yan H, Adimulam S, Stivison A, Weeks JT, Rommens CM (2008). Cytokinin vectors mediate marker-free and backbone-free plant transformation. *Transgenic Research* 17:905-917.
- Rieffel M, Gill T, White W (2009). Paracel Blast (en línea). Striking Development Inc. California, Estados Unidos. Disponible en: <http://www.paracel.com/> Consultado el 6 de enero de 2009.
- Rommens CM (2007). Cleaning-up crop genomes through intragenic modification. *ISB News Report*, September 2007, p. 5-7.
- Rommens CM (2010). Precise Breeding Through All-Native DNA Transformation. En: Widholm JM, Lörz H, Nagata T (Editores) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Volumen 64(1):61-77.
- Rommens CM, Conner A, Yan H, Hanley Z (2011). Intragenic vectors and marker-free transformation: tools for a greener biotechnology. En: Stewart CN, Touraev A, Citovsky V, Tzfira T (Editores). *Plant Transformation Technologies*. Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Rommens CM, Haring MA, Swords K, Davies HD, Belknap WR (2007). The intragenic approach as a new extension to traditional plant breeding. *Trends in Plant Science* 12:387-403.
- Rommens CM, Humara JM, Ye J, Yan H, Richael C, Zhang L, Perry R, Swords K (2004). Crop improvement through modification of the plant's own genome. *Plant Physiology* 135:421-431.
- Rommens CM, Ye J, Richael C, Swords K (2006). Improving potato storage and processing characteristics through all-native DNA transformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:9882-9887.
- Schouten HJ, Krens FA, Jacobsen E (2006). Do cisgenic plants warrant less stringent oversight? *Nature Biotechnology* 24:753.
- Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica (2000). Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la

Diversidad Biológica: texto y anexos. Montreal: Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. p.4.

- Stathers T, Namada S, Mwanga ROM, Khisa G, Kapinga R (2005). Manual for sweetpotato integrated production and pest management farmer field schools in sub-Saharan Africa. International Potato Center. Kampala, Uganda. pp 168 + xxi.
- Stewart RB (2009). GMO trade regulation and developing countries. New York University Public Law and Legal Theory Working Papers. Paper 165. Disponible en: http://lsr.nellco.org/nyu_plltwp/165/ Consultado el 26 de enero de 2011.
- Thilmony R, Mara G, Cook M (2010). New molecular tools for improved crop biotechnology. Presentación Oral del Congreso de la International Association of Plant Biotechnology, St. Louis, Missouri, Estados Unidos. 6-11 junio, 2010.
- Vasil IK (2008). A short history of plant biotechnology. *Phytochemistry Reviews* 7:387-394.
- Vega JM, Yu W, Kennon AR, Chen X, Zhang ZJ (2008). Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. *Plant Cell Reports* 27:297-305.
- Vetten de N, Wolters A, Raemakers K, van der Meer I, ter Stege R, Heeres E, Heeres P, Visser R (2003). A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nature Biotechnology* 21(4):439-442.
- Viswanath V, Strauss SH (2010). Modifying plant growth the cisgenic way. ISB News Report September 2010, pp. 1-4.
- Weeks JT, Ye J, Rommens CM (2008). Development of an *in planta* method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Research* 17:587-597.
- Zhang D, Cervantes J, Huamán Z, Carey E, Ghislain M (2000). Assessing genetic diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars from tropical America using AFLP. *Genetic Resources and Crops Evolution* 47:659-665.