

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

ESCUELA DE POSTGRADO

MAESTRIA EN MEJORAMIENTO GENETICO DE PLANTAS



Transformación genética de “camote” (*Ipomoea batatas* (L.) Lamarck, 1793) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1*

Presentado por:

MILAGROS ORMACHEA ARAUCO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGÍSTER SCIENTIAE EN
MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS**

Lima - Perú

2011

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
Escuela de Post Grado
Telf. 6147800 Anexo 209 Telefax 3495678
Apartado 12-056 La Molina
LIMA - PERU

ACTA DE SUSTENTACION

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos para evaluar la sustentación de tesis presentada por la alumna **MILAGROS ORMACHEA ARAUCO**, denominada: "TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE "CAMOTE" (*Ipomoea batatas* (L.) Lamarck, 1793) MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* UTILIZANDO LOS GENES *cry3Ca1* y *cry7Aa1*", para cumplir con uno de los requisitos para optar el grado académico de *Magister Scientiae* en la Especialidad de **MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS**.

Teniendo en consideración los méritos del referido trabajo así como los conocimientos demostrados por la sustentante, declaramos la tesis como:

APROBADA

EXCELENTE

con el calificativo (*) de



En consecuencia, queda en condición de ser considerado APTA por el Consejo Universitario y recibir el grado académico de *Magister Scientiae*, de conformidad con lo estipulado en el Artículo 41° del Reglamento de la Escuela de Post Grado.

La Molina, 7 de enero del 2011


Dr. Jorge Jiménez Davalós
PRESIDENTE


Dr. Raúl Blas Sevillano
PATROCINADOR


Mg.Sc. César López Bonilla
MIEMBRO


Dr. William Roca Pizzini
MIEMBRO

(*) De acuerdo con el Artículo 17° del Reglamento de Tesis, éstas deberán ser calificadas con términos de: EXCELENTE, MUY BUENO, BUENO o REGULAR

A mi familia por brindarme su total confianza y apoyo.
De manera especial a mis padres, mi abuelo y mi esposo
porque son el motor de mi vida

AGRADECIMIENTO

Al Centro Internacional de la Papa (CIP) por el financiamiento brindado para la realización de la presente tesis y al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) por proporcionarme financiamiento para los estudios de maestría.

Al Dr. Marc Ghislain, Jefe del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del Centro Internacional de la Papa (CIP) y asesor de la presente tesis, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo esta investigación.

Al Biólogo José Carlos Tovar por su amistad, constante apoyo y acertadas sugerencias durante el desarrollo de mi investigación.

Al MSc. Raúl Eyzaguirre por sus sugerencias durante el análisis de datos estadísticos.

A todos mis amigos y personal del Laboratorio de Biotecnología Aplicada por permitirme trabajar en un ambiente agradable y lleno de familiaridad.

Al Dr. Raúl Blas por aceptar ser mi asesor universitario y haberme guiado en el desarrollo y sustentación de la presente investigación, así mismo a mi jurado calificador Dr. William Roca, Dr. Jorge Jiménez y Mg. Sc. César López por sus consejos y recomendaciones para el desarrollo y redacción de la presente tesis.

RESUMEN

La expresión de los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1*, que codifican proteínas tóxicas contra los gorgojos africanos de camote, *Cylas* spp., fue cuantificada en eventos transgénicos de camote (variedad Jewel) obtenidos por transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación de camote con los genes *cry7Aa1* y *cry3Ca1* produjo un total de 7 y 9 eventos transgénicos, respectivamente. Para identificar los eventos con mayor expresión de proteínas Cry se midió la actividad transcripcional en hojas a través del PCR en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR) usando la metodología de SYBR Green I, y se detectó la expresión de la proteína Cry en hojas y raíces tuberosas mediante DAS-ELISA, usando anticuerpos policlonales de conejo. La actividad transcripcional del gen *cry3Ca1* fue mayor que la de *cry7Aa1*, habiendo eventos que mostraron 54 y 10 veces más de expresión del transcrito que sus respectivas líneas de referencia (líneas de menor expresión), respectivamente. La expresión de la proteína Cry3Ca1 fue mayor que la de Cry7Aa1 tanto en hojas como raíces tuberosas, oscilando la expresión en las raíces tuberosas entre 0.15-1.47 µg/g y 0.02-0.06 µg/g, respectivamente. Estas líneas transgénicas expresan diferentes niveles de toxicidad que pueden constituir una importante fuente de resistencia contra el gorgojo de camote.

ABSTRACT

The expression of *cry7Aa1* and *cry3Ca1* genes, coding for toxic proteins against African sweetpotato weevils, *Cylas* spp., was quantified in transgenic events from the sweetpotato variety Jewel obtained through genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Transformation of sweetpotato with *cry7Aa1* and *cry3Ca1* genes yielded a total of seven and nine events, respectively. In order to identify events that are high expressers of the Cry protein, the transcriptional activity was measured in leaves through quantitative real-time PCR based on SYBR Green I methodology and the expression of Cry proteins, in leaves and tuberous roots, was measured by DAS-ELISA using rabbit polyclonal antibodies. The *cry3Ca1* gene transcriptional activity was higher than *cry7Aa1*, with expression levels of 54 and 10 times higher than their respective LE (line with lowest expression), respectively. The Cry3Ca1 protein expression was higher than Cry7Aa1 both in leaves and tuberous roots, ranging the expression in tuberous roots between 0.15-1.47 μ g/g and 0.02-0.06 μ g/g, respectively. These transgenic lines express different levels of toxicity that can constitute a major source of resistance against sweet potato weevil.

INDICE GENERAL

I.	INTRODUCCION	17
II.	OBJETIVOS	19
III.	REVISION BIBLIOGRAFICA	20
	3.1 Importancia del camote	20
	3.2 Proteínas de reserva en camote	21
	3.2.1 La esporamina	21
	3.2.2 La β -amilasa	21
	3.3 El gorgojo de camote	22
	3.4 <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
	3.5 Cultivos con tecnología Bt	25
	3.6 Expresión y cuantificación de proteínas Cry	27
	3.7 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
	3.8 Regeneración <i>in vitro</i>	30
IV.	MATERIALES Y METODOS	32
	4.1 Lugar de ejecución	32
	4.2 Materiales	
	4.2.1 Material vegetal	32
	4.2.2 Material bacteriano	32
	4.3 Métodos	
	4.3.1 Cultivo de bacterias	34
	4.3.2 Extracción de ADN plasmídico	34
	4.3.3 Transformación genética de Jewel	35
	4.3.4 Determinación de la incorporación del transgén	37
	A.- Prueba de resistencia a Kanamicina	37
	B.- Extracción de ADN de plantas	37
	C.- Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	38
	4.3.5 Expresión del transgén	41
	D.- NCM-ELISA en hojas de eventos transgénicos	42
	E.- Western Blot en hojas de eventos transgénicos	43
	F.- DAS-ELISA en hojas y raíces tuberosas de eventos transgénicos	44
	G.- Extracción de Acido Ribonucleico (ARN) de hojas de invernadero y raíces tuberosas	47
	H.- Síntesis de ADNc	49
	I.- PCR en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR)	50

V. RESULTADOS	52
5.1 Transformación genética de Jewel	52
5.2 Determinación de la incorporación del transgén	53
5.2.1 Prueba de resistencia a Kanamicina	53
5.2.2 Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	54
5.3 Expresión del transgén	57
5.3.1 NCM-ELISA de proteínas Cry3Ca1 y Cry7Aa1	57
5.3.2 Western Blot de proteínas Cry3Ca1 y Cry7Aa1	58
5.3.3 DAS-ELISA de proteínas Cry3Ca1 y Cry7Aa1	61
5.3.4 Análisis de PCR en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR)	70
VI. DISCUSIONES	74
VII. CONCLUSIONES	80
VIII. RECOMENDACIONES	81
IX. BIBLIOGRAFIA	82
X. ANEXOS	90
10.1 Tablas	91
10.2 Figuras	100

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Lista de las bacterias utilizadas	91
Tabla 2.	Medio MPB	91
Tabla 3.	MPB Store	91
Tabla 4.	Medio MIB	92
Tabla 5.	Medio MO-4FA	92
Tabla 6.	Medio MO-Zea	92
Tabla 7.	Medio 303	93
Tabla 8.	Gel de Agarosa 1%	93
Tabla 9.	Buffer CTAB-2X	93
Tabla 10.	Secuencia de iniciadores para la amplificación por PCR de la región del transgén de los genes <i>cry3Ca1</i> y <i>cry7Aa1</i>	39
Tabla 11.	Secuencia de iniciadores para la amplificación por PCR de la región del gen bacteriano <i>virD2</i>	39
Tabla 12.	Mezcla de reacción para la amplificación por PCR (Master mix)	40
Tabla 13.	Programa de PCR para los genes <i>cry3Ca1</i> , <i>cry7Aa1</i> y <i>virD2</i>	40
Tabla 14.	Buffer TBS	94
Tabla 15.	Buffer de absorción de anticuerpos inespecíficos	94
Tabla 16.	Buffer T-TBS	94
Tabla 17.	Buffer de extracción	94
Tabla 18.	Laemli buffer	94
Tabla 19.	Gel de acrilamida 10%	95
Tabla 20.	Buffer de transferencia 1X	95
Tabla 21.	Buffer de corrida 1X	95

Tabla 22.	Buffer de diálisis	96
Tabla 23.	Buffer PBS	96
Tabla 24.	Buffer de cobertura	96
Tabla 25.	Buffer de maceración	96
Tabla 26.	Buffer de conjugado	97
Tabla 27.	Agua DEPC (1X)	97
Tabla 28.	Gel de agarosa 2%	97
Tabla 29.	Buffer TBE 1X-DEPC	97
Tabla 30.	Mix inicial (ARN+iniciadores) para la síntesis de ADNc (Mezcla 1)	49
Tabla 31.	Mix para la síntesis de ADNc (Mezcla 2)	49
Tabla 32.	Secuencia de iniciadores para la amplificación por qRT-PCR de la región del transgén de los genes <i>cry3Ca1</i> , <i>cry7Aa1</i> y del gen <i>COX</i>	50
Tabla 33.	Mix para el qRT-PCR	51
Tabla 34.	Programa de qRT-PCR para los genes <i>cry3Ca1</i> , <i>cry7Aa1</i> y <i>virD2</i>	51
Tabla 35.	Situación <i>in vitro</i> de los regenerantes obtenidos	52
Tabla 36.	Resultados <i>in vitro</i> de resistencia a Kanamicina	53
Tabla 37.	Resultados de PCR para la detección de los genes <i>cry7Aa1</i> y <i>cry3Ca1</i> en eventos transgénicos	54
Tabla 38.	Resultados de PCR para la detección del gen <i>virD2</i> en plantas PCR positivas para los genes <i>cry7Aa1</i> <i>cry3Ca1</i>	56
Tabla 39.	Cuantificación de proteínas (ng/μl) Cry7Aa1 y Cry3Ca1 en hojas de eventos transgénicos usando el método de Bradford	59
Tabla 40.	Cuantificación de proteínas (ng/μl) Cry7Aa1 y Cry3Ca1 en raíces tuberosas de eventos transgénicos usando el método de Bradford	60
Tabla 41.	Promedio de cuantificación de la proteína Cry7Aa1 (μg/gr) en hojas de invernadero	98

- Tabla 42.** Promedio de cuantificación de la proteína Cry3Ca1 ($\mu\text{g}/\text{gr}$) en 98
hojas de invernadero
- Tabla 43.** Promedio de cuantificación de la proteína Cry3Ca1 ($\mu\text{g}/\text{gr}$) en 99
raíces tuberosas
- Tabla 44.** Promedio de cuantificación de la proteína Cry7Aa1 ($\mu\text{g}/\text{gr}$) en 99
raíces tuberosas

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Construcción pCIP78	32
Figura 2.	Construcción pCIP79	32
Figura 3.	Esquema de transformación genética <i>in vitro</i> de camote Jewel	34
Figura 4.	Toxina Cry3Ca1	40
Figura 5.	Toxina Cry7Aa1	40
Figura 6.	Prueba de formación de callo en hojas <i>in vitro</i>	54
Figura 7	Amplificación del gen <i>cry7Aa1</i>	55
Figura 8.	Amplificación del gen <i>cry3Ca1</i>	55
Figura 9.	Amplificación del gen <i>virD2</i> en plantas PCR positivas para el gen <i>cry7Aa1</i>	56
Figura 10.	Amplificación del gen <i>virD2</i> en plantas PCR positivas para el gen <i>cry3Ca1</i>	56
Figura 11.	Detección de proteínas Bt Cry7Aa1 y Cry3Ca1 en plantas mediante NCM-ELISA	57
Figura 12.	Detección de proteína pura Cry7Aa1 por Western Blot	58
Figura 13.	Estandarización de la curva de Bradford para cuantificar las proteínas totales en hojas	58
Figura 14.	Estandarización de la curva de Bradford para cuantificar las proteínas totales en raíces tuberosas	60
Figura 15.	Dilución de anticuerpo Cry7Aa1 (IgG:IgG conjugada) en 1/500:1/500, 1/1000:1/1000, 1/1500:1/1500	100
Figura 16.	Dilución de anticuerpo Cry3Ca1 (IgG 1/500:IgG conjugada) en 1/500:1/100, 1/500:1/250, 1/500:1/500	100
Figura 17.	Curva estándar de Cry7Aa1 en una dilución de anticuerpo de 1/100	61
Figura 18.	Curva estándar de Cry3Ca1 en una dilución de anticuerpo de 1/100	62

Figura 19.	Detección de proteína Cry7Aa1 después de 5 minutos de agregado el sustrato	62
Figura 20.	Detección de proteína Cry3Ca1 después de 90 minutos de agregado el sustrato	63
Figura 21.	Cuantificación de Cry7Aa1 ($\mu\text{g}/\text{gr}$) en hojas mediante la técnica de DAS-ELISA	64
Figura 22.	Cuantificación de Cry3Ca1 ($\mu\text{g}/\text{gr}$) en hojas mediante la técnica de DAS-ELISA	64
Figura 23.	Cuantificación de Cry7Aa1 ($\mu\text{g}/\text{gr}$) en tallos y hojas <i>in vitro</i> en donde la expresión del promotor de β -amilasa ha sido inducida por sucrosa (10%)	65
Figura 24.	Raíces tuberosas producidas en el invernadero de bioseguridad	101
Figura 25.	Cuantificación de proteína Cry3Ca1 ($\mu\text{g}/\text{gr}$) en cáscara de raíces tuberosas	66
Figura 26.	Cuantificación de proteína Cry3Ca1 ($\mu\text{g}/\text{gr}$) en pulpa de raíces tuberosas	66
Figura 27.	Cuantificación de proteína Cry7Aa1 ($\mu\text{g}/\text{gr}$) en cáscara de raíces tuberosas	67
Figura 28.	Cuantificación de proteína Cry7Aa1 ($\mu\text{g}/\text{gr}$) en pulpa de raíces tuberosas	67
Figura 29.	Cuantificación cualitativa de las proteínas purificadas Cry3Ca1 y Cry7Aa1 (protoxinas) usando 200, 150 y 100 ng de BSA como patrón	69
Figura 30.	Curva de melting para los iniciadores que amplifican el transgén <i>cry7Aa1</i>	70
Figura 31.	Curva de melting para los iniciadores que amplifican el transgén <i>cry3Ca1</i>	70
Figura 32.	Curva estándar de eficiencia de primers, utilizando los plásmidos pCIP78 (izquierda) y pCIP79 (derecha)	71
Figura 33.	Expresión del transgén <i>cry3Ca1</i> en hojas	72
Figura 34.	Expresión del transgén <i>cry7Aa1</i> en hojas	72

TERMINOS Y ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
ADN-T	Acido desoxirribonucleico que se transfiere a la planta
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
β - <i>amy</i>	Gen de β -amilasa
BSA	Albúmina de suero bovino
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> , bacteria gram-positiva que contiene un cuerpo paraesporal conocido como cristal, el cual es de naturaleza proteica (δ -endotoxinas) y tiene propiedades insecticidas. Estos cristales están compuestos por una o más proteínas codificadas por los genes <i>cry</i> .
COX	Gen citocromo oxidasa, gen constitutivo que se expresa a nivel de mitocondrias.
DAS-ELISA	Ensayo inmunoenzimático que emplea doble anticuerpo, a manera de sandwich.
DEPC	Dietilpirocarbonato
ER	Eficiencia de regeneración
ET	Eficiencia de transformación
GAR	Inmunoglobulina de conejo
IgG	Inmunoglobulina G
Kd	Kilodaltons
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
qRT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real cuantitativo
NBT/BCIP	Nitro azul de tetrazolio/ 5 Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, solución de sustrato para NCM-ELISA

NCM-ELISA Ensayo inmunoenzimático en membrana de nitrocelulosa

nptII Gen de neomicina fosfotransferasa, confiere resistencia a Kanamicina.

SPOA Gen de esporamina

Ti Plásmido inductor de tumor

I. INTRODUCCIÓN

El camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lamarck, 1793) es una fuente importante de alimento e ingresos para los agricultores de países en vías de desarrollo, principalmente en Asia y África subsahariana. Estos dos continentes son responsables del 82% de la producción anual mundial (FAOSTAT, 2011). Este cultivo desempeña un papel importante en la seguridad alimentaria en los países africanos del este. Sin embargo, las producciones en esta región son bajas (5 t ha^{-1}) en comparación con el promedio mundial (15 t ha^{-1}) (Luo *et al.*, 2006). La baja producción del cultivo de camote es el resultado del incremento de enfermedades y plagas, la principal plaga es causada por 3 especies de gorgojos del camote (*Cylas formicarius*, *C. puncticollis* y *C. brunneus*).

A pesar de numerosas investigaciones, no se han identificado variedades resistentes al gorgojo en el germoplasma de camote lo cual limita la aplicación del mejoramiento convencional, ubicando a la biotecnología moderna como la alternativa más apropiada para obtener plantas de camote resistentes al gorgojo. Estas plantas pueden ser obtenidas a través del mejoramiento mediado por la ingeniería genética, la cual permite la manipulación directa de los genes que se desean introducir en el genoma de la planta. De este modo, se puede obtener plantas con nuevas características conferidas por los genes foráneos (Prakash, 1994).

El desarrollo de plantas resistentes a insectos se ha basado en el conocimiento de proteínas insecticidas, producidas por la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis*. Los genes *cry* de *B. thuringiensis* (o genes *Bt*), expresan toxinas en forma de cristales, altamente tóxicas y específicas para determinados insectos, así los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1* presentan actividad contra insectos del orden Coleóptera (Lambert *et al.*, 1992a). Por consiguiente, pueden conferir resistencia al gorgojo al ser incorporados y expresados en el genoma de la planta sin afectar negativamente a otros insectos. Incluso se puede

dirigir la expresión de los genes *cry* a un determinado órgano de la planta mediante el uso de promotores inducibles.

La estrategia de transferencia de genes más utilizada es la mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, debido a que no requiere equipos sofisticados y produce frecuentemente eventos limpios (con integración intacta del T-DNA y una sola copia). De otro lado; entre los sistemas de regeneración de plantas más utilizados, la organogénesis indirecta es la preferida para fines de modificación genética, debido a que la formación de callos permite la selección de células y, posteriormente, la obtención de plantas genéticamente modificadas (Litz y Jarret, 1991; Luo *et al.*, 2006).

En resumen, las técnicas de ingeniería genética permitirán la obtención de plantas de camote resistentes al gorgojo, a través de la inserción y expresión de los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1* mediante la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* y la regeneración vía organogénesis.

Los eventos transgénicos obtenidos deben confirmar la actividad insecticida de los genes *cry* contra el gorgojo de camote, expresando las proteínas Cry en el genoma de Jewel, lo cual hará posible extender el uso de estos genes, en el futuro, en variedades de camote adaptadas al Africa u otras regiones.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Obtener plantas transgénicas de camote cv. “Jewel” que expresen los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1*.

2.2 Objetivos específicos

- Transformar explantes de camote usando las construcciones simples pCIP78 (*cry7Aa1*) y pCIP79 (*cry3Ca1*).
- Verificar la inserción del T-DNA en el genoma de la planta mediante pruebas *in vitro* y moleculares.
- Determinar los niveles de expresión del transgén y de las proteínas Cry7Aa1 y Cry3Ca1 en los eventos transgénicos de camote cv. Jewel.

III. REVISION DE LITERATURA

3.1 Importancia del camote

El camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) es uno de los cultivos más importantes, versátiles y menos aprovechados del mundo, con una producción de 107 millones de toneladas, cálculos en base al peso fresco (FAOSTAT, 2011). El camote actualmente se ubica en el cuarto lugar en importancia de producción entre las raíces tuberosas y tubérculos; se cultiva en más de 111 países en desarrollo, figurando entre los cinco cultivos más importantes en más de 50 de ellos. Asia y África subsahariana son los mayores productores a nivel mundial, destacando China con una producción de 81 millones de toneladas (FAOSTAT, 2011). En América Latina, destacan en producción Brasil, Argentina, Perú, Cuba y Haití (Centro Internacional de la Papa, 1999).

Este cultivo es particularmente importante en países del África central y del este, siendo para Ruanda, Burundi y Uganda un alimento de consumo básico; y para Kenia, Tanzania y el Congo un alimento con un rol primario en la seguridad alimentaria (Kapinga *et al.*, 2005).

Su importancia radica en ser una fuente primordial de calorías y vitaminas; particularmente las variedades de pulpa naranja proveen una considerable cantidad de vitamina A; tener una alta producción de carbohidratos en las raíces y de proteínas en las hojas nuevas; y poseer un rico y variable germoplasma (Montaldo, 1991). Debido a que alcanza la madurez en un corto periodo, el camote es capaz de proveer alimento en áreas con periodos cortos de lluvia y periodos prolongados de sequía, donde otros cultivos no pueden sobrevivir (Kapinga *et al.*, 2005).

El camote es un hexaploide ($2n=6X=90$) que presenta problemas de esterilidad de polen, autoincompatibilidad e incompatibilidad cruzada y limitada producción de semillas; generando muchos desafíos para el mejoramiento genético convencional.

3.2 Proteínas de reserva en camote

Durante el engrosamiento y crecimiento de las raíces de camote, es decir la formación de raíces tuberosas, se acumulan grandes cantidades de proteínas de reserva, siendo las más abundantes la esporamina y la β -amilasa.

3.2.1 La esporamina

La esporamina representa el 60-80% del total de proteínas solubles presente en la raíz tuberosa (Maeshima *et al.*, 1985). Aparte de ser la principal proteína de reserva, la esporamina -cuya secuencia de aminoácidos es homóloga a la de los inhibidores de tripsina- cumple un importante rol de defensa contra el ataque de insectos (Wang *et al.*, 2002).

La esporamina está formada por una mezcla de polipéptidos que son codificados por una familia de multigenes que puede ser clasificada en dos grandes subfamilias: A y B, basada en la homología de su secuencia de nucleótidos (Maeshima *et al.*, 1985). El número estimado de copias de esporamina A y B está en una proporción de 6:4 copias por genoma haploide, respectivamente, lo que equivale decir un total de 60 copias del gen de esporamina en el genoma hexaploide del camote (Hattori *et al.*, 1990)

3.2.2 La β -amilasa

La β -amilasa representa cerca del 5% del total de proteínas solubles en la raíz tuberosa, y al igual que la esporamina, esta ausente o presente en pequeñas cantidades en órganos diferentes a la raíz tuberosa.

En camote, a diferencia de otros cultivos, la β -amilasa es un tetrámero con subunidades idénticas cuya secuencia de aminoácidos es igual a la de la proteína inhibidora de fosforilasa (Nakamura *et al.*, 1991).

Además de la función de proteína de reserva, la β -amilasa almacenaría temporalmente el nitrógeno y sería la encargada de la degradación del almidón a maltosa durante la cocción, confiriéndole el sabor característico al camote (Nakamura *et al.*, 1991).

El genoma hexaploide del camote contiene 1 copia de genes de β -amilasa por genoma haploide; es decir, un total de 6 copias del gen de β -amilasa en el genoma hexaploide del camote (Nakamura *et al.*, 1991)

Además de expresarse en las raíces tuberosas, se puede inducir la expresión de los genes de esporamina (*Spo*) y β -amilasa (*β -amy*) en tejidos vegetales atípicos (meristemos, hojas y pecíolos) suministrando altas concentraciones de sucrosa (Hattori *et al.*, 1991) e induciendo heridas.

3.3 El gorgojo del camote

La producción de camote se ve seriamente afectada por el daño producido por el gorgojo de camote (*Cylas spp.*), el cual puede llegar a causar pérdidas en áreas tropicales y zonas de elevada temperatura en un 60 a 100% (Stathers *et al.*, 2003).

Diversas especies del gorgojo prevalecen en diferentes áreas geográficas siendo *Cylas formicarius* la especie de gorgojo de camote con mayor impacto a nivel mundial; este daña el cultivo en campo y almacén y es considerada una de las plagas más difíciles de controlar. En Africa subsahariana, las especies africanas de mayor impacto económico y de distribución exclusiva son *Cylas puncticollis* (Boheman) y *Cylas brunneus* (Fabricius) (Cisneros y Alcázar, 2001).

El daño de importancia económica es causado por la larva del gorgojo en las raíces tuberosas y en la base de los tallos. Las larvas forman túneles en las raíces tuberosas, los cuales van incrementando su diámetro a medida que la larva crece y se desarrolla. El daño generado induce la producción de fenoles y terpenoides en las galerías; lo que lleva a una reducción de la calidad de la raíz y de las características palatables, haciéndolo no apto para la alimentación debido al sabor amargo que se produce (Smit & Van Huis, 1998).

Por décadas se ha tratado de desarrollar en camote germoplasma élite y eficientes prácticas agronómicas que reduzcan el efecto destructivo del gorgojo; sin embargo, los resultados de investigación no han conseguido un impacto duradero en la agricultura africana (Abate *et al.*, 2000, Stathers *et al.*, 2003).

Las prácticas de manejo integrado de plagas (MIP) no han tenido éxito en el control del gorgojo en Africa Sub-sahariana, debido a lo difícil y poco práctico que se hace controlar el saneamiento de los sistemas de producción a pequeña escala (producción de subsistencia), en los cuales se cultiva el camote durante todo el año. Esto, sumado a sus habituales practicas de cultivo (almacenaje y cosecha) garantizan que hayan raíces frescas de camote todo el año, lo cual también implica que el cultivo de camote este permanentemente expuesto al gorgojo.

La aplicación de insecticidas químicos tampoco resulta efectivo en el control del gorgojo, debido a que en campo el 80-90% de la población de gorgojos en raíces se distribuye debajo de la superficie del suelo, limitando la efectividad de los insecticidas (Stathers *et al.*, 2003).

Por lo tanto, la aplicación de la biotecnología moderna, específicamente de la ingeniería genética para desarrollar variedades de camote resistentes al gorgojo es una alternativa relevante (Prakash, 1994), ya que permite la introducción de genes de resistencia específicos contra dicha plaga.

3.4 *Bacillus thuringiensis*

El desarrollo de plantas resistentes a insectos usando la ingeniería genética, se ha basado en el conocimiento de proteínas insecticidas producidas por *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria gram-positiva contiene un cuerpo paraesporal conocido como cristal, el cual es de naturaleza proteica (δ -endotoxinas) y tiene propiedades insecticidas. Estos cristales están compuestos por una o más proteínas codificadas por los genes *cry* (Soberon & Bravo, 2009).

Los cristales producidos por *Bt* se solubilizan a pH alcalino en el intestino medio de la larva, liberando la prototoxina (125-140kDa) que posteriormente será activada por efecto de las proteasas del intestino de los insectos, generando una proteína activa de 55-75kDa (Gringorten *et al.*, 1992). Las proteínas activadas se unen a sitios específicos en las microvellosidades de las células columnares del intestino del insecto. La interacción entre la toxina y su sitio de unión reversible, es un requisito para la toxicidad pero no es suficiente; por lo que hay una segunda unión, de tipo irreversible que se da a nivel de proteínas. Este último, determina la especificidad de las toxinas con sus receptores y produce la formación de un canal iónico o poro lítico en la membrana celular. El desbalance osmótico causado, genera la lisis celular que culmina con la destrucción total del epitelio intestinal. Una vez que las esporas de *Bt* tienen acceso a la hemolinfa ocasionan parálisis o incluso la muerte del insecto (Schnepf *et al.*, 1998).

Existen diversas cepas de *Bacillus thuringiensis* que expresan diferentes δ -endotoxinas, cada una de las cuales tiene su propio espectro de actividad contra diferentes tipos de insectos. La última clasificación de δ -endotoxinas fue hecha por Crickmore *et al.* (1998), quienes clasificaron más de 100 secuencias génicas de δ endotoxinas según la identidad de aminoácidos de las proteínas *cry*, los cuales codifican δ -endotoxinas con diferentes espectros de acción.

Dentro del grupo de δ -endotoxinas, se encuentran las proteínas *cry3Ca1* (Lambert *et al.*, 1992b) y *cry7Aa1* (Lambert *et al.*, 1992a). Estas son producidas como cristales romboidales y bipiramidales, respectivamente, presentando actividad contra insectos del orden Coleóptera. Estas proteínas fueron elegidas basándose en los resultados del estudio de Solera (2008), quien probó 7 proteínas *Bt* que tienen actividad insecticida contra dos especies africanas de gorgojo, *Cyllas puncticollis* y *C. brunneus*. Las proteínas Cry7Aa1 y Cry3Ca1 fueron efectivas contra ambas variedades de gorgojo con una dosis letal media (LC50) menor a 1 $\mu\text{g}/\text{gr}$ (Ekobu *et al.*, 2010).

La actividad de las toxinas *Bt* ha sido explotada en la agricultura y silvicultura por más de 30 años a través del uso de formulaciones microbianas en sprays. Numerosos biopesticidas se han desarrollado en base a distintas cepas de *Bt* y se utilizan para el control de determinadas plagas, particularmente en las producciones de tipo biológica (agricultura orgánica, ecológica, biológica) (Agbios, 2009)

Hasta la fecha se ha producido plantas transgénicas que expresan δ -endotoxinas optimizadas provenientes de diferentes cepas; entre estas se encuentran el algodón (Perlack *et al.*, 1990), tabaco, tomate (Perlack *et al.*, 1991), papa (Perlack *et al.*, 1993), maíz (Koziel *et al.*, 1993), soya (Stewart *et al.*, 1996) y arroz (Fujimoto *et al.*, 1993, Tang *et al.* 2006).

3.5 Cultivos con tecnología Bt

Desde 1996 se han plantado más de 200 millones de hectáreas de cultivos *Bt* en el mundo (James, 2009). La primera generación de cultivos *Bt* fue dominada por plantas que producían una única toxina contra larvas; en maíz se tenía la toxina *Bt* Cry1Ab y en algodón la toxina Cry1Ac, ambas altamente relacionadas.

A pesar de que los cultivos *Bt* de maíz y algodón de la primera generación aún persisten, se han registrado en Estados Unidos variedades de estos cultivos que producen

18 diferentes combinaciones de 11 toxinas *Bt*. Cada variedad produce de 1 a 6 toxinas *Bt* que confieren resistencia contra lepidópteros, gorgojos o ambos (Tabashnik *et al.*, 2009).

Pese a que existen plantas *Bt* (que expresan δ -endotoxinas) en algodón, tabaco, tomate, papa, maíz, soya y arroz, solo se cultivan comercialmente el algodón, maíz y papa *Bt*; siendo el algodón y maíz *Bt* el tercer y cuarto cultivo biotecnológico de mayor producción en el mundo, con 11.9 (9%) y 7.1 (6%) hectáreas de cultivo distribuidas en 10 y 16 países, respectivamente (James, 2009).

En India, China, Sud-Africa y Filipinas se ha incrementado el rendimiento en los campos de cultivo de maíz al utilizar la tecnología *Bt* en un 31%, 9.6%, 11% y 14-48%, respectivamente, disminuyendo la aplicación de insecticidas de 39% a 60%, con implicaciones positivas para el ambiente, la salud de los agricultores y la reducción de costos (James, 2009).

Los cultivos que expresan toxinas *Bt* representan, actualmente, el medio más sostenible de control de los gorgojos -considerando las condiciones y prácticas de cultivo africanas-. Hasta ahora, se han publicado numerosos artículos que confirman la seguridad de los cultivos *Bt* en la salud humana, el impacto positivo que tienen en el medio ambiente y su efectividad en controlar plagas específicas (Betz *et al.*, 2000; Shelton *et al.*, 2002; Ghislain *et al.*, 2003).

A pesar del éxito comercial de los cultivos *Bt* existe una preocupación generalizada de que se desarrolle resistencia en los insectos, ya que la expresión constitutiva de las toxinas *Bt* en plantas llevará en algún momento a la selección y multiplicación de los escasos insectos resistentes a la toxina *Bt*; sin embargo, hasta la fecha no se ha notificado el surgimiento de insectos resistentes a cultivos *Bt* como consecuencia directa de la introducción de plantas *Bt* en la agricultura comercial (Agbios, 2009).

Actualmente, se cuenta con planes de manejo de resistencia a insectos, entre ellas se encuentra la “estrategia de alta dosis/refugio” (Gould, 1998) y el uso de refugios (Shelton *et al.*, 2000). La EPA recomienda, que para asegurar un manejo de resistencia a largo plazo, es necesario implementar una estrategia de alta dosis/refugio estructurado.

El éxito de los cultivos *Bt* y la duración de sus beneficios dependerá del productor agropecuario, en medida que adopte y cumpla las estrategias y planes de manejo de resistencia a insectos (Agbios, 2009).

3.6 Expresión y cuantificación de proteínas Cry

Hasta la fecha se ha documentado la expresión de proteínas Cry en hojas y tubérculos de plantas transformadas con genes *cry* sintetizados, usando el promotor constitutivo CaMV35 y el marcador de selección del gen *nptII*. La expresión de proteínas se ha cuantificado mediante ELISA y DAS-ELISA, método cuantitativo, y por Western Blot, método semi-cuantitativo. En el primer caso se reportan los resultados como microgramo de proteína Cry por gramo de peso fresco de planta ($\mu\text{g/g}$) y en el segundo caso como el porcentaje de proteína Cry presente en el total de proteína soluble (%).

El evento MON 810 (gen *cryIAb*) reportó una expresión de la proteína Cry1 Ab de 8.20-10.51 $\mu\text{g/g}$ en hojas, 4.00-5.11 $\mu\text{g/g}$ en forraje y 0.35-0.60 $\mu\text{g/g}$ en los granos cosechados de maíz. Estos promedios se mantuvieron constantes en la generación siguiente y en los diferentes ambientes y años en los que se repitió el experimento (Agbios, 2009).

El evento MON 863 (gen *cry3Bb1*) así como sus híbridos, reportaron una expresión de 69.8 $\mu\text{g/g}$ y 44 $\mu\text{g/g}$ de la proteína Cry3Bb1 en los dos estadios de crecimiento de raíz en que fue analizada la expresión. Existiendo una tendencia a

disminuir la proteína Cry3Bb1 a medida que aumenta el crecimiento de las raíces en la planta, sin que esto haya afectado su actividad insecticida, ya que este gen optimizado expresa la proteína Cry3Bb1, contra *Diabrotica ssp*, con una actividad insecticida 8 veces mayor a la del gen original (Vaughn *et al.*, 2005).

En plantas de álamo (gen *cry3Aa*) que confieren resistencia contra *Chrysomela tremulae* se han reportado niveles de expresión de la proteína Cry3Aa de 0.05-0.0025% del total de proteína soluble presente en hojas. Estos valores confirieron una tasa de mortalidad del 100% (Génissel *et al.*, 2003)

Plantas de maíz que expresan 2 δ -endotoxinas (posteriormente identificadas como Cry34Ab1 y Cry35Ab1) confirieron niveles de protección, contra *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, mayores que los proveídos por insecticidas químicos. Las proteínas Cry34Ab1 y Cry35Ab1 reportaron una expresión de 0.03-0.2% y 0.05-0.1%; y de 0.02-0.1% y 0.4-0.9% en raíces y hojas, respectivamente, porcentaje calculado del total de proteína soluble presente en dichos órganos (Moellenbeck *et al.*, 2001).

En tubérculos de papa (gen *cry1Ac*) se ha cuantificado una expresión de 0.02-17 μ g de proteína Cry1Ac por gramo de tejido fresco. Siendo esta cantidad suficiente para causar la mortalidad del 100% en larvas de *Tecia solanivora* (Valderrama *et al.*, 2007)

Otra forma en que se ha reportado la presencia y expresión de proteínas Cry en plantas es mediante Northern Blot (Beuning *et al.*, 2001 y Génissel *et al.*, 2003) y qRT-PCR (Beuning *et al.*, 2001 y Valderrama *et al.*, 2007).

3.7 *Agrobacterium tumefaciens*

La inserción de nuevos genes y sus elementos reguladores puede ser realizada mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria, que induce la formación de

un tumor denominado “Agalla de la corona”, tiene la capacidad de integrar establemente parte de su ADN (referido como ADN-T de transferencia) en el genoma de la planta (Tzfira y Citovsky, 2000); permitiendo la transformación genética de plantas susceptibles con genes de importancia agronómica (Valderrama *et al.*, 2005).

El ADN-T está localizado en el plásmido Ti (Plásmido inductor de tumor) y codifica para las funciones de formación del tumor, metabolismo de opinas y para el proceso de transferencia del T-ADN a la planta. Este proceso es ayudado por la intervención de los genes *vir*, que se encuentran fuera del ADN-T, los cuales son necesarios para la transferencia e incorporación del fragmento de ADN en el genoma de la planta (Gelvin, 2003).

La manipulación del ADN-T plasmidico tiene como finalidad eliminar los genes no esenciales (genes que codifican para la síntesis de opinas y auxinas) y los genes que codifican el desarrollo del tumor; permitiendo que esta región pueda ser reemplazada por genes de interés sin afectar el proceso de transferencia (Valderrama *et al.*, 2005).

En el T-ADN se introducen el o los genes de interés que serán transferidos a la planta, un gen de resistencia o marcador, que permite la selección y crecimiento de las células que han incorporado los genes de interés, evitando el crecimiento de tejidos no transformados (Brasileiro *et al.*, 2001). Estos genes son colocados junto al borde izquierdo del ADN-T, de esta manera se asegura que la transferencia del gen de interés se de antes que la del gen marcador, dado que la transferencia del ADN-T ocurre primero por el borde derecho (Hellens *et al.*, 2000).

El conocimiento básico sobre el mecanismo de transferencia del ADN-T ha permitido el desarrollo de vectores para la introducción de genes foráneos en plantas cultivadas. Dentro de los vectores simples binarios se encuentran los vectores pCAMBIA, derivados de los vectores pPZP, que son de tamaño pequeño (7-12kb dependiendo el plásmido) y permiten una mayor manipulación *in vitro*. Presentan un

origen de replicación de alto número de copia, el replicón pVS1 para alta estabilidad en *Agrobacterium* y sitios de restricción diseñados por modificación de plásmidos modulares. Además, estos vectores contienen pequeños sitios de clonamiento múltiple para la introducción del ADN de interés (CAMBIA, 2010).

En la presente investigación se utilizaron las construcciones pCIP78 y pCIP79 insertados en el vector binario pCAMBIA2305.2 (Prentice, 2007). La construcción pCIP78 consta del gen quimérico *cry7Aa1* gobernado por un promotor y terminador del gen β -*amy* (Yoshida *et al.*, 1991) de β -amilasa, y la construcción pCIP79 consta del gen quimérico *cry3Ca1* gobernado por un promotor y terminador del gen *SPOA1* (Hattori y Nakamura, 1988) de esporamina. Ambos genes *cry* se encuentran al lado del gen de resistencia a kanamicina (*nptII*) en el T-ADN.

La importancia de utilizar promotores y terminadores de los genes *SPOA1* y β -*amy* radica en la procedencia natural de dichos genes en el genoma de camote, los cuales se expresan altamente en la raíz tuberosa del camote (Hattori y Nakamura, 1988). Además, debido a que estos promotores son inducibles por herida, podrían ser activados al momento del ataque del gorgojo.

3.8 Regeneración *in vitro*

La inserción de genes de interés mediante la transformación con *Agrobacterium* tiene como finalidad la obtención de plantas con características específicas, siendo necesario establecer una adecuada estrategia de regeneración *in vitro*. Entre los sistemas de regeneración de plantas más utilizados se encuentran la regeneración vía embriogénesis somática, cultivo de protoplastos y organogénesis (Sihachakr *et al.*, 1997).

La organogénesis induce la formación de centros meristemáticos, dando lugar a primordios radiculares o caulinares, dependiendo del estímulo de las fitohormonas exógenas y la capacidad del tejido de responder a la presencia de las mismas. Puede

ocurrir de manera directa o indirecta, es decir sin la presencia de la fase callosa previa a la regeneración, o con ella, respectivamente (Lítz y Jarret, 1991).

La organogénesis indirecta es el sistema de regeneración más utilizado para fines de modificación genética, debido a que la formación de callos permite la selección de células y, posteriormente, la obtención de plantas genéticamente modificadas. Sin embargo, el sistema de regeneración indirecto tiene la desventaja de presentar una mayor tendencia de sufrir variación somaclonal, por este motivo se recomienda contar con un buen sistema de selección de los regenerantes estables. La organogénesis indirecta se prefiere por razones prácticas de disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad, baja contaminación con microorganismos y rápida respuesta *in vitro* (Lítz y Jarret, 1991).

En camote la frecuencia de regeneración es a menudo genotipo dependiente. Particularmente, los cultivares africanos poseen un bajo y variable porcentaje de regeneración, entre 1 a 20% (Ormachea, 2008; Blasco, 2007). Sin embargo, se han reportado regeneraciones exitosas en el cultivar Jewel (Carswell & Locy, 1984; Medina, 1991; Porobo Dessai *et al.*, 1995; Gosukonda *et al.*, 1995a, 1995b; García *et al.*, 1999) y además, una alta eficiencia de transformación (20%) al emplear el método de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y un protocolo de regeneración vía organogénesis de dos fases (Luo *et al.*, 2006)

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Centro Internacional de la Papa (CIP), en los laboratorios de Cultivo de Tejidos *in vitro*, Laboratorio de Biotecnología Aplicada y el invernadero de Bioseguridad.

4.2 Materiales

4.2.1 Material vegetal

En la investigación se utilizó plantas de camote *Ipomoea batatas* cv. Jewel provenientes del Banco de Germoplasma *in vitro* del CIP, código CIP 440031. Las plantas fueron proveídas en magentas plásticas.

4.2.2 Material bacteriano

Se utilizaron las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* AT126, que porta al plásmido pCIP78 (Figura 1), y la cepa AT127, que porta el plásmido pCIP79 (Figura 2). Ambos constructos se utilizaron para la transformación genética de camote.

Las cepas de *Escherichia coli* EC105 y EC106 que también portan los constructos pCIP78 y pCIP79, respectivamente, se emplearon para extraer los plásmidos de interés.

Estas cepas se encuentran criopreservadas a -70°C y forman parte de la colección de bacterias del Laboratorio de Biología Molecular del CIP (Tabla 1).

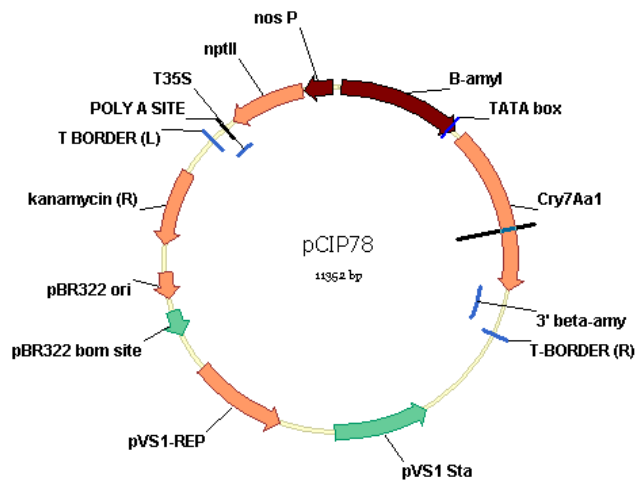


Figura 1. La construcción pCIP78 está formada por el vector binario pCAMBIA2305.2 que porta en su ADN-T el gen quimérico *cry7Aa1* (4967pb), que expresa la toxina Cry7Aa1 (66.22kDa), gobernado por un promotor y terminador del gen β -*amy* de β -amilasa y el gen *npt II* de resistencia a kanamicina como marcador de selección.

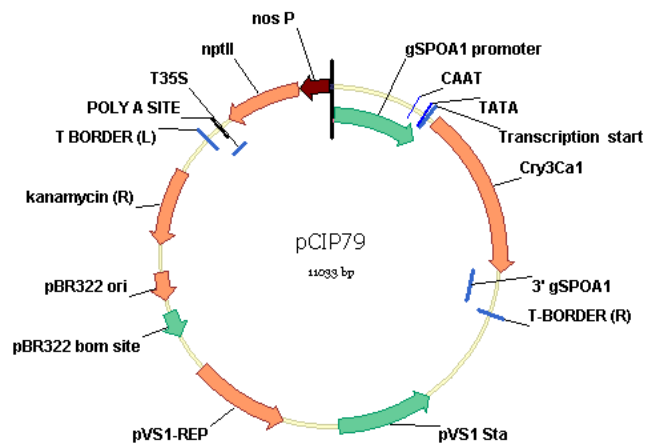


Figura 2. La construcción pCIP79 está formada por el vector binario pCAMBIA2305.2 que porta en su ADN-T el gen quimérico *cry3Ca1* (4919pb), que expresa la toxina Cry3Ca1 (66.08kDa), gobernado por un promotor y terminador del gen *SPOA1* de esporamina y el gen *npt II* de resistencia a kanamicina como marcador de selección.

4.3 Métodos

4.3.1 Cultivo de bacterias

Las bacterias fueron repicadas en placas Petri plásticas (100x15mm, ACB) que contenían 25 ml del medio semi-sólido Luria Bertani (LB Agar, INVITROGEN) suplementado con 100 mg/l de Kanamicina. Las placas sembradas fueron incubadas en la estufa (Gravity convection incubador, PRECISION SCIENTIFIC) a 28°C por 48 horas en el caso de *A. tumefaciens* y a 37°C por 24 horas en el caso de *E. coli*.

4.3.2 Extracción de ADN plasmídico

Se aisló una colonia bacteriana de *E. coli* y se inoculó en un tubo con 5 ml de medio LB líquido suplementado con 100 mg/l de kanamicina. La bacterias se incubaron a 37°C por 24 horas en agitación constante a 250 rpm.

La extracción de ADN plasmídico se realizó utilizando el kit SV Minipreps DNA Purification System Wizard® Plus– PROMEGA. Para lo cual, se centrifugó 2ml de cultivo bacteriano a 13,200 rpm (Centrifuge 5415D, EPPENDORF) durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 250µl de la solución de resuspensión celular, se añadió 250µl de solución de lisis celular, se mezcló por inversión, se añadió 10µl de solución de proteasa alcalina, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego, se añadió 350µl de solución de neutralización, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13,200 rpm por 10 minutos.

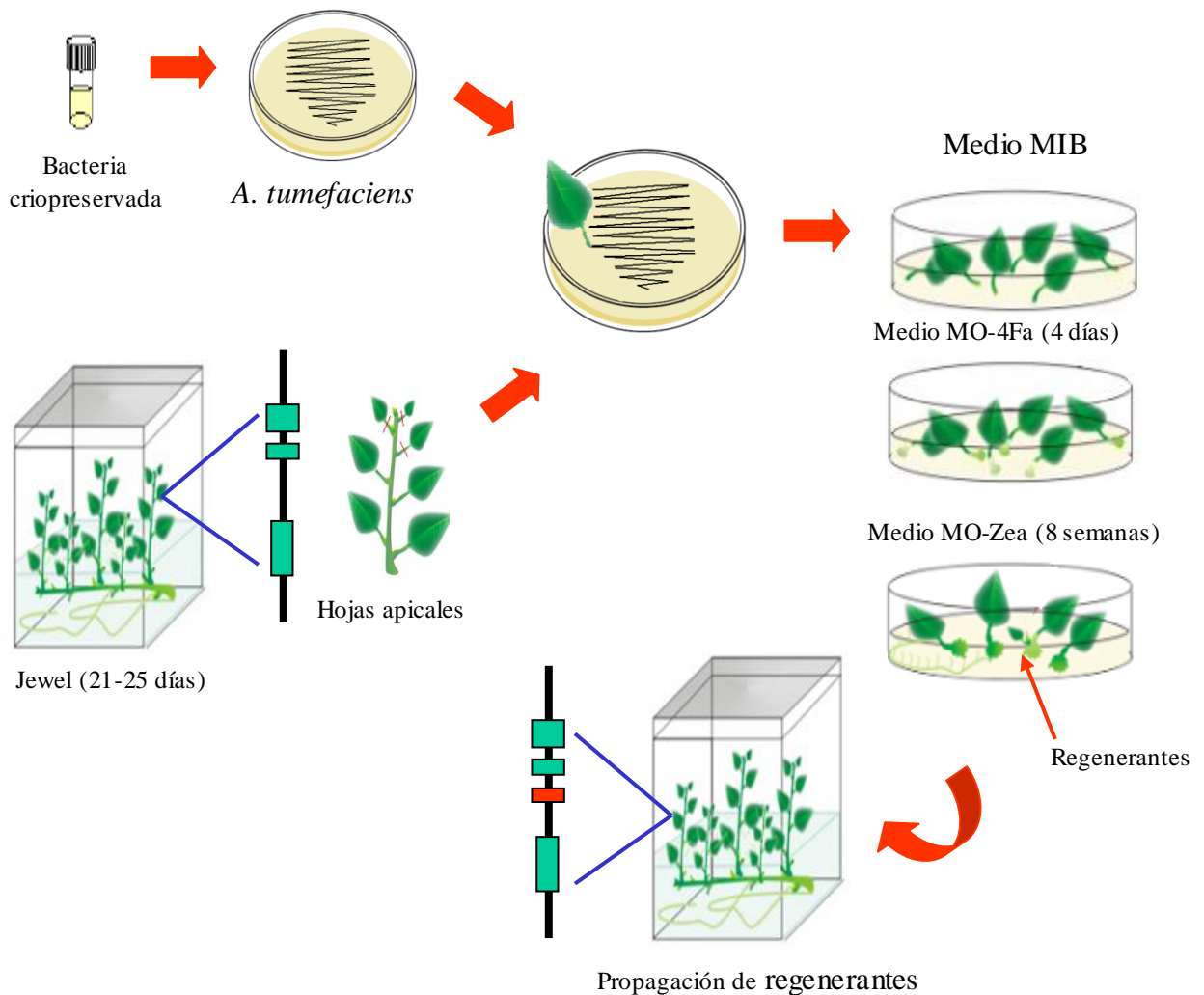
Se decantó el sobrenadante en la columna, que está dentro del tubo de colección, y se centrifugó a 13,200 rpm por 1 minuto, se descartó el líquido del tubo de colección y se reinsertó la columna. Luego, se añadió 750µl de la solución de lavado, se centrifugó a 13,200 rpm por 2 minutos, se descartó el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

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

4.3.3 Transformación genética del cultivar de camote “Jewel”

Las plantas *in vitro* de Jewel se transformaron siguiendo el protocolo de Luo *et al.*, 2006 con ciertas modificaciones hechas *per se* (Figura 3).

Figura 3. Esquema de transformación genética *in vitro* de camote “Jewel”



Los explantes (hojas con peciolo) se obtuvieron a partir de plantas propagadas en magentas plásticas (Phytatray II, SIGMA) con 21 a 25 días de cultivo en medio líquido MPB (Tabla 2) suplementado con MPB store (Tabla 3). Las magentas se mantuvieron a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas luz a 3000 lux (40 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg}$).

Las hojas con peciolo, cortadas con bisturí SMIC N°10, se pusieron en contacto con la bacteria *A. tumefaciens*, previamente sembrada, y luego se transfirieron a placas Petri con medio MIB (Tabla 4), permaneciendo en oscuridad hasta el día siguiente. Se utilizaron la mayor cantidad de hojas posibles, colocándolas en el medio MIB a razón de 40-60 hojas por placa.

Posteriormente, cada 10 explantes fueron transferidos a placas Petri con medio MO-4FA (Tabla 5), medio de inducción de formación de callos, por un periodo de 4 días y luego al medio MO-Zea (Tabla 6), medio de regeneración, donde se mantuvieron en cultivo por 2 meses, renovando el medio de cultivo cada 15 días.

Entre la cuarta y sexta semana de cultivo en el medio de regeneración se observó la presencia de regenerantes. Los brotes fueron cortados y transferidos a tubos de vidrio de 18 x150 mm, conteniendo 5 ml del medio MPB semisólido (medio MPB con 2 g/l de Gelrite) suplementado con 200mg/l de Timentin y 300mg/l de Carbanicilina, incubándose bajo las condiciones de propagación antes descritas por un periodo de 2 meses, con cambios periódicos de medio cada 30 días, con la finalidad de eliminar las bacterias de *Agrobacterium tumefaciens* que hubiese podido sobrevivir. Los regenerantes obtenidos a partir de plantas transformadas con el gen *cry7Aa1* se identificaron con números arábigos y los obtenidos a partir de plantas transformadas con el gen *cry3Ca1* con números romanos.

La eficiencia de regeneración (ER) y transformación (ET) se evaluará utilizando el Test de Proporciones RGui, el cual permitirá comparar estadísticamente las eficiencias

de regeneración y transformación de cada construcción, respectivamente. La ER se calculará dividiendo el número de explantes que regeneran brotes entre el número total de explantes transformados, multiplicando el resultado por 100; mientras que la ET se calculará dividiendo el número de regenerantes que son transgénicos entre el número total de regenerantes obtenidos, multiplicando el resultado por 100.

4.3.4 Determinación de la incorporación del transgén

A.- Prueba de Resistencia a kanamicina

La manera indirecta de medir la expresión del gen, es mediante la prueba de resistencia a kanamicina. En esta prueba se utilizaron 6 hojas del tercio superior de la planta putativamente transgénica y de la planta control (planta no transgénica). Se colocaron 3 hojas del evento “transgénico” y de la planta control en placas Petri que contenían medio 303 (Tabla 7) suplementado con 100mg/l de kanamicina (303+*Km*) y de la misma forma, las hojas restantes, en placas Petri con el medio 303 sin kanamicina (303 control).

A las cuatro semanas se evaluó la formación de callos en los medios 303+*Km* y 303 control. Las plantas “putativamente transgénicas” que formaban callo en el medio 303+*Km* (eventos *Km* positivas) se propagaron en magentas plásticas con medio MPB líquido.

B.- Extracción de ADN de plantas

Se realizó la extracción de ADN vegetal a pequeña escala en las líneas *Km* positivas siguiendo el protocolo descrito por Ñopo *et al.* (2005). Posteriormente, se verificó la calidad de la extracción de ADN de las muestras corriendo un gel de agarosa al 1% (Tabla 8), usando como marcador de peso de bandas el fago *Lambda*.

Para la extracción de ADN genómico de plantas se colocó un disco de hoja, del tercio superior de la planta, de 1cm de diámetro (aprox. 25 mg) en un tubo Eppendorf de 1.5ml con 1 perla de cerámica estéril, se añadió 450 µl del buffer de extracción CTAB 2X (Tabla 9) + 2-mercaptoetanol (2µl de β-mercaptoetanol por cada 700µl de CTAB 2X), se colocó los tubos en el Savant Fast Prep Grinder y se molió el contenido por 20 segundos.

Luego, se incubó a 65°C en baño maria por 30 minutos -moviendo cada 10 minutos-, se enfriaron las muestras a temperatura ambiente por 5 minutos, se añadió 900µl de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1), se homogenizó el contenido por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos.

Seguidamente, se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio de 1.5 ml, se añadió 0.6 volúmenes de isopropanol a -20°C, se mezcló por inversión y se dejó precipitar el ADN colocando los tubos a -20°C por 20 minutos o a -70°C por 10 minutos. Luego, se centrifugó a 14,000 rpm por 20 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por 5 minutos colocando el tubo invertido sobre papel toalla.

Posteriormente, se lavó el pellet con 1ml de etanol (95%), se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos, se descartó el etanol y se dejó secar el pellet colocando el tubo invertido sobre papel toalla por 5 minutos o se utilizó un sistema de secado al vacío. Finalmente, se disolvió el pellet en 30µl de agua libre de nucleasas, se añadió 1µl de 10 mg/ml RNAsa, se mezcló por inversión y se incubó a 37°C por 1 hora. Las muestras se almacenaron a -20°C.

C.- Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADN de las plantas “putativamente transgénicas” fue analizado mediante la prueba de PCR. Los iniciadores utilizados (Tabla 10) fueron diseñados a partir de la secuencia del gen insertado utilizando el programa informático Vector NTI-11 (Informas, Inc.).

Tabla 10. Secuencia de iniciadores para la amplificación por PCR de la región del transgén de los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1*

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño de amplificado
<i>cry3Ca1</i>	Sentido	5' CACCTATAGTAAAACCATTGGACAC 3'	530 pb
	Antisentido	5' TGCATGAAAGCCTTAAAGAGG 3'	
<i>cry7Aa1</i>	Sentido	5' ACAACTCATCACCATACCAAAC 3'	608 pb
	Antisentido	5' AAGAGCAAAGATGCAAAGTTTG 3'	

Adicionalmente, se verificó que no hubiese contaminación por *A. tumefaciens* en las plantas putativamente transgénicas mantenidas en condiciones *in vitro* y en el invernadero de bioseguridad utilizando los primers diseñados por Haas *et al*, (1995), los cuales amplifican parte de la secuencia del gen bacteriano *virD2* (Tabla 11).

Tabla 11. Secuencia de iniciadores para la amplificación por PCR de la región del gen bacteriano *virD2*

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño de amplificado
<i>VirD2</i>	Sentido	5' ATGCCGATCGAGCTCAAGT 3'	338 pb
	Antisentido	5' CCTGACCCAAACATCTCGGCT 3'	

La mezcla de reacción para la amplificación por PCR (Tabla 12) se dispuso en los tubos para PCR (TempAssure PCR 8-tube strip, natural – USA SCIENTIFIC).

Tabla 12. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR (Master mix)

Componente	Volumen (1 Rxl)
Agua libre de nucleasas (NFW)	2.4 μ l
PCR buffer (10x)	1 μ l
MgCl ₂ (25mM)	1 μ l
dNTPs (5 mM)	0.4 μ l
Iniciadores sentido (5 μ M)	2 μ l
Iniciadores antisentido (5 μ M)	2 μ l
Taq polimerasa 5 U/ μ l	0.2 μ l
ADN molde (\leq 10 ng)	1 μ l
Volumen final	10 μ l

Después de sellar los tubos y homogenizar la reacción, se programaron (Tabla 13) las siguientes condiciones de amplificación en el termociclador (Multigene thermocycler, LABNET INTERNATIONAL INC):

Tabla 13. Programa de PCR para los genes *cry3Ca1*, *cry7Aa1* y *virD2*

Ciclos de amplificación	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94°C	2'	1
Denaturación	94°C	30''	34
Hibridación	°C *	30''	
Extensión	72°C	30''	
Extensión final	72°C	10'	1

* La temperatura de hibridación fue de 58°C para los primers que amplifican los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1*; y de 56°C para los que amplifican el gen *virD2*.

4.3.5.- Expresión del transgén

Para detectar y cuantificar la expresión, en plantas, de las toxinas Cry3Ca1 (Figura 4) y Cry7Aa1 (Figura 5), ambas con 66kDa, se usaron las siguientes técnicas de inmunoensayo: NCM-ELISA, Western Blot y DAS-ELISA; mientras que para determinar la expresión del transcrito (ARNm) se realizó la prueba molecular de qRT-PCR.

Figura 4. Toxina Cry3Ca1

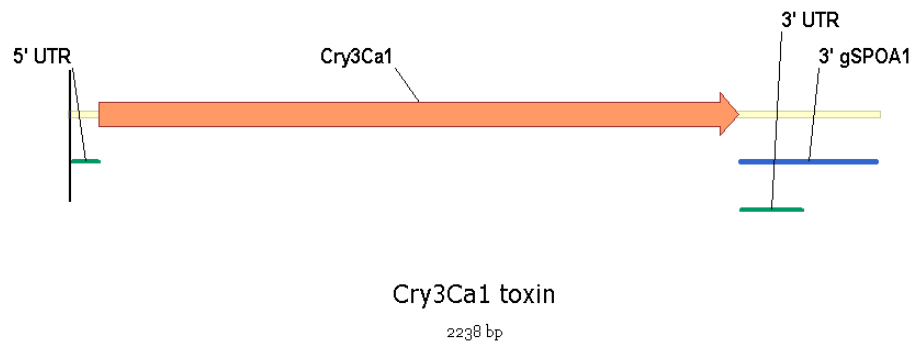
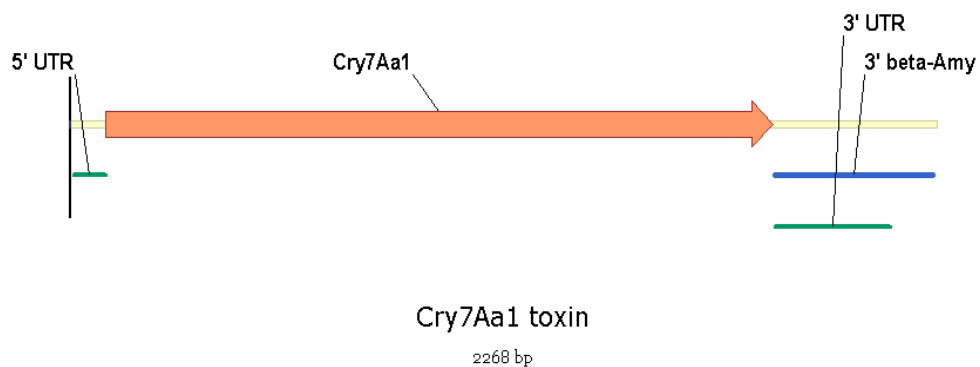


Figura 5. Toxina Cry7Aa1



Técnicas de inmunoensayo

Los antígenos, protoxinas purificadas, Cry3Ca1 (73kDa) y Cry7Aa1 (129kDa) fueron donados por el Departamento de Entomología y Patología de Plantas de la Universidad de Auburn, Alabama - Estados Unidos.

Los anticuerpos se obtuvieron del suero de conejos de 6 meses de edad inoculados, intradérmica e intramuscularmente, con la protoxina; siguiendo el protocolo descrito por Harlow & Lane (1988).

D.- NCM-ELISA en hojas de eventos transgénicos

El suero obtenido se utilizó para hacer la prueba de NCM-ELISA con la finalidad de verificar la sensibilidad y especificidad de detección de la proteína pura y de la proteína en hoja, en plantas PCR positivas -para los genes *cry*- que son mantenidas en el invernadero de bioseguridad, siguiendo el protocolo descrito por Salazar & Jayashinge (1997).

Se colectó una hoja del tercio superior (0.5-1g) en bolsas de polietileno 4x6x6; las cuales fueron trituradas, con ayuda de un tubo de ensayo, en 4ml de buffer de extracción (TBS+0.2% de sulfito de sodio). Luego, las bolsas se dejaron reposar en posición vertical por 30 minutos a temperatura ambiente.

En paralelo una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot® Transfer Medium 0.45µm-BIORAD) fue pre-humedecida con TBS pH 7.5 (Tabla 14) por 5 minutos. Posteriormente, se agregó 30µl de la muestra (savia de la planta) en cada concavidad formada en la membrana de nitrocelulosa. Se dejó secar por 15 a 30 minutos.

Luego, se sumergió la membrana de nitrocelulosa en la solución de bloqueo (TBS+ 2% de leche en polvo + 2% de TRITON X-100) por una hora a temperatura

ambiente con un movimiento suave (50 rpm). Posteriormente, se enjuagó la membrana con TBS.

Se añadió el primer anticuerpo (1:1000) en un buffer de absorción de anticuerpos inespecíficos (Tabla 15) y se dejó incubar por 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se añadió este buffer sobre la membrana de nitrocelulosa y se dejó incubar durante toda la noche a temperatura ambiente con un movimiento suave (50 rpm). Después, se lavó la membrana con T-TBS (Tabla 16) 4 veces, 3 minutos por cada vez con un movimiento rápido (100rpm).

Se añadió el segundo anticuerpo GAR 1:1000 (Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) – AP Conjugated – BIORAD) en TBS + 2% de leche en polvo. Se incubó por una hora a temperatura ambiente con un movimiento suave (50 rpm). Luego, se lavó la membrana con T-TBS 4 veces, 3 minutos por cada vez con un movimiento rápido (100 rpm).

Finalmente, se agregó la solución sustrato NBT/BCIP (BCIP/NBT Kit - ZYMED LABORATORIES INC.) y se dejó incubar a temperatura ambiente por 5-15 minutos con un movimiento suave (50 rpm).

E.- Western Blot en hojas de eventos transgénicos

La prueba de Western Blot se realizó siguiendo el protocolo descrito por Ñopo *et al.* (2005). Se usaron hojas del tercio superior de los eventos transgénicos mantenidos en invernadero y diluciones de proteína purificada, como controles.

Las hojas (400-600 mg) se molieron con nitrógeno líquido y se hicieron reposar en un tubo Eppendorf con 500µl de Buffer de extracción (Tabla 17) por 10 minutos en frío. Luego, se centrifugó a 13,200 rpm por 15 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo Eppendorf. Finalmente, se mezcló la proteína 3:1 con el Laemli buffer (Tabla 18) y se hirvió a 95°C por 10 minutos. En el caso de la proteína purificada, sólo se agregó

el Laemli buffer y se procedió a la denaturación. Se cargó 80 µl de cada muestra en un gel de acrilamida (Tabla 19) y el resto se almacenó a -20°C, se usó como patrón de peso de bandas de proteínas el marcador SeeBlue® Plus Pre-Stained Standard – INVITROGEN.

Para realizar la transferencia se remojó el gel en un buffer de transferencia 1X (Tabla 20) por 10 minutos. Paralelamente, se cortó una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot® Transfer Medium 0.45 µm – BIORAD) y dos piezas de papel Whatman (Hybond™ Blotting Paper – AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) y se remojaron en buffer de transferencia 1X.

Se armó la estructura de transferencia empezando por el lado plomo del sostenedor, respetando el siguiente orden: esponja, papel Whatman, gel de acrilamida, membrana de nitrocelulosa, papel Whatman y esponja. Se introdujo el sostenedor en un aparato Trans-Blot (BIORAD) colocando el lado plomo cerca al electrodo negativo, se agregó el buffer de corrida 1X (Tabla 21) y se corrió a un voltaje de 60-70 V hasta el término de corrida en el gel superior (4%), para luego pasar a un voltaje constante de 100V. Finalmente, se desarmó el Trans-blot y se dejó secar la membrana para hacer NCM-ELISA.

F.- DAS-ELISA en hojas y raíces tuberosas de eventos transgénicos

Los anticuerpos Cry3Ca1 y Cry7Aa1 se purificaron y conjugaron, a partir del suero crudo de conejo, siguiendo el protocolo de Salazar & Jayashinge (1997).

Para la *purificación de inmunoglobulinas (IgG)* se colocó 1 ml de suero crudo y 9 ml de agua destilada en un tubo Falcon de 50 ml, se mezcló por inversión y se agregó gota a gota 10 ml de sulfato de amonio saturado. Se dejó reposar por 45 minutos a temperatura ambiente. Luego, se precipitaron las proteínas a 13,000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de buffer de diálisis

(Tabla 22). Las muestras resuspendidas se dispensaron en membranas de diálisis (Spectra/Por® molecular porous membrane tubing 10mm – FISHER SCIENTIFIC) y permanecieron en el buffer PBS pH 7.4 (Tabla 23) toda la noche a 4 °C, se cambió el buffer 4 veces. Finalmente, se almacenó las IgG purificadas en viales (previamente tratados con silicona) a -20°C. La concentración de IgG se determinó por espectrofotometría usando una longitud de onda de 280 nm.

Para la *conjugación de inmunoglobulinas (IgG)*, se mezcló 1 ml de IgG (1mg/ml) con 1250 unidades de alcalina fosfatasa (Phosphatase, Alkaline – SIGMA), se añadió 2.6 µl de Glutaraldehído 25% (Glutaraldehyde – SIGMA) y se mezcló por inversión evitando las burbujas. Se dejó reposar por 3 horas a temperatura ambiente. Luego, se dializó a 4 °C en PBS pH 7.4 toda la noche, cambiando el buffer 4 veces.

Finalmente, se colocaron las muestras de IgG conjugadas en viales, previamente tratados con silicona, y se añadió 5mg de BSA (Bovine Serum albumin globulin-free – BIOLABS). Las IgG conjugadas se almacenaron a -20°C.

En las primeras pruebas de DAS-ELISA se utilizaron diferentes diluciones de la proteína purificada (200, 100, 50, 25, 10, 5, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 ng/100 µl) y de las inmunoglobulinas (IgG) purificadas y conjugadas (1:100, 1:250, 1:500, 1:100, 1:1500), con la finalidad de determinar la sensibilidad y especificidad de detección de los anticuerpos Cry3Ca1 y Cry7Aa1.

Luego, de estandarizar las concentraciones de proteína purificada así como las diluciones de IgG adecuadas para cada anticuerpo, se realizaron las pruebas de DAS-ELISA en hojas y raíces tuberosas. Debido a que cada concentración de proteína purificada tiene un rango de absorbancia diferente (curva estándar), se pudo estimar la concentración de proteína Cry en plantas intrapolando el valor de absorbancia del evento de interés entre el mínimo y máximo valor de la curva estándar (Meiyalaghan *et al.*, 2006).

Las placas de ELISA se sensibilizaron con la mezcla de 100µl de IgG en 10ml de Buffer de cobertura (1:100) (Tabla 24), se añadió 100µl de este buffer por pocillo, se cubrió la placa con masking tape y se dejó incubar por 3 horas a 37°C. Luego, se lavaron las placas con PBS-T 1X (PBS 1X + 0.05% de Tween-20), 3 veces por 3 minutos cada vez. Se almacenaron las placas a -20°C.

Las hojas del tercio superior fueron colectadas en una bolsa de polietileno 4x6x6. Se trituraron, con ayuda de un tubo de ensayo, de 0.5-1 g de hoja en 12ml de buffer de maceración (Tabla 25). Se tomaron 100µl de cada muestra, con tips de puntas cortadas, colocando cada muestra por triplicado en la placa previamente sensibilizada. Se cubrió con masking tape y se dejó incubar a -4°C toda la noche. Luego, se lavaron las placas con PBS-T 1X, 3 veces por 3 minutos cada vez. Por placa se consideró de 8 a 10 diluciones del control positivo (C+) y 2 tipos de controles negativos, el macerado (buffer + hoja) de la planta sin transformar (C-) y el buffer de maceración (BM).

Se agregó el buffer de conjugado (Tabla 26) 1:100, se añadió 100µl de este buffer por pocillo, se cubrió la placa con masking tape y se dejó incubar por 3 horas a 37°C. Luego, se lavaron las placas con PBS-T 1X, 3 veces por 3 minutos cada vez. Finalmente, se agregó el kit de revelado (Alkaline Phosphatase Substrate Kit – BIORAD) y las placas permanecieron con este buffer por 5-30 minutos, placas con anticuerpo Cry7Aa1, y de 30 a 90 minutos, placas con anticuerpo Cry3Ca1. La absorbancia (A_{260}) se midió con un espectrofotómetro una vez añadido el buffer, a los 15, 30, 45, 60 y 90 minutos, según sea el caso. La absorbancia del C- se restó de las absorbancias de los eventos en estudio, mientras que la absorbancia del BM se restó de las absorbancias de las diluciones del C+.

En el caso de las raíces tuberosas, sólo varió el protocolo de extracción de proteína, se pesó 100mg de tejido (cáscara o pulpa) almacenado a -70°C y se molió con nitrógeno líquido. Por cada 100mg de tejido pulverizado se agregó 1 ml de buffer Laemli (0.125M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glicerol y 5% de β-mercaptoetanol), con excepción del azul de bromofenol. Las muestras se mezclaron por inversión, se incubaron

por 10 minutos a 70°C y se centrifugaron por 10 minutos a 13,000 rpm a 4°C. Luego, el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf limpio y se almacenó a -20°C. El protocolo de DAS-ELISA utilizado fue el mismo que en el caso de hojas.

Para evaluar que la variación en la expresión de las proteínas Cry, en hojas y raíces tuberosas, entre las diferentes líneas transgénicas es el resultado del análisis de poblaciones diferentes y que al menos una línea tiende a dar valores diferentes, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis en el Programa estadístico R-Gui.

Prueba molecular de PCR en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR)

El qRT-PCR se iniciará con la extracción de ARN de hojas y raíces tuberosas de líneas PCR positivas. A partir del ARNm obtenido se hará la síntesis de ADN complementario (ADNc), el cual se usará como molde de ADN para realizar el análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR), donde será cuantificado el número de veces que se expresa el transcrito.

G.- Extracción de Acido Ribonucleico (ARN) de hojas de invernadero

Antes iniciar la extracción se lavaron los morteros, pilones y paletas con agua y detergente, se enjuagaron con agua DEPC 1X (Tabla 27) por 4 horas y se autoclavaron envueltos en papel toalla.

Las soluciones utilizadas para la extracción y corrida electroforética del ARN, se prepararon utilizando agua DEPC.

Para la extracción de ARN se molió 0.1 g de tejido vegetal con nitrógeno líquido, se transfirió el pulverizado en un tubo Eppendorf de 2 ml conteniendo 1.2 ml de Trizol (Trizol® Reagent - INVITROGEN), se mezcló por inversión 20 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.

Luego, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos a 4°C, se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio, se añadió 0.2ml de cloroformo frío (-20°C) por cada 1 ml de Trizol (0.24 ml), se mezcló por inversión 20 segundos y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio de 1.5ml y se añadió 0.5ml de Isopropanol por cada 1ml de Trizol (0.6ml), se mezcló por inversión 15 segundos y se incubó a -20°C por una hora o a -70°C por 30 minutos; se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por 5 minutos (invirtiendo el tubo en papel toalla).

Posteriormente, se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó a 10,000 rpm por 7.5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente, el pellet se disolvió en 50-100 µl de agua DEPC.

Las muestras (5µl de formamida + 3µl de agua DEPC + 2µl de ARN), que se incubaron a 65°C por 15 minutos y luego un minuto en hielo, se corrieron en un gel de agarosa 2% (Tabla 28). El gel se colocó en la cámara electroforética, la cual contenía 700 ml de buffer TBE 1X-DEPC (Tabla 29), se cargaron las muestras y se dejó correr por 30 minutos a 70V, usando como marcador de peso de bandas el fago Lambda.

Las muestras de ARN extraídas se trataron con el Kit de DNAsa - AMBION. Se añadió 0.1 volúmenes del buffer 10X Turbo Dnase-turbo DNA free, se mezcló por inversión, y 1 µl de Turbo Dnase-turbo DNA free, se mezcló por inversión y se incubó a 37°C por 30 minutos. Luego, se añadió 0.1 volúmenes de buffer de inactivación de DNAsa, se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente -mezclando 3 veces durante este tiempo- y se centrifugó a 10,000 rpm por 1.5 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se almacenó a -70°C.

Finalmente, se midió la concentración de ARN usando el espectrofotómetro con una longitud de onda de 260nm. La concentración (ng/μl) se calculó multiplicando la absorbancia (A_{260}) por el factor de dilución (100) por (40 μg/ml)*

* En una longitud de onda de 260 nm, una unidad de absorbancia de ARN es igual a 40 μg/ml

H.- Síntesis de ADNc

Para la síntesis de ADNc se utilizó la retrotranscriptasa SuperScript™ III del Kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis for RT-PCR – INVITROGEN.

En el primer paso, para la producción del ADNc se agregó en un tubo de PCR de 0.2-0.5 ml los siguientes compuestos (Mezcla 1):

Tabla 30. Mix inicial (ARN+iniciadores) para la síntesis de ADNc (Mezcla 1)

Compuesto	Volumen
ARN (> 5 μg)	8 μl
Hexameros random primers (50 ng/μl)	1 μl
dNTP (10mM)	1 μl
Volumen final	10 μl

Estas muestras se incubaron a 65 °C por 5 minutos y luego en hielo por 1 minuto.

Paralelamente se preparó el mix para la síntesis del ADNc (Mezcla 2):

Tabla 31. Mix para la síntesis de ADNc (Mezcla 2)

Compuesto	Volumen (1Rx)
Buffer 10X RT	2 μl
MgCl ₂ (25mM)	4 μl
DTT (0.1 M)	2 μl
RNase Out (40 U/μl)	1 μl
SuperScript III RT (200 U/μl)	1 μl
Volumen final	10 μl

Se agregó 10µl de la mezcla para la síntesis del ADNc (mezcla 2) a cada muestra de ARN (mezcla 1); se incubó por 10 minutos a 25°C, luego 50 minutos a 50°C y finalmente, 5 minutos a 85°C. Por ultimo, se agregó 1µl de RNAsa H a cada tubo y se incubó por 20 minutos a 37°C.

I.- PCR en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR)

Para la prueba de qRT-PCR se empleó el kit iQTM SYBR® Green Supermix – BIORAD. Se utilizaron iniciadores que amplifican la región codificante (ARNm) de las muestras *Cry3Ca1* y *Cry7Aa1*, así como iniciadores que amplifican el gen citocromo oxidasa (COX), gen endógeno de la planta (Cuellar *et al.*, 2006).

Tabla 32. Secuencia de iniciadores para la amplificación por qRT-PCR de la región del transgén de los genes *cry3Ca1*, *cry7Aa1* y el gen *COX*

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño de amplificado
<i>cry3Ca1</i>	Sentido	5' TTGTTCTTGCCTACCTATGC 3'	197 pb
	Antisentido	5' CTCCTCTCAACTTGTCCAAT 3'	
<i>cry7Aa1</i>	Sentido	5' ACACAGTCGTGTCAGTCACAGGAGC 3'	156 pb
	Antisentido	5' CGATCAAAGCCTCCACTTCTGTCA 3'	
<i>COX</i>	Sentido	5'CGTCGCATTCCAGATTATCCA3'	96 pb
	Antisentido	5'CAACTACGGATATATAAGAGCCAAAAGT3'	

Los siguientes reactivos fueron utilizados en la prueba de qRT-PCR:

Tabla 33. Mix para el qRT-PCR

Compuesto	Volumen (1Rx)
IQ SYBR Green Supermix (1X)	5 µl
Agua (DEPC) estéril	3 µl
Iniciador sentido (5 µM)	0.5 µl
Iniciador antisentido (5 µM)	0.5 µl
ADNc	1 µl
Volumen final	10 µl

El programa utilizado en el equipo de Real Time (Opticon Monitor 3) fue el siguiente:

Tabla 34. Programa de qRT-PCR para los genes *cry3Ca1*, *cry7Aa1* y *virD2*

Ciclos de amplificación	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94°C	2'	1
Denaturación	94°C	15''	
Hibridación	57°C	20''	29
Extensión	60°C	20''	
Lectura de la placa	82°C	1''	
Extensión final	72°C	10'	1

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Relative Expresión Software Tool – REST, version 2008 (Corbett Research & M.Pfaffl).

V. RESULTADOS

5.1 Transformación genética del cv. de camote “Jewel”

Se transformaron 8272 explantes (hojas apicales) de “Jewel” con el gen *cry7Aa1* y 5166 con el gen *cry3Ca1*, de los cuales -luego del proceso de transformación- sobrevivieron 7083 y 4212 explantes, respectivamente. Se obtuvieron 34 (0.48%) y 19 (0.45%) regenerantes -entre viables, amorfos y contaminados- transformados con los genes *cry7Aa1* y *cry3Ca1*, respectivamente. La situación *in vitro* de los regenerantes fue la siguiente:

Tabla 35. Situación *in vitro* de los regenerantes obtenidos

Genes	Regenerantes			Total
	Viables	Amorfos	Contaminados	
<i>cry7Aa1</i>	18 (52.9%)	3 (8.9%)	13 (38.2%)	34
<i>cry3Ca1</i>	11 (57.9%)	1 (5.3%)	7 (36.8%)	19

La eficiencia de regeneración (ER), número de regenerantes obtenidos a partir del total de explantes transformados por cien, fue similar en ambas construcciones con un *p-value*: 0.94, no habiendo indicios de que la diferencia en los porcentajes de regeneración sea constructo dependiente. Del mismo modo, no se encontraron diferencias significativas (*p-value*: 0.9524) entre el porcentaje de regenerantes viables obtenidos y el constructo de transformación. La ER del control negativo (explantes de Jewel sin transformar) fue del 47%.

La eficiencia de transformación (ET), número de eventos transgénicos estables obtenidos a partir del total de explantes transformados por cien, fue bastante baja para ambos constructos. Las plantas transformadas con los genes *cry7Aa1* y *cry3Ca1* tuvieron

una ET de 0.1 y 0.2%, respectivamente, con un *p-value* de 0.27, no habiendo indicios de que la diferencia en los porcentajes de transformación sea constructo dependiente.

Los regenerantes se contaminaron principalmente con *Agrobacterium tumefaciens*, debido a la supervivencia de esta bacteria en la planta. Nueve y siete regenerantes transformados con los genes *cry7Aa1* (pCIP78) y *cry3Ca1* (pCIP79), respectivamente, murieron por contaminación con esta bacteria; los demás se perdieron por contaminación con hongos.

La alta incidencia de contaminación por persistencia de *A. tumefaciens* en la planta, obligó a cambiar el antibiótico Cefotaxima por Timentin, por presentar este último una mayor actividad bacteriostática y bactericida; y por afectar menos los porcentajes de regeneración *in vitro* (Cheng *et al.*, 1998). Se utilizó a una concentración de 200ppm.

5.2 Determinación de la incorporación del transgén

5.2.1 Prueba de resistencia a Kanamicina

Los resultados de la prueba de resistencia a Kanamicina en las plantas transformadas con las construcciones pCIP78 y pCIP79 (Figura 6) fueron los siguientes:

Tabla 36. Resultados *in vitro* de resistencia a Kanamicina

Plantas con:	Regenerantes		Total
	Callo +	Callo-	
<i>cry7Aa1</i>	7	11	18
<i>cry3Ca1</i>	9	2	11

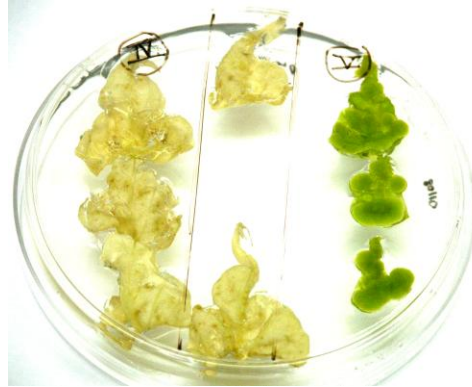


Figura 6. Prueba de formación de callo en hojas *in vitro*. Izquierda, regenerante que no tiene resistencia a kanamicina (callo negativo); Derecha, regenerante con resistencia a Kanamicina (Callo positivo); Centro, planta no transgénica (control negativo)

La resistencia a la kanamicina, conferida por la introgresión del gen *nptII*, en la planta nos da indicio que el gen deseado (ubicado en el ADN-T) se ha insertado dentro del ADN vegetal. Esto se debe a que la inserción del ADN-T empieza por el borde derecho, donde se ubica el gen *cry*, y culmina por el borde izquierdo, donde se ubica el gen *nptII*, por lo tanto; necesariamente el gen *cry* se inserta primero que el gen de resistencia a Kanamicina.

5.2.2 Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los resultados de PCR para la detección de los genes *cry7Aa1* (Figura 7) y *cry3Ca1* (Figura 8) en plantas fueron los siguientes:

Tabla 37. Resultados de PCR para la detección de los genes *cry7Aa1* y *cry3Ca1* en eventos transgénicos

Plantas con:	Regenerantes		Total
	PCR +	PCR -	
<i>cry7Aa1</i>	7	11	18
<i>cry3Ca1</i>	9	2	11

Los resultados de resistencia a kanamicina coinciden con los resultados de amplificación (PCR) de los genes *cry*, verificando la incorporación del transgén en el ADN de las plantas transformadas.

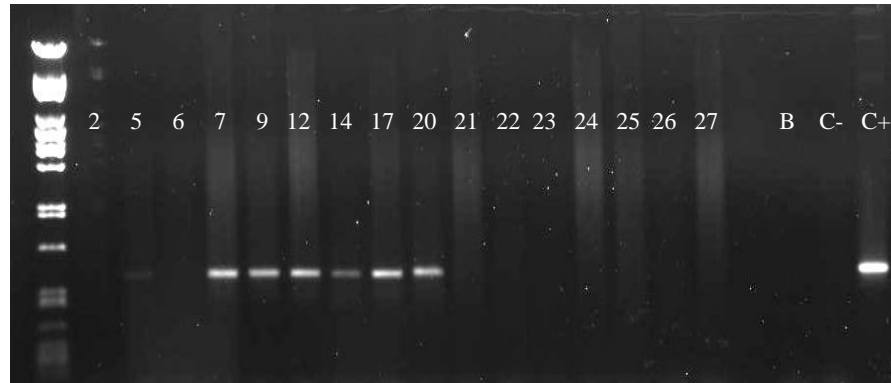


Figura 7. Amplificación del gen *cry7Aa1*. 2-27: eventos transgénicos; C-: control negativo, planta sin transformar; B: Agua, C+: Control positivo, plasmido de *E.coli* con el gen *cry7Aa1*

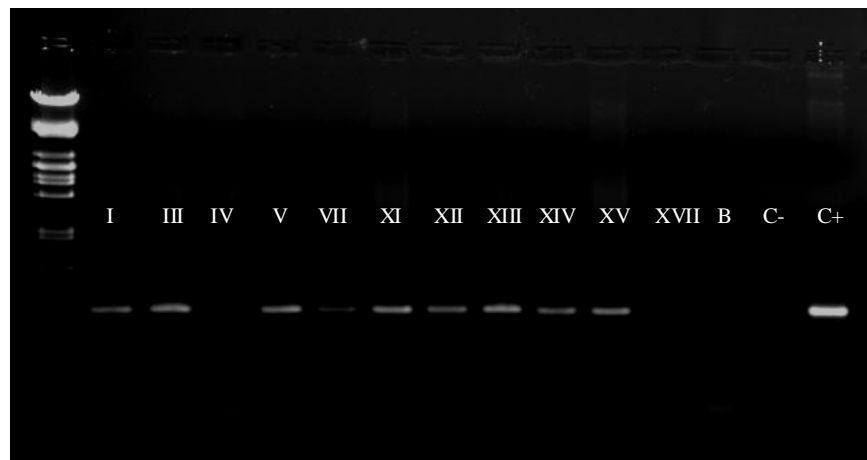


Figura 8. Amplificación del gen *cry3Ca1*. I-XVII: eventos transgénicos; C-: control negativo, planta sin transformar; B: Agua, C+: Control positivo, plasmido de *E.coli* con el gen *cry3Ca1*

Los resultados de PCR para la detección del gen *virD2* en plantas transformadas con los genes *cry7Aa1* (Figura 9) y *cry3Ca1* (Figura 10) que se mantienen viables en condiciones *in vitro* fueron los siguientes:

Tabla 38. Resultados de PCR para la detección del gen *virD2* en plantas PCR positivas para los genes *cry7Aa1* *cry3Ca1*

Plantas con genes	Regenerantes		
	<i>virD2</i> +	<i>virD2</i> -	Total
<i>cry7Aa1</i>	0	8	8
<i>cry3Ca1</i>	0	9	9

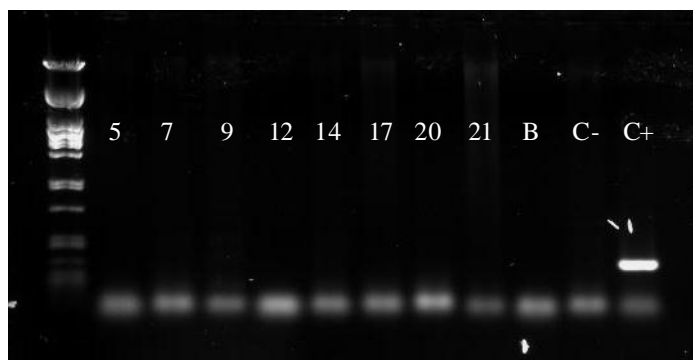


Figura 9. Amplificación del gen *virD2* en plantas PCR positivas para el gen *cry7Aa1*. 5-21: eventos transgénicos; C-: control negativo, planta sin transformar; B: Agua, C+: Control positivo, plasmido de *A. tumefaciens* con el gen *cry7Aa1*



Figura 10. Amplificación del gen *virD2* en plantas PCR positivas para el gen *cry3Ca1*. I-XVII: eventos transgénicos; C-: control negativo, planta sin transformar; B: Agua, C+: Control positivo, plasmido de *A. tumefaciens* con el gen *cry3Ca1*

Las plantas PCR positivas para los genes *cry7Aa1* y *cry3Ca1* no amplifican para el gen *virD2* (gen de virulencia) de *A. tumefaciens*, indicando que las plantas se encuentran libres de la presencia de *A. tumefaciens*.

5.3 Expresión del transgén

5.3.1 NCM-ELISA de proteínas Cry3Ca1 y Cry7Aa1

Los resultados de NCM-ELISA confirmaron la especificidad de los anticuerpos Cry7Aa1 y Cry3Ca1 en la detección de la proteína Cry (Figura 11).

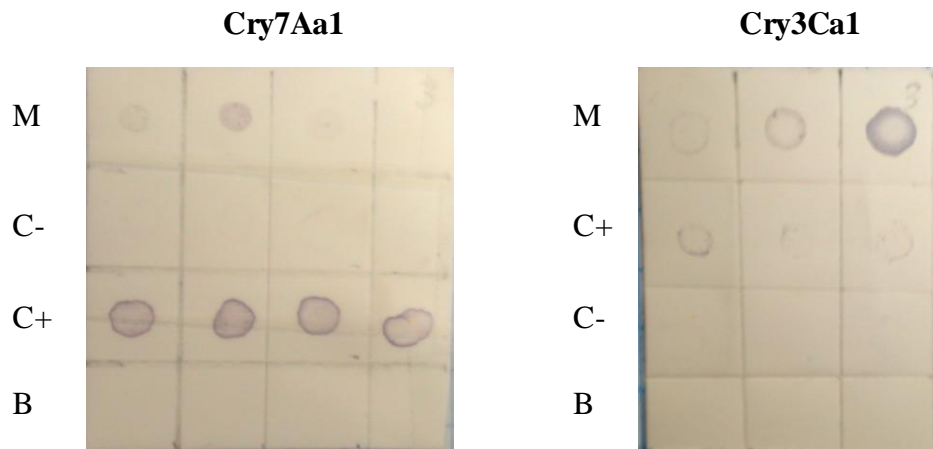


Figura 11. Detección de proteínas Bt Cry7Aa1 y Cry3Ca1 en plantas mediante NCM-ELISA. M: Muestras; C-: Control negativo, planta sin transformar; C+: Control positivo, proteína purificada; B: Blanco, agua.

La detección de la proteína Cry3Ca1 pura (C+) fue menor que la de su contraparte en planta (M). Además, esta proteína pura pese a haber sido agregada en la misma concentración que la proteína Cry7Aa1 (50ng/5µl) y haber sido mantenida en la misma condición de frío, fue más termolábil y propensa a la degradación en comparación con la proteína Cry7Aa1.

5.3.2 Western Blot de proteínas Cry3Ca1 y Cry7Aa1

Para determinar la sensibilidad de detección de la proteína Cry -por esta técnica- se trabajó con la proteína pura Cry7Aa1, por ser más estable y menos propensa a la degradación. La mínima concentración detectable de proteína Cry7Aa1 fue 3.12ng (Figura 12). Tomando en consideración este dato se procedió a estimar la concentración de proteínas Cry en hojas (0.05% del total de proteínas solubles, Génissel *et al.*, 2003) mediante el método de Bradford (Tabla 39), estandarizando para ello la curva standard (Figura 13).

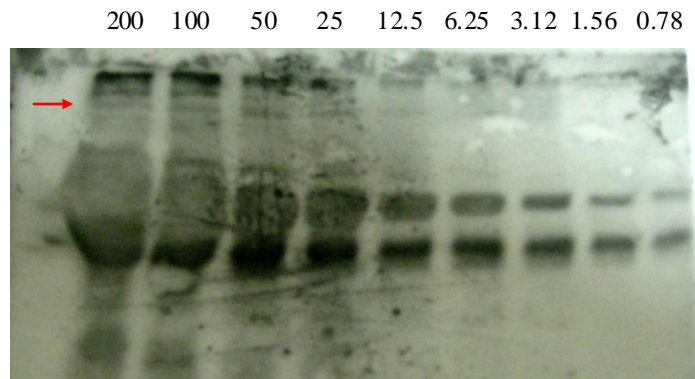


Figura 12. Detección de proteína pura Cry7Aa1 por Western Blot. De Izq. a Der.: Diluciones de la proteína Cry7Aa1 en 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78 ng/80µl. La flecha en rojo indica el peso de la banda de la proteína Cry7Aa1

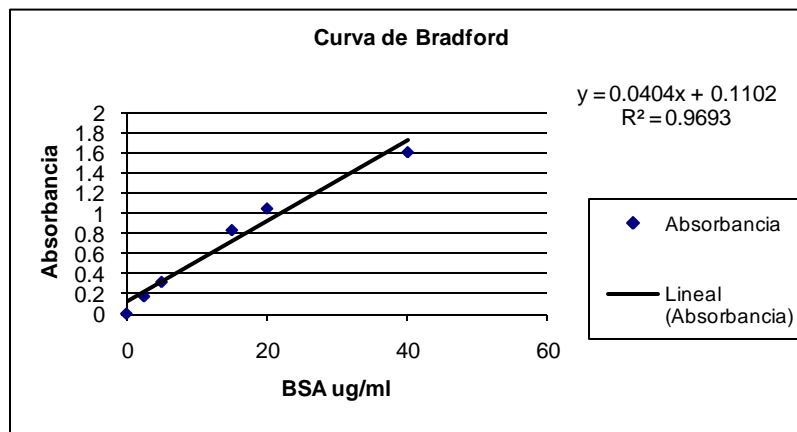


Figura 13. Estandarización de la curva de Bradford para cuantificar las proteínas totales en hojas. Eje de X: Diluciones de la proteína BSA 0, 2, 5, 5, 15, 20 y 40 µg/ml; eje de Y: Absorbancia de las diferentes concentraciones de BSA.

Tabla 39. Cuantificación de proteínas (ng/μl) Cry7Aa1 y Cry3Ca1 en hojas de eventos transgénicos, usando el método de Bradford

		Proteínas totales				Proteína Cry (ng/μl)	
	Líneas	Absorbancia	μg/ml	μg/μl	ng/μl		
Bt Cry7Aa1	7	2.016	47.17	0.0472	47.17	0.024	
	9	1.616	37.27	0.0373	37.27	0.019	
	12	1.427	32.59	0.0326	32.59	0.016	
	14	1.872	43.61	0.0436	43.61	0.022	
	17	1.213	27.30	0.0273	27.30	0.014	
Bt Cry3Ca1	III	1.642	37.92	0.0379	37.92	0.019	
	IV	1.735	40.22	0.0402	40.22	0.020	
	VII	1.646	38.01	0.0380	38.01	0.019	
	XIII	1.834	42.67	0.0427	42.67	0.021	
	XV	1.581	36.41	0.0364	36.41	0.018	
	XVII	1.969	46.01	0.0460	46.01	0.023	
Control		1.628	37.57	0.0376	37.57	0.019	
		Proteína Pura	Absorbancia	μg/ml	μg/μl	ng/μl	Proteína Cry (ng/μl)
		Cry3Ca1	-	2780	2.7800	2780.00	2780
		Cry7Aa1	-	2320	2.3200	2320.00	2320

Aún cargando los pocillos del gel hasta su máxima capacidad (80 μl), con el extracto de proteína de hojas, no se hubiera alcanzado la concentración mínima detectable de proteína Cry (3.12 ng); haciendo innecesario realizar el Western Blot para proteínas Cry en hojas.

En el caso de las raíces tuberosas, se estimó la cantidad de proteína Cry (ng/μl) a partir de las proteínas solubles totales presente en dicho órgano (Tabla 40) para lo cual también se estandarizó la curva estándar (Figura 14). La concentración aproximada de proteína Cry en las raíces tuberosas se calculó considerando los valores de proteína Cry (0.1-0.2% del total de proteínas solubles) reportados en raíces de maíz por Moellenbeck *et al.*, 2001.

Tabla 40. Cuantificación de proteínas (ng/μl) Cry7Aa1 y Cry3Ca1 en raíces tuberosas de eventos transgénicos usando el método de Bradford

	Proteínas totales					Proteína cry
	Línea	Absorbancia	μg/ml	μg/μl	ng/μl	(ng/μl)
Cry7Aa1	7	0.204	66.5	0.0665	66.5	0.067
	9	0.18	57.27	0.0573	57.27	0.057
	14	0.151	46.12	0.0461	46.12	0.046
	17	0.169	53.04	0.053	53.04	0.053
Cry3Ca1	III	0.165	51.50	0.0515	51.5	0.051
	XII	0.082	19.58	0.0196	19.58	0.020
	XIII	0.157	48.42	0.0484	48.42	0.048
	XV	0.327	113.81	0.1138	113.81	0.119
Jewel Control		0.149	45.35	0.0453	45.35	

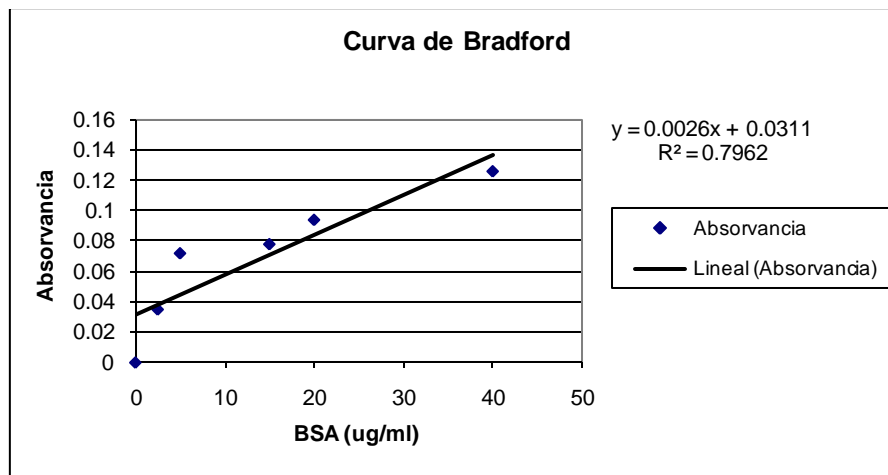


Figura 14. Estandarización de la curva de Bradford para cuantificar las proteínas totales en raíces tuberosas. Eje de X: Diluciones de la proteína BSA 0, 2, 5, 5, 15, 20 y 40 μg/ml; eje de Y: Absorbancia de las diferentes concentraciones de BSA.

Las proteínas Cry7Aa1 y Cry3Ca1 de las raíces tuberosas de camote habrían sido detectada con las justas por la técnica de Western Blot, ya que los valores -al cargar 80 μl de muestra- estaban muy cercanos al mínimo detectable; motivo por el cual se cuantificó directamente la concentración de proteínas Cry en raíces tuberosas mediante la técnica de DAS-ELISA.

5.3.3 DAS-ELISA de proteínas Cry3Ca1 y Cry7Aa1

Los primeros ensayos de DAS-ELISA permitieron estandarizar las diluciones de anticuerpo (IgG e IgG-conjugado) y antígeno (curva estándar) necesarios para la detección de las proteínas Cry. Inicialmente, los anticuerpos IgG e IgG conjugados se diluyeron a concentraciones de 1/1500, 1/1000 y 1/500 (Figura 15) obteniéndose mejores resultados de detección al emplear mayores concentraciones de anticuerpo; esto obligó a probar diluciones más concentradas de 1/500, 1/250 y 1/100 (Figura 16). Todas las diluciones “más concentradas” detectaron la proteína Cry sin generar inespecificidad; sin embargo, a menor dilución del anticuerpo la detección de la proteína Cry en plantas - aparte de requerir más tiempo- era menor; razón por el cual se decidió emplear la dilución 1/100.

Para establecer los valores de la curva estándar se emplearon diferentes diluciones de las protoxinas Cry3Ca1 y Cry7Aa1 (proteínas purificadas). Inicialmente se probaron diluciones de 50, 25 y 10ng, pero debido a que estas concentraciones saturaban rápidamente la reacción fue necesario realizar diluciones menores a 10ng (Figura 17 y 18). Esto hizo posible que los valores de absorbancia de las plantas que expresaban las toxinas Cry3Ca1 y Cry7Aa1 se pudieran intrapolar dentro de la curva estándar.

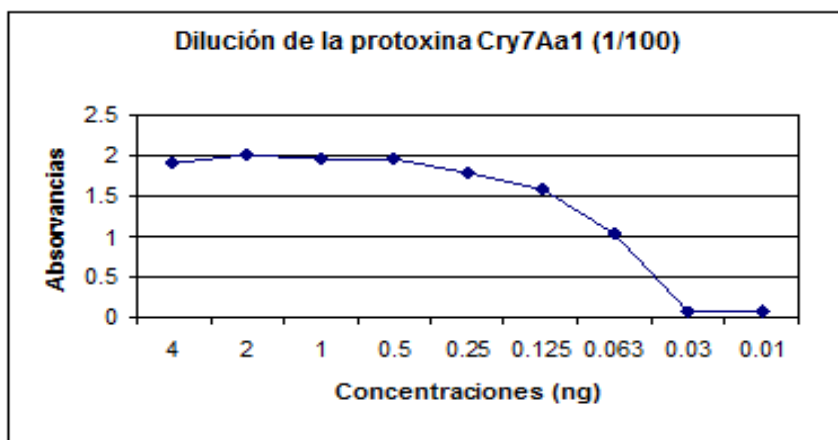


Figura 17. Curva estándar de Cry7Aa1 en una dilución de anticuerpo de 1/100

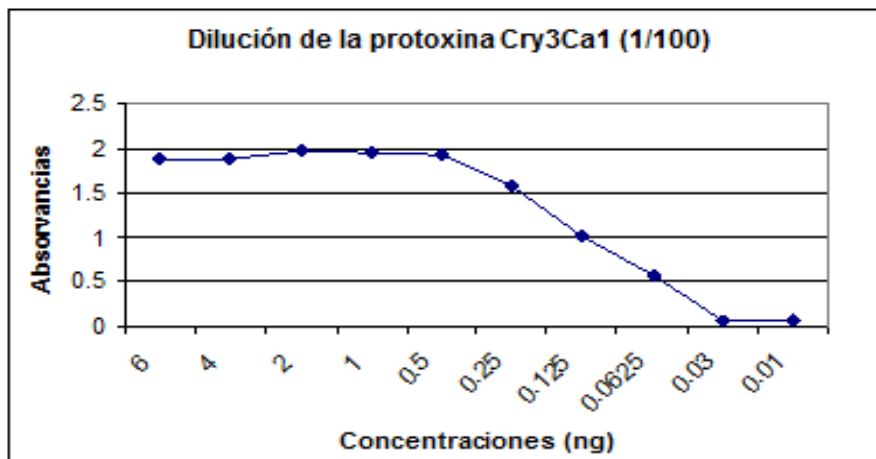


Figura 18. Curva estándar de Cry3Ca1 en una dilución de anticuerpo de 1/100

La expresión de proteína Cry en hojas de invernadero fue cuantificada con un mínimo de tres repeticiones por placa en tres y dos experimentos independientes para Cry7Aa1 (Tabla 41) y Cry3Ca1 (Tabla 42), respectivamente. La detección de proteína Cry7Aa1 fue inmediata, leyéndose la absorbancia en periodos de 5, 15 y 30 minutos, y evidente a simple vista después de 5 minutos (Figura 19). En el caso de la proteína Cry3Ca1 la detección tomó más tiempo, leyéndose la absorbancia en periodos de 30, 60 y 90 minutos, y en ningún caso llegó a ser evidente a simple vista (Figura 20).

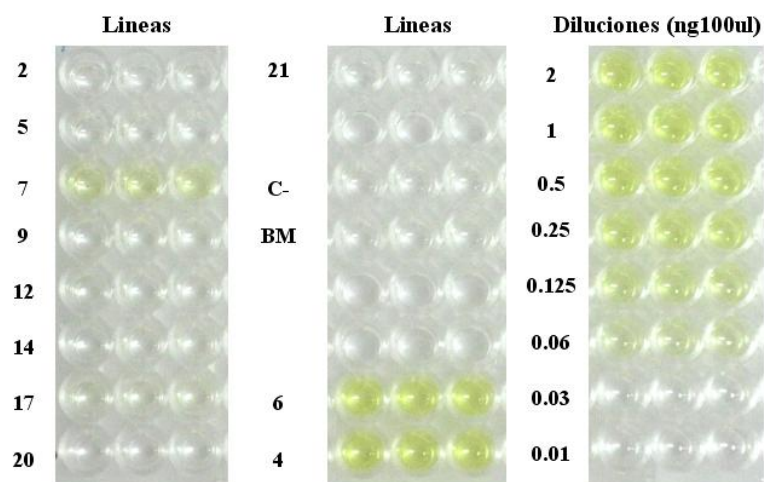


Figura 19. Detección de proteína Cry7Aa1 después de 5 minutos de agregado el sustrato

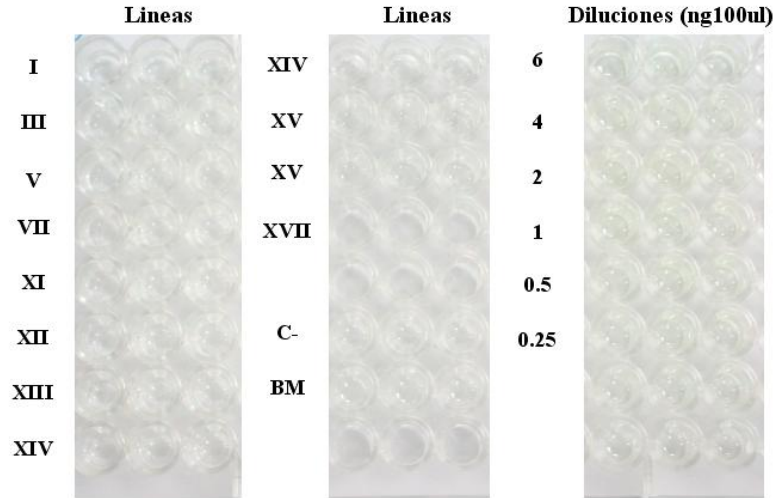


Figura 20. Detección de proteína Cry3Ca1 después de 90 minutos de agregado el sustrato

La concentración de proteína Cry en hojas ($\mu\text{g/g}$) fue menor en los eventos que expresan la proteína Cry7Aa1 (Figura 21) que en los eventos que expresan la proteína Cry3Ca1 (Figura 22). En general, todos los eventos transformados con el gen *cry3Ca1* expresaban mejor la proteína Cry.

De todas los eventos analizados, transformados con el gen *cry7Aa1*, solamente los eventos 7 ($0.016\mu\text{g/g}$), 17 ($0.009\mu\text{g/g}$) y 9 ($0.001\mu\text{g/g}$) expresaron la proteína Cry7Aa1 (*p-value*: 0.172) a nivel de hojas ; mientras que al analizar los eventos transformados con el gen *cry3Ca1* todos expresaron la proteína Cry3Ca1 (*p-value*: 0.895), destacando los eventos III ($0.033\mu\text{g/g}$), V ($0.023\mu\text{g/g}$), I ($0.019\mu\text{g/g}$), XV, XII y VII ($0.015\mu\text{g/g}$).

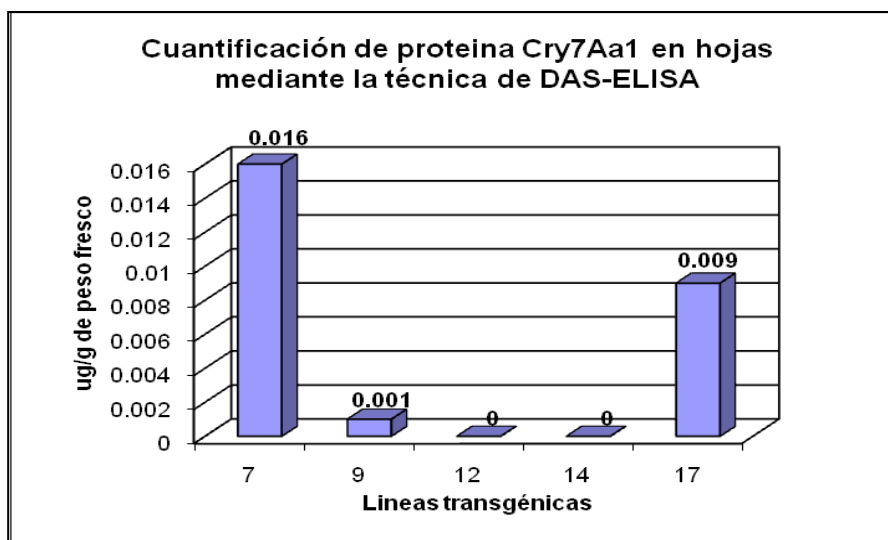


Figura 21. Cuantificación de Cry7Aa1 ($\mu\text{g/g}$) en hojas mediante la técnica de DAS-ELISA

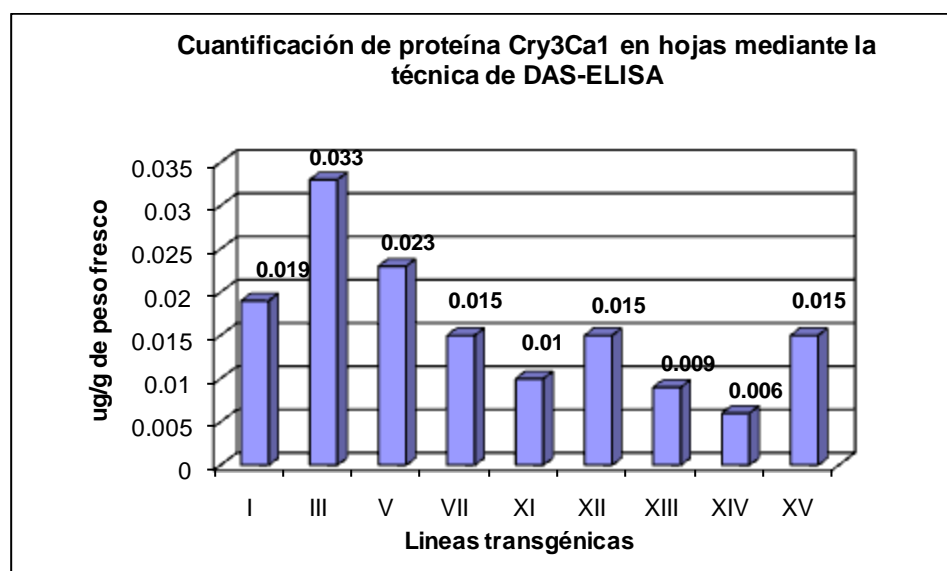


Figura 22. Cuantificación de Cry3Ca1 ($\mu\text{g/g}$) en hojas mediante la técnica de DAS-ELISA

Debido a la baja expresión de la proteína Cry7Aa1 en hojas, en comparación con la expresión de Cry3Ca1, se decidió verificar el funcionamiento del promotor (β -*amy*) del gen de β -amilasa que controla la expresión del gen *cry7Aa1*; induciendo su expresión con altas concentraciones de sucrosa (10%) en tallos y hojas *in vitro* (Maeo *et al.*, 2001). Si el promotor estuviera funcionando correctamente se esperaría que a mayor expresión del promotor hubiera mayor expresión del gen *cry7Aa1*.

La sucrosa indujo la expresión del promotor β -*amy* sólo en los tallos *in vitro*, principalmente en los eventos 7 y 17 que expresaron 0.35 y 0.05 $\mu\text{g/g}$ de proteína Cry7Aa1, respectivamente (Figura 23). Estos valores fueron 22 y 50 veces mayores a los cuantificados en hojas de invernadero. Rectificando de esta forma el correcto funcionamiento del promotor.

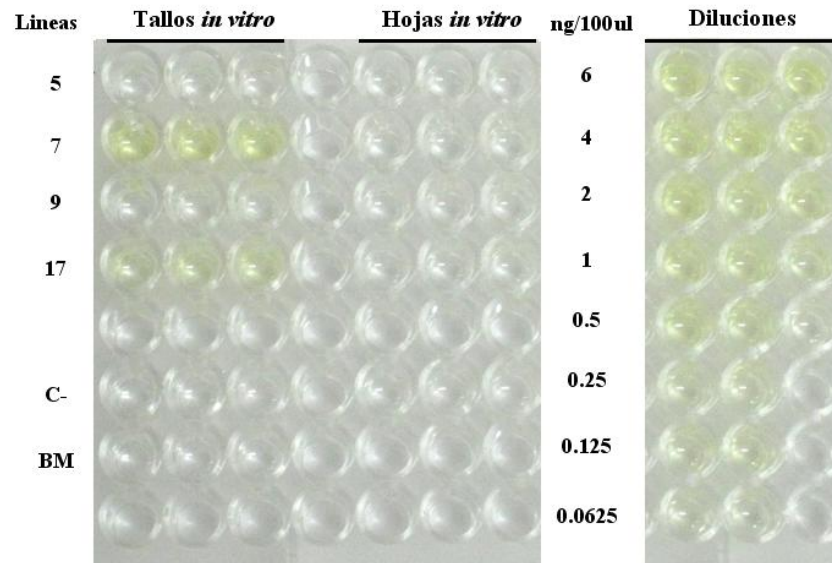


Figura 23. Cuantificación de Cry7Aa1 ($\mu\text{g/g}$) en tallos y hojas *in vitro* en donde la expresión del promotor de β -amilasa ha sido inducido por sucrosa (10%)

En resumen, los eventos 7, 17 y III, V, I, XII, XV fueron las que tuvieron mayor expresión de las proteínas Cry7Aa1 y Cry3Ca1 en hojas, respectivamente.

En las raíces tuberosas (Figura 24) la expresión de las proteínas Cry7Aa1 y Cry3Ca1 fue mayor que en las hojas, variando los niveles de expresión según el tejido (cáscara o pulpa) de la raíz y el tipo de proteína expresada. El promedio de las repeticiones de los ensayos de DAS-ELISA nos permitió identificar los eventos con mayor expresión en las raíces tuberosas Cry3Ca1 (Tabla 43) y Cry7Aa1 (Tabla 44).

La expresión de Cry3Ca1 fue mayor a nivel de pulpa (p -value: 0.6514) que en cáscara (p -value: 1); resaltando la línea XV por tener los mayores niveles de expresión - en ambos tejidos- con 0.66 μ g/g y 1.47 μ g/g de proteína, respectivamente. A nivel de cáscara (Figura 25) también hubo expresión en la línea XIII (0.15 μ g/g); mientras que a nivel de pulpa (Figura 26) la expresión también se pudo cuantificar en los eventos XII (0.64 μ g/g), XV (0.66 μ g) y XIII (0.41 μ g/g).

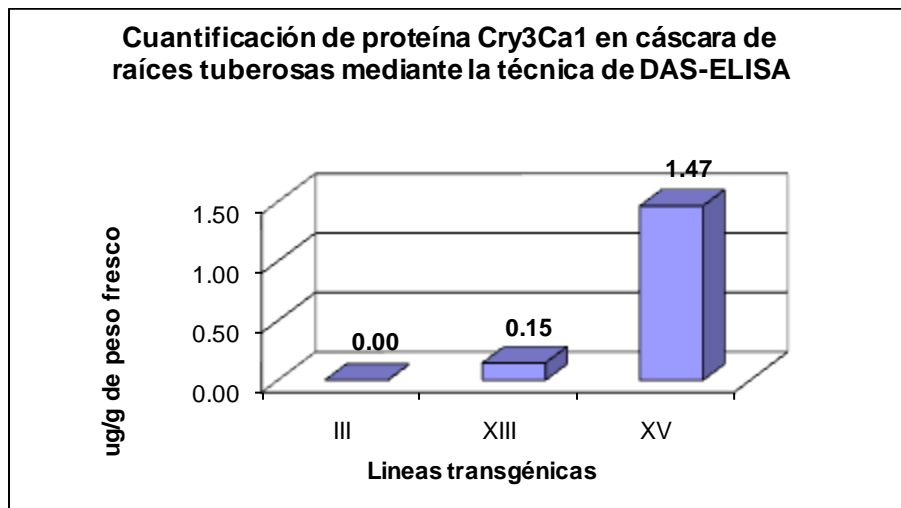


Figura 25. Cuantificación de proteína Cry3Ca 1 (μ g/g) en cáscara de raíces tuberosas

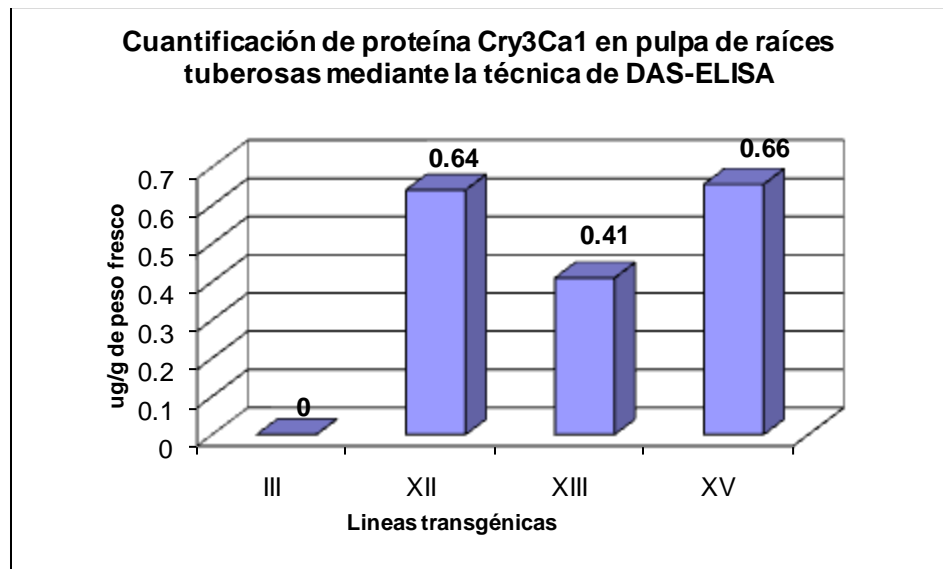


Figura 26. Cuantificación de proteína Cry3Ca1 (μ g/g) en pulpa de raíces tuberosas

Entre los eventos que expresaban la proteína Cry7Aa1 a nivel de cáscara (Figura 27), la línea 7 fue la de mayor expresión (0.06 $\mu\text{g/g}$) seguida de los eventos 9 (0.05 $\mu\text{g/g}$), 14 (0.04 $\mu\text{g/g}$) y 17 (0.025 $\mu\text{g/g}$), *p-value*: 0.732. A nivel de pulpa (Figura 28), también la línea 7 fue la de mayor expresión (0.04 $\mu\text{g/g}$), seguida de los eventos 17(0.03 $\mu\text{g/g}$), 14 (0.02 $\mu\text{g/g}$) y 9 (0.015 $\mu\text{g/g}$), *p-value*: 0.481.

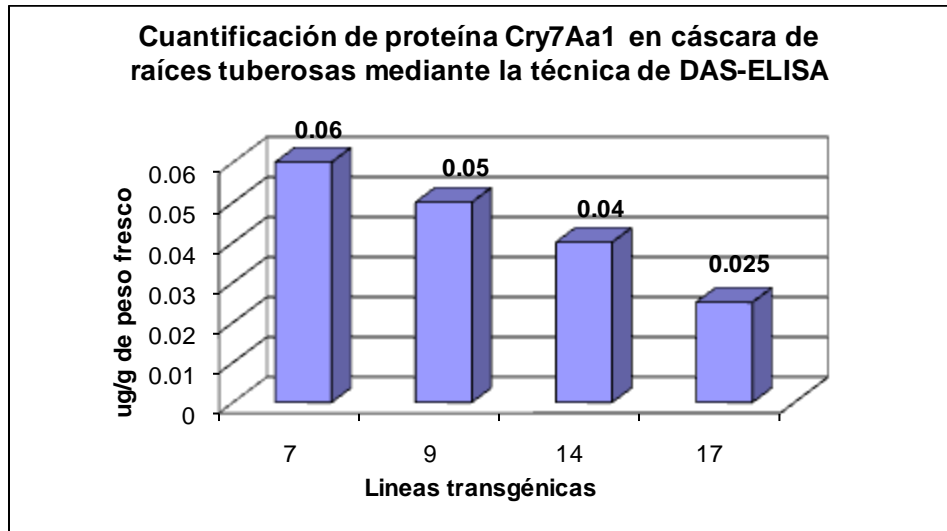


Figura 27. Cuantificación de proteína Cry7Aa1 ($\mu\text{g/g}$) en cáscara de raíces tuberosas

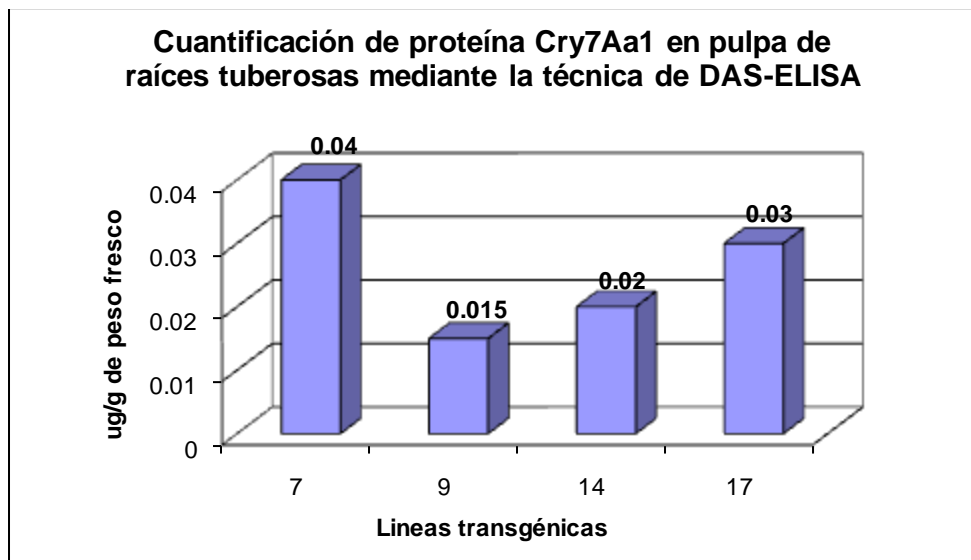


Figura 28. Cuantificación de proteína Cry7Aa1 ($\mu\text{g/g}$) en pulpa de raíces tuberosas

Considerando los resultados de expresión de las proteínas Cry obtenidos mediante la técnica de DAS-ELISA, a nivel de hojas y raíces tuberosas, los eventos 7, 9, 17 y XV, XIII, XII son los que presentaron los mayores niveles de expresión de las proteínas Cry7Aa1 y Cry3Ca1, respectivamente. Pese a que no se han encontrado diferencias significativas entre los eventos que expresan una misma proteína, los eventos -arriba mencionados- presentan los mayores niveles de expresión.

Por condiciones desfavorables de crecimiento dentro del edificio de bioseguridad, no todas los eventos transgénicos formaron raíces tuberosas por lo que el análisis de expresión se tuvo que restringir a la cuantificación de proteína Cry mediante la técnica de DAS-ELISA y a la cuantificación transcripcional del gen *cry* por qRT-PCR a nivel de hojas. Estas dos mediciones son lo suficientemente confiables como para predecir que si hay una alta expresión de proteínas Cry en hojas también la habrá a nivel de raíces tuberosas, ya que los promotores de los genes *cry* provienen de los genes de esporamina y β -amilasa que son las dos mayores proteínas de reserva de la raíz tuberosa de camote.

Pese a que los resultados de DAS-ELISA coinciden con los de qRT-PCR, cabe la posibilidad de que al haber cuantificado las proteínas Cry -en hojas y raíces tuberosas- se hayan *sobrestimado* los valores; ya que las concentraciones de las proteínas puras Cry3Ca1 y Cry7Aa1 -utilizadas para hacer la curva estándar- no concentraban los valores reales de tales diluciones (Figura 29), lo que deja abierta la posibilidad de que la expresión de proteínas Cry en los tejidos vegetales sea, ligeramente, menor a la cuantificada.

Sin embargo; lo más lógico de pensar, es que dichos valores han sido *subestimados*, porque se habrían cuantificando las protoxinas Cry7Aa1 (129kDa) y Cry3Ca1 (73kDa) en las curvas estándar y las toxinas Cry7Aa1 (66.22kDa) y Cry3Ca1 (66.08 kDa) en las plantas transgénicas. Asumiendo que hay una distribución homogénea de los epitopes, se podría evaluar la subestimación a un factor de 2 (129/66.2) y de 1 (73/66.08) para Cry7Aa1 y Cry3Ca1, respectivamente. Por ese motivo, hablaremos de

concentración aparente debido a que no conocemos con exactitud la concentración absoluta. Eso implica que la expresión de las toxinas Cry en las raíces tuberosas es mayor a las cuantificadas, habiendo mayor probabilidad de tener plantas “más resistentes” al ataque de gorgojo africano.

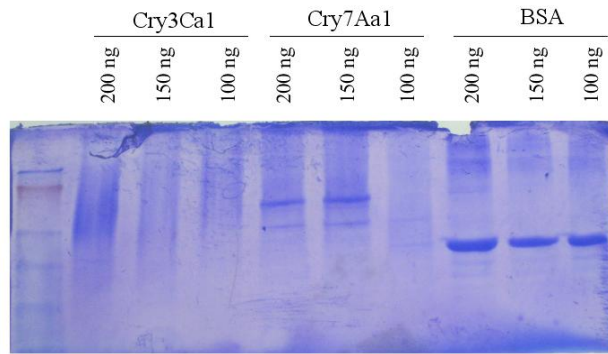


Figura 29. Cuantificación cualitativa de las proteínas purificadas Cry3Ca1 y Cry7Aa1 (proto xinas) usando 200,150 y 100 ng de BSA como patrón

5.3.4 Análisis de PCR en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR)

La expresión de los genes *cry7Aa1* y *cry3Ca1* se analizó a nivel de hojas en 5 y 9 líneas transgénicas, respectivamente.

El análisis de qRT-PCR, realizado con iniciadores específicos del transgén *cry3Ca1* y *cry7Aa1* mostraban un amplificado de 197 y 156 pb, respectivamente, y un amplificado de 96pb con el indicador endógeno *Cox*.

La derivada de la curva de desnaturalización (curva de melting) fue homogénea en todas las muestras analizadas indicando que corresponde a la región amplificada de interés, la temperatura de melting fue de 58° C para los genes *cry7Aa1* (Figura 30) y *cry3Ca1* (Figura 31) y de 56° C para el gen de control interno, *Cox*. El valor de Ct fue seleccionado manualmente en el punto donde ocurrió un incremento exponencial de la señal.

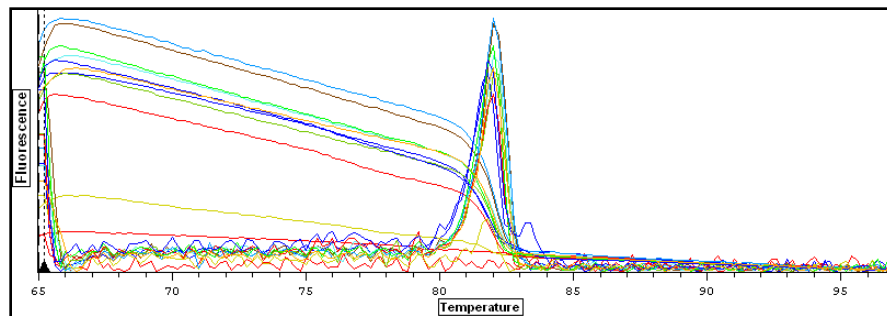


Figura 30. Curva de desnaturalización para los iniciadores que amplifican el transgén *cry7Aa1*

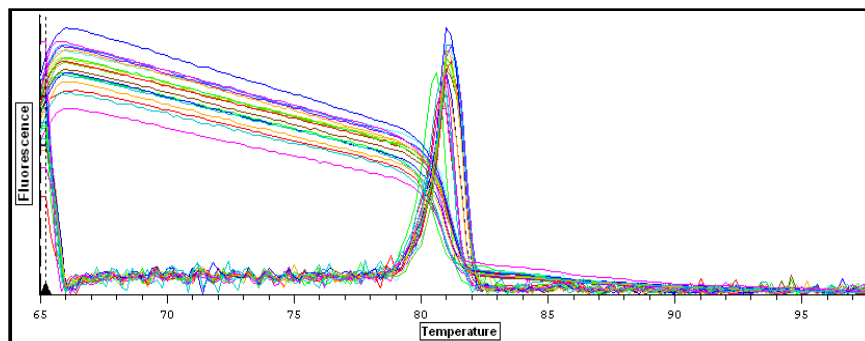


Figura 31. Curva de desnaturalización para los iniciadores que amplifican el transgén *cry3Ca1*

La curva estándar generada a partir de una dilución de plásmidos fue necesaria para calcular la eficiencia del primer de los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1* (Figura 32) durante el PCR mostrando valores de 0.95 y 0.97, respectivamente, en el programa REST.

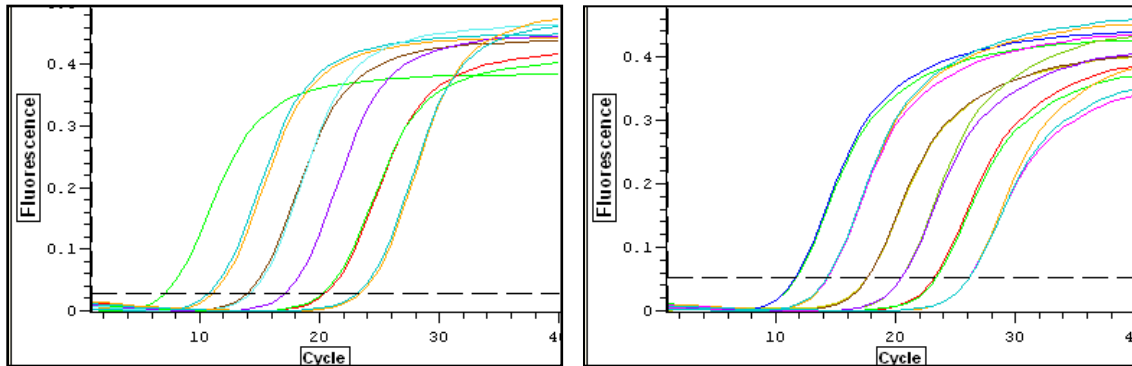


Figura 32. Curva estándar de eficiencia de primers, utilizando los plásmidos pCIP78 (izquierda) y pcip79 (derecha)

Los eventos transgénicos con menor expresión del transcrito, para ambos genes, fueron utilizados como eventos de referencia; de tal forma, que los eventos transgénicos expresaban “n” veces más transcrito que la línea de referencia (línea de más baja expresión). Los eventos de referencia para los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1* fueron los eventos I y 14, respectivamente.

Los eventos con los mejores niveles de expresión de los genes *cry3Ca1* (Figura 33) y *cry7Aa1* (Figura 34) corresponden a los eventos: V, III, XIII y 7, 9, 17, respectivamente, con 54.6, 2.78, 1.712 y 10.19, 1.78, 1.079 veces más de expresión que sus respectivas líneas de referencia.

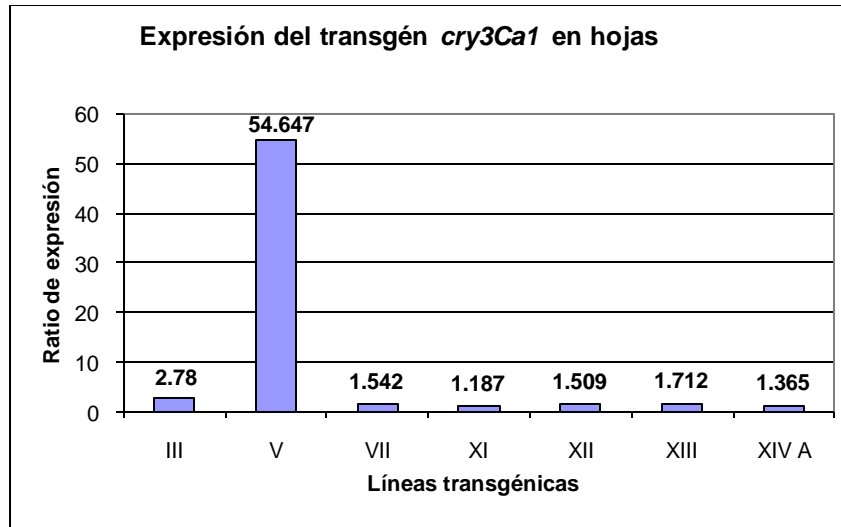


Figura 33. Expresión del transgén *cry3Ca1* en hojas

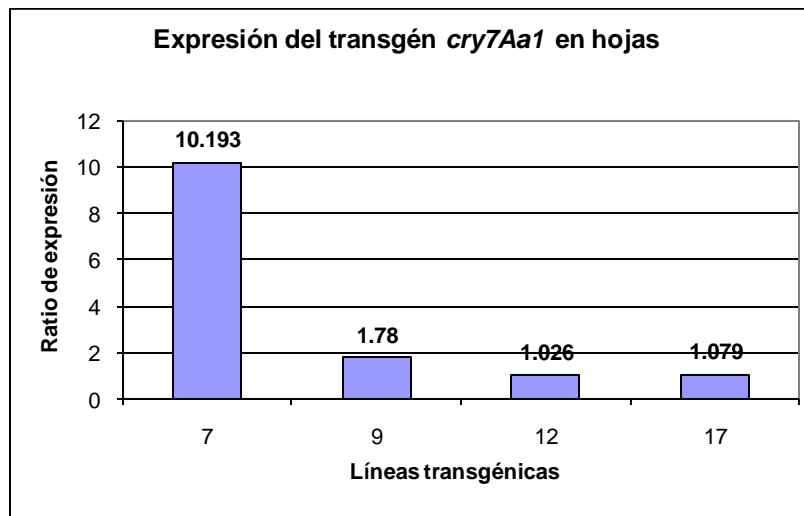


Figura 34. Expresión del transgén *cry7Aa1* en hojas

Los eventos III, V, XV y 7, 9, 17 expresan las proteínas Cry3Ca1 y Cry7Aa1, respectivamente, habiéndose detectado actividad transcripcional del transgén (qRT-PCR) así como expresión de la proteína (DAS-ELISA).

No se pudo analizar la actividad transcripcional del gen *cry3Ca1* en la línea XV; sin embargo, y basándonos en los resultados de expresión de proteína a nivel de hoja y

raíz tuberosa mediante la técnica de DAS-ELISA -en donde las otras líneas han coincidido la alta expresión de proteína con una alta actividad transcripcional-, se considera a la línea XV como una de los eventos de más alta expresión.

Es de esperar que si hay transcripción del gen *cry* a nivel de hojas también haya transcripción a nivel de raíces tuberosas; más aún si se toma en cuenta que los promotores usados para dirigir la expresión de los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1* fueron tomados de los genes (*SPOA1* y β -amy) de las dos proteínas de reserva más abundantes de las raíces tuberosas de camote (esporamina y β -amilasa). Por lo tanto, se espera no sólo que haya transcripción del gen *cry* en la raíces tuberosas si no que además, la transcripción sea mayor que en hojas -siguiendo la tendencia de los resultados de expresión cuantificados por DAS-ELISA-.

El poder “localizar” la expresión mediante el uso de promotores inducibles confiere la ventaja de poder mantener poblaciones de gorgojo susceptibles -en tejidos donde no se expresa el promotor- que puedan recombinarse con poblaciones “resistentes” -en caso surgieran-, generando en la nueva descendencia 100% de individuos “susceptibles”. Esta alternativa constituye una excelente estrategia de manejo de resistencia a insectos.

VI. DISCUSIONES

6.1 Evaluación de la transformación genética

La transformación genética de Jewel se realizó tomando como base el protocolo de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens* reportado por Luo *et al.* (2006). La eficiencia de transformación (ET) obtenida en la presente investigación fue de 0.1% con pCIP78 y de 0.2% con pCIP79, mientras que Luo *et al.* (2006) reportaron valores mayores al 20% con pCIP45 para la misma variedad.

Los factores que normalmente afectan la capacidad de regeneración de las plantas controles y transgénicas son: el método de introducción del gen, la fuente y tamaño del explante, la cepa de bacteria empleada para la transformación y/o el agente de selección. Sin embargo; considerando el exitoso protocolo de transformación reportado por Luo *et al.* (2006) -el mismo que se ha empleado en la presente investigación- sólo queda presumir que la baja eficiencia de transformación podría deberse: a la ocurrencia de variación somaclonal en las plantas donantes de explantes, a la concentración del antibiótico empleado para suprimir el crecimiento de *A. tumefaciens* y/o a la limitada interacción entre el explante y *A. tumefaciens*.

Sin embargo; es poco probable que esa diferencia sea debido a una deficiencia en la capacidad regenerativa del cultivar “Jewel”, causada por variación somaclonal como producto del uso de plantas donantes con numerosos subcultivos (Jain, 2001), porque los controles negativos (explantes de “Jewel” sin transformar) presentaron una tasa de regeneración del 47%, en contraste con el \pm 28.6% y 68.90% obtenido por Porobo Dessai *et al.* (1995) y Garcia *et al.* (1999), respectivamente.

Tampoco se podría pensar que el antibiótico empleado para eliminar *Agrobacterium tumefaciens*, después del proceso de transformación, podría haber afectado la regeneración de los explantes, ya que el Timetin (Ticarcilin: Acido clavulónico) aparte de ser tan efectivo como la Carbanicilina y Cefotaxima en la

supresión de *A. tumefaciens* y de permanecer estable y activo en medio sólido hasta por un periodo de 10 semanas, tiene un efecto negativo mínimo sobre la regeneración (Cheng *et al.*, 1998). A una concentración alta de Timetin (500 mg/l) se ha reportado una tasa de regeneración de 65% en comparación con la Cefotaxima, que a esa misma concentración, presenta una tasa de regeneración de 3.3% en tomate (Ieamkhang & Chatchawankanphanich, 2005).

Pero, si se podría atribuir la baja eficiencia de transformación a la limitada interacción entre la hoja (explante con mayor potencial regenerativo) y *Agrobacterium tumefaciens*, ya que en la presente investigación se empleó un medio de co-cultivo semi-sólido -donde exclusivamente la base cortada del peciolo estaba en contacto con *A. tumefaciens*- a diferencia del co-cultivo líquido, donde las hojas cortadas están completamente extendidas en el medio. Sin embargo; pese a la ventaja regenerativa que ofrece el co-cultivo líquido, tiene la desventaja de incrementar la probabilidad de contaminación y muerte de explantes por agroinfección, además de que impone parámetros muy estrictos y tediosos para la transformación. Por tal motivo, se decidió colocar los explantes en contacto directo con la bacteria mediante un co-cultivo en medio semi-sólido, ya que permite mantener una interacción planta:bacteria por más tiempo, incrementando la probabilidad de inserción del T-ADN, con menor probabilidad de contaminación y mayor facilidad de manejo *in vitro*; sin embargo, se obtienen pocas líneas transgénicas estables con una eficiencia de transformación del 1 al 3% (Garcia *et al.*, 2000), en comparación con la ET de 0.1 y 0.2% obtenida en la presente investigación.

En general, habría que considerar que la ET reportada en la presente investigación podría estar siendo subestimada si se toma en cuenta que muchos de los regenerantes obtenidos, principalmente los transformados con el gen *cry7Aa1*, no se pudieron caracterizar molecularmente debido a que se perdieron por contaminación (hongos, levaduras y/o bacterias). Estos regenerantes eliminados, podrían haber introducido el T-ADN bacteriano en su genoma y formado posteriormente líneas transgénicas estables que hubieran aumentado significativamente la eficiencia de transformación.

6.2 Regeneración de brotes

En este trabajo se empleó la Kanamicina como agente selector en los medios de regeneración. A una concentración de 100mg/l se ha reportado resultados 100% eficientes de selección (Luo *et al.*, 2006) sin que haya presencia de escapes. Sin embargo, en la presente investigación, se obtuvo 55% y 18% de “regenerantes escapes” los cuales pese a haber sido transformados con los genes *cry7Aa1* y *cry3Ca1*, respectivamente, no habían insertado dichos transgénos en su genoma.

Las posibles causas de por qué habrían regenerado estos “escapes” serían: La falta de permanente contacto de toda la superficie del explante con el medio de cultivo, ocasionando que la regeneración tuviera lugar en aquellas áreas que no habían estado en contacto con el agente selector, y/o el uso de medios de cultivo “antiguos” -almacenados más de 30 días- en los cuales la eficiencia y actividad de la Kanamicina podría haber disminuido e incluso desaparecido. De cualquier forma, todos los “escapes” pudieron ser detectados -y posteriormente eliminados- mediante la prueba de PCR para el transgén *cry* y la prueba de resistencia a Kanamicina.

6.3 Prueba de resistencia al antibiótico Kanamicina

Esta prueba fisiológica de formación de callo permitió evaluar indirectamente la expresión del transgén *nptII*, ya que solo aquellas plantas que habían incorporado este gen dentro de su genoma fueron capaces de crecer en un medio con altas concentraciones de kanamicina (100 mg/l), normalmente tóxicas para la planta.

Además, esta prueba permitió evaluar indirectamente la incorporación del transgén en la planta, ya que considerando que el gen *cry* está ubicado antes que el gen *nptII* en el borde izquierdo y que la transferencia del ADN-T ocurre primero por el borde derecho, hay seguridad de que la transferencia del gen de interés (*cry*) se da antes que la del gen

marcador (*nptII*) (Hellens *et al.*, 2000). Así, toda planta resistente a Kanamicina tendría insertado el transgén *cry* en su genoma.

Esta afirmación fue corroborada mediante la prueba de PCR; en donde, todas los eventos callo positivas resultaron también PCR positivas para el transgén. Esto evidencia una eficiencia del 100% en la prueba de resistencia a Kanamicina al emplear una concentración de 100 mg/l, coincidiendo con los resultados reportados por Luo *et al.* (2006). La ventaja de poder discriminar los eventos transgénicas de los falsos positivos (escapes), radica en el tiempo y los materiales que son ahorrados por el investigador durante la evaluación de líneas.

6.4 Análisis de expresión del transgén

Los resultados de **NCM-ELISA** confirmaron la expresión de las proteínas Cry7Aa1 y Cry3Ca1 en hojas de camote transgénico y evidenciaron la especificidad de los anticuerpos en la detección de dichas proteínas, ya que las plantas controles (no transformadas) no presentaron reacción colorimétrica.

Mediante la prueba de **Western Blot** fue posible visualizar el peso de la banda de la protoxina Cry7Aa1 y determinar la sensibilidad de esta técnica en la detección de dicha proteína. No se realizó el Western Blot con la proteína Cry3Ca1, debido a que en ensayos anteriores (NCM-ELISA) se demostró lo propensa que es esta proteína a la degradación. En tal sentido, se utilizaron los datos de sensibilidad obtenidos para la proteína Cry7Aa1 también para Cry3Ca1. Estos resultados permitieron determinar que mediante esta técnica no sería posible detectar proteína Cry en hojas transgénicas, ya que la concentración se encontraba por debajo del mínimo detectable.

Con la prueba de **DAS-ELISA** se pudo cuantificar la concentración de proteína Cry en hojas y raíces tuberosas. La cantidad de proteína Cry en hojas osciló entre 0.001 a 0.033 µg/g (µg de proteína Cry por gr de peso fresco), que representa entre el 0.002-

0.03% del total de proteínas solubles; estos valores se encuentran dentro y/o cercanos a los rangos reportados por Génissel *et al.*, 2003 (0.05-0.025%) y Moellenbeck *et al.*, 2001 (0.05-0.1%). Estos autores emplearon el promotor constitutivo CaMV35 mientras que en la presente investigación se emplearon los promotores inducibles β -*amy* y *SPOA1*, los cuales por su carácter de “inducibles” deberían de expresarse recién a nivel de raíz tuberosa, sin embargo; ya a nivel de hoja han alcanzado valores de expresión similares a los reportados por dichos autores.

La expresión de proteína Cry en raíces tuberosas fue cuantificada a nivel de cáscara y pulpa oscilando los valores entre 0.025-1.47 $\mu\text{g/g}$ y 0.15-0.66 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Estos valores representan entre el 0.02% a 3% del total de proteína soluble, siendo mayores a los reportados por Moran *et al.*, 1998 (0.005-0%) pero menores a la publicados por Valderrama *et al.*, 2007 (0.02-17 $\mu\text{g/g}$). Los mayores valores de expresión de la proteína Cry provinieron de las raíces tuberosas transformadas con el gen *cry3Ca1* cuyo promotor (*SPOA1*) fue aislado del gen de Esporamina. Este gen sintetiza la mayor proteína de reserva de camote, que constituye el 80% del total de proteína de reserva de la raíz tuberosa, por lo que teniendo en cuenta la naturaleza del promotor tiene sentido que dicha proteína se exprese en mayor cantidad.

En todos los ensayos de DAS-ELISA se detectaron la protoxina (curva estándar) y la toxina (extractos de planta) usando anticuerpos policlonales obtenidos a partir del suero de conejos inoculados con la protoxina. En tal sentido, se detectó mayores valores de absorbancia en la curva estándar que en los extractos de planta, es decir; que se subestimó la expresión de proteína Cry en plantas. Allen *et al.* (2006) también emplearon un anticuerpo policlonal (130kDa), obtenido a partir del suero de un conejo inoculado con la protoxina, para detectar la toxina Cry1Ac (70kDa); reportando que dichos anticuerpos policlonales contenían anticuerpos que detectaban tanto la toxina activa como la protoxina, lo que no representó ningún impedimento para que estandarizaran un método de detección PCR-Inmunológico. Sin embargo; recomendaron emplear un anticuerpo específico para la toxina de 70kDa o un anticuerpo monoclonal, con la finalidad de mejorar la especificidad. Con el propósito de detectar expresiones relativas

(entre los distintos eventos) y no absolutas, la metodología cumplió con los objetivos ya que se pudo identificar los eventos con los más altos niveles de expresión de los genes *cry7Aa1* y *cry3Ca1*.

En los análisis de **PCR en Tiempo Real**, la derivada de la curva de desnaturalización (“Melt-Curve”) fue homogénea en las muestras analizadas, indicando que todas ellas corresponden a su respectivo amplicón de interés. Pese a que la temperatura de desnaturalización (“melting temperature”) fue diferente para los iniciadores utilizados para los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1* (58° C) y los iniciadores del gen COX (56° C); se decidió emplear una temperatura de desnaturalización de 58° C debido al interés principal de que amplificaran correctamente los genes *cry*.

Los eventos transformados con el gen *cry3Ca1* tuvieron mejores niveles de expresión del transcrito que los eventos transformadas con el gen *cry7Aa1*, coincidiendo estos resultados de expresión con los obtenidos mediante DAS-ELISA.

VII. CONCLUSIONES

- Del total de plantas transformadas se obtuvieron 7 y 9 líneas transgénicas viables con los genes *cry7Aa1* y *cry3Ca1*, respectivamente.
- Todos los eventos transgénicos fueron callo positivo (resistentes a Kanamicina) y presentaron amplificación de banda del gen de interés (PCR positivo).
- La expresión de la proteína Cry3Ca1 fue mayor que la de Cry7Aa1, tanto en hojas como raíces tuberosas; habiendo mayor expresión -de ambas proteínas- a nivel de raíces tuberosas.
- La concentración aparente de Cry3Ca1 en plantas oscila entre 0.01-0.03 µg/g en hojas y 0.15-1.47 µg/g en raíces tuberosas; mientras que la de Cry7Aa1 varía entre 0.001-0.016 µg/g en hojas y 0.02-0.06 µg/g en raíces tuberosas.
- Los mayores niveles de expresión de las proteínas Cry7Aa1 y Cry3Ca1, en las raíces tuberosas, fueron registradas en los eventos 7, 9 y XV, XII; respectivamente.
- La actividad transcripcional del gen *cry3Ca1* fue mayor que la de *cry7Aa1*. Siendo, los eventos V (*cry3Ca1*) y 7 (*cry7Aa1*) las que mostraron los mayores niveles de transcripción con 54 y 10 veces más de expresión que sus respectivas líneas de referencia.

VIII. RECOMENDACIONES

- Tripsinizar las protoxinas Cry3Ca1 y Cry7Aa1 para obtener sus respectivas toxinas, de forma que se pueda comparar la expresión de las toxinas en plantas con las diluciones de la curva estándar (toxina pura).
- Emplear anticuerpos monoclonales específicos para las toxinas Cry3Ca1 y Cry7Aa1 con la finalidad de mejorar la especificidad de la reacción antígeno:anticuerpo.
- Cuantificar la expresión del transcrito *cry3Ca1* y *cry7Aa1*, mediante qRT-PCR, en las raíces tuberosas.
- Realizar pruebas de toxicidad con los gorgojos africanos, haciendo una dieta con las mejores líneas reportadas.

IX. BIBLIOGRAFIA

- ABATE, T.; VAN HUIS, A.; AMPOFO, J.K (2000): Pest Management Strategies in Traditional Agriculture: An African Perspective. Annual Review Entomology 45:631–659.
- AGBIOS (2009): Manejo de resistencia de insectos. [En línea]. AGBIOS. [Ontario, Canada], 2010. [accedido el 28/05/2009]. Disponible en: <http://www.agbios.com/cstudies.php?book=ESA&ev=MON810&chapter=IRM&lang=ES>
- ALLEN, R.; ROGELJ, S.; CORDOVA, S y T, KIEFT (2006): An inmuno-PCR method for detecting *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. Journal of Immunology Methods 308: 109-115.
- BETZ, S.; HAMMOND, B y R, FUCHS (2000): Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. Regulatory Toxicology and Pharmacology 32:156-173.
- BEUNING L.; MITRA, D.; MARKWICK, N y P, GLEAVE (2001): Minor modification to the *cryIac9* nucleotide sequence are sufficient to generate transgenic plants resistant to *Phthorimaea operculella*. Ann. Appl. Biol. 138: 281-292
- BLASCO, C. (2007): Regeneración *in vitro* vía organogénesis de cinco cultivares de camote (*Ipomoea batatas* Lam.): Tanzania, SPK004, Wagabolige, 199004.2 y Nanshu. Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología. Universidad Agraria La Molina. Lima, Perú. 150pp
- BRASILEIRO, J. C. M.; FRANCISCO, J y L, ARAGAO (2001): Marker genes for *in vitro* selection of transgenic plants. Plant Biotechnology 3:113-121.
- CAMBIA (2010). Cambia Labs: Legacy pCAMBIA vectors [En línea]. CAMBIA. [Brisbane, Australia]. [accedido el 14/02/2008]. Disponible en: http://www.cambia.org/daisy/bioforge_legacy/3724.html
- CARSWELL, G y R, LOCY (1984): Root and shoot initiation by leaf, ítem and storage root explants of sweetpotato. Plant cell, Tissue and Organ Culture 3: 229-236.
- CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. La Batata en Cifras: Producción, Utilización, Consumo, Alimentación [En línea]. CIP. [Lima, Perú]. Febrero, 1999. [accedido el 04/01/2009]. Disponible en: <http://www.cipotato.org/sweetpotato/facts/batacif.pdf>

- CHENG, Z.; SCHNURR, J y J, KAPAUN (1998): Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. *Plant Cell Reports* 17: 646-649.
- CISNEROS, F y J, ALCAZAR (2001): Manejo Integrado del Gorgojo del Camote o Tetuán del Boniato, *Cylas formicarius* (Fab.), en Cuba. Cisneros F. y Alcazar J., eds. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 138 pp.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J y D.H, DEAN D (1998): Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:807-813.
- CUELLAR, W.; GAUDIN, A.; SOLORZANO, D.; CASAS, A.; ÑOPO, L.; CHUDALAYANDI, P.; MEDRANDO, G.; KREUZE, J y M, GHISLAIN (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
- EKOBU, M.; SOLERA, M.; KYAMANYWA, S.; MWANGA, R.; ODONGO, B.; GHISLAIN, M. y W., MOAR (2010): Toxicity of Seven *Bacillus thuringiensis* Cry Proteins Against *Cylas puncticollis* and *Cylas Brunneus* (Coleoptera: Brentidae) using a novel artificial diet. *Entomological Society of America* 103: 1493-1502.
- FAOSTAT. FAO Statistical Database [En línea]. Food and Agriculture Organization of the United Nations [Roma, Italia] Enero, 2011. [accedido el 05/01/2011]. Disponible en:
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- FUJIMOTO, H.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; KYOZUKA, J y K, SHIMAMOTO (1993): Insect resistant rice generated by introduction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* 11:1151-1155.
- GARCIA, R.; MORAN, R.; MENA, J.; SOMONTES, D.; PIMENTEL, E.; ZALDUA, Z.; LOPEZ, A y M, GARCIA (2000): Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Regeneration and Transformation Technology to Provide Weevil (*Cylas formicarius*) Resistance. Field Trial Results. *Plant Genetic Engineering: Towards the Third Millenium A.D.* Arencibia (Editors). Elsevier Science B.V. Pp 112-117.
- GARCIA, R.; SOMONTES, D.; MENA, J.; PIMENTEL, E.; ZALDUA, Z.; LOPEZ, A.; MORAN, R y M, GARCIA. (1999): Plant Regeneration from Leaf and Stem Explants from Two Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L. Lam) cultivars. *Biotechnology Aplicada*. 16: 11-14.

- GELVIN S, B (2003): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The biology behind the “gene-Jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67:16-37.
- GENNISEL, A.; LEPLÉ, J.; MILLET N.; AUGUSTIN, S.; JOUANIN, L y G, PILATE (2003): High tolerance against *Chrysomela tremulae* of transgenic poplar plants expressing a synthetic *cry3Aa* gene from *Bacillus thuringiensis ssp. tenebrionis*
- GHISLAIN, M.; LAGNAOUI, A y T, WALKER (2003): Fulfilling the promise of Bt potato in developing countries. *Journal of New Seeds*. Vol 5 issue 2/3:93-113.
- GOSUKONDA, R.; POROBO DESSAI, A.; BLAY, E.; PRAKASH, C y C, PETERSON (1995a): Thidiazuron-induced Adventitious Shoot Regeneration of Sweet Potato (*Ipomoea batatas*). *In Vitro Cell Development Biology* 31 : 65-71.
- GOSUKONDA, R.; PRAKASH, C y A, DESSAI (1995b): Shoot Regeneration *in vitro* from Diverse Genotypes of Sweetpotato and Multiple Shoot Production per Explant. *HortScience* 30: 1074-1077.
- GOULD, F. (1998): Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating Pest Genetics and Ecology. *Annual Review Entomology* 43: 701-726.
- GRINGORTEN, J.L.; MILNE, R.E.; FAST, P.G.; SOHI, S.S. y K, VAN FRANKENHUYZEN (1992): Suppression of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin activity by low alkaline pH. *J. Invertebrate Pathology* 60, 47-52.
- HAAS, J.; MOORE, L.; REAM, W y S, MANULIS (1995): Universal PCR Primers for Detection of Phytopathogenic *Agrobacterium* Strains. *Applied Environmental Microbiology* 61(8): 2879–2884
- HARLOW, E y D, LANE (1988): *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, USA.
- HATTORI, T. y K., NAKAMURA (1988): Genes coding for the major tuberous root protein of sweet potato: Identification of putative regulatory sequence in the 5' upstream region. *Plant Molecular Biology* 11:417-426.
- HATTORI, T.; NAKAGAWA, S. y K., NAKAMURA (1990): High-level expression of tuberous root storage protein genes of sweet potato in stems of plantlets grown *in vitro* on sucrose medium. *Plant Molecular Biology* 14: 595-604.
- HELLENS R., MULLÍNEAUX, P y H, KLEE (2000): A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trend in Plant Science* 5:446- 451.

- IEAMKHANG, S y O, CHATCHAWANKANPHANICH (2005): Augmentin ® as an alternative antibiotic for growth suppression of *Agrobacterium* for tomato (*Lycopersicon esculentum*) transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82: 213-220.
- JAIN, S. (2001): Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153-166.
- JAMES, C. (2009): Global status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009. *ISAAA Brief* No. 40. ISAAA Ithaca, New York.
- KAPINGA, R.; NAMANDA, S y T, STATHERS (2005): Sweetpotato in Sub-Saharan Africa. En *Manual for sweet potato integrated production and pest management farmer field schools in Sub-Saharan Africa*. Stathers, T., Namanda, S., Mwanga, R.O.M., Khisa, G., Kapinga, R., Eds. International Potato Center. Kampala, Uganda. 168 pp.
- KOZIEL, M. G.; BELAND, G. L.; BOWMAN, C.; CAROZZI, N. B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, S.; LAUNIS, K.; LEWIS, K.; MADDOX, D.; McPHERSON, K.; MEGHJI, M. R.; MERLIN, E.; RHODES, R.; WARREN, G. W.; WRIGHT, M y S, EVOLA (1993): Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* 11:194-200.
- LAMBERT, B.; HOFTE, H.; ANNYS, K.; JANSSENS, S.; SOETAERT, P y M, PEFEROEN (1992a): Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Applied and Environmental Microbiology* 58:2536-2542.
- LAMBERT, B.; THENUIS, W.; AGUDA, R.; VON AUDENHOVE, K.; DECOK, C.; JANSSENS, S.; SEURINCK, J y M, PEFEROEN (1992b): Nucleotide sequence of gene *cryIIID* encoding a novel coleopteran-active crystal protein from strain BTI109P of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*. *Gene* 110 (1): 131-132
- LITZ, R y R, JARRET (1991): Regeneración de Plantas en Cultivo de Tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis (7) pp 152-160. En: Roca, W. M y Mroginski, L.A (eds.). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de La Agricultura Tropical. Cali, Colombia. pxii, 970.
- LUO, H.; MARIA, S.; BENAVIDES, J.; ZHANG, D.; ZHANG, Y y M, GHISLAIN (2006): Rapid genetic transformation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) via organogenesis. *African Journal of Biotechnology* 5: 1851-1857.

- MAEO, K.; TOMIYA, T.; HAYASHI, K.; AKAIKE, M.; MORIKAMI, A.; ISHIGURO, S. y K., NAKAMURA (2001): Sugar-responsible elements in the promoter of a gene for β -amylase of sweet potato. *Plant Molecular Biology*, 46: 627-637.
- MAESHIMA, M.; SASAKI, T. y T., ASahi (1985): Characterization of major proteins in sweet potato tuberous roots. *Phytochemistry* 24(9): 1899-1902.
- MEDINA, L. (1991): Organogénesis *in vitro* a partir de Entrenudos, Raíces y Hojas de nueve Cultivares de Camote (*Ipomoea batatas* Lam.): Aspectos Hormonales e Histológicos. Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú. 179 pp.
- MEIYALAGHAN, S.; JACOBS, J.; BUTLER, R.; WRATTEN, S., y A., CONNER (2006): Transgenic potato lines expressing *cry1Ba1* or *cry1Ca5* genes are resistant to Potato Tuber Moth. *Potato Research* 49: 203-216.
- MOELLENBECK, D.; PETERS, M.; BING, J.; ROUSE, J.; HIGGINS, L., SIMS, L.; NEVSHMAL, T.; MARSHALL, L.; ELLIS, T.; BYSTRAK, P.; LANG, B.; STEWART, J.; KOUBA, K.; SONGAG, V.; GUSTAFSON, V.; NOUR, K.; XU, D.; SWENSON, J.; ZHANG, J.; CZAPLA, T.; SCHWAB, G.; JAYNE, S.; STOCKHOFF, B.; NARVA, K.; SCHNEPF, E.; STELMAN, S.; POUTRE, C.; KOZIEL, M., y N., DUCK (2001): Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from rootworms. *Nature Biology* 19: 668-671.
- MONTALDO, A. (1991): Batata o Camote. En: Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. IICA-OEA. 2da ed. Serie: Colección de Libros y Materiales Educativos N° 21. San José, Costa Rica. 236 pp.
- MORAN, R.; GARCIA, E.; LOPEZ, A.; ZALDUA, Z.; MENA, J.; GARCIA, M.; ARMAS, R.; SOMONTE, D.; RODRIGUEZ, J.; GOMEZ, M, y E, PIMENTEL (1998): Transgenic sweet potato plants carrying the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Plant Science* 139: 175-184.
- NAKAMURA, K.; OHTO, M.; YOSHIDA, N. y K., NAKAMURA (1991): Sucrose-induced accumulation of β -amylase occurs concomitant with the accumulation of starch and Sporamin in leaf-petiole cuttings of sweet potato. *Plant Physiology* 96: 902-909.
- ÑOPO, L.; MEDRANO, G y M, GHISLAIN M (2005): Applied biotechnology laboratory protocols: Genetic engineering of potato and sweet potato: Production, selection, testing. The International Potato Center, Lima, Perú. 87 pp.

- ORMACHEA, M. (2008): Estandarización de un protocolo de cultivo *in vitro* para la regeneración vía organogénesis de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lamarck, 1793) variedades Tanzania y Wagabolige. Tesis para optar el título de Licenciada en Biología. Universidad Ricardo Palma, Lima. 121 p.
- PERLACK, F. J.; DEATON, R. W.; ARMSTRONG, T. A.; FUCHS, R. L.; SIMS, S. R.; GREENPLATE, J y D, FISHHOFF (1990): Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* 8:939-943.
- PERLACK, F. J.; FUCHS, R. L.; DEAN, D. A.; McPHERSON, S.L y D.A., FISHHOFF (1991): Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:3324-3328.
- PERLAK, F.; STONE, T. B.; MUSKOPF, Y. M.; PETERSEN, L. J.; PARKER, G. B.; McPHERSON, S. A.; WYMAN, J.; LOVE, S.; BIEVER, D.; REED, G y D, FISHHOFF (1993): Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Molecular Biology* 22: 313-321.
- POROBO DESSAI, GOSUKONDA, R.; A.; BLAY, E.; KORSI, C.; DUMENYO, F.; MEDINA-BOLIVAR, F y C, PRAKASH. (1995): Plant Regeneration of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) from leaf explant *in vitro* using a two-stage protocol. *Scientia Horticulturae* 62: 217-224
- PRAKASH, C. (1994): Sweet potato biotechnology: Progress and potential. *Biotechnology and Development Monitor* 18:1819-1822.
- PRENTICE, K. (2007): Construcción de 6 vectores binarios para la expresión de las toxinas cristal Cry3Ca1 y Cry7Aa1 en *Ipomoea batatas* Lam. “camote”. Tesis para optar el título de Licenciada en Biología. Universidad Ricardo Palma, Lima. 114 p.
- SALAZAR, L y U, JAYASINGHE (1997): *Techniques in Plant Virology at CIP. Laboratorio de Virología del Centro Internacional de la Papa. Lima - Perú*
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R y D.H., DEAN (1998): *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 775-806.
- SHELTON, A; TANG, J; ROUSH, R; METZ, T y E, EARLE (2000): Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. *Nature Biotechnology* 18, 339-342.

- SHELTON, A.; ZHAO, J y R, ROUSH (2002): Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annu. Rev. Entomol.* 47:845-881.
- SIHACHAKR, D.; HAICOUR, R.; CAVALCANTE ALVES, J.M.; UMBOH, D.; SERVAES, A y G, DUCREUX (1997): Plant Regeneration in Sweet potato (*Ipomoea batatas* L., Convolvulaceae). *Euphytica* 96: 143-152.
- SOLERA, M. (2008): Evaluation of *Bacillus thuringiensis* toxins against African sweetpotato weevils (*Cylas puncticollis* (Boheman) and *Cylas brunneus* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae). Thesis to obtain the title of Magister Scientiae. Makerere University.
- SMIT, N y A, VAN HUIS (1998): Biology of the African Sweetpotato Weevil Species *Cylas puncticollis* (Boheman) and *C. brunneus* (Fabricius) (Coleoptera: Apionidae). *Insect Science and its Application* 18: 93-100.
- SOBERON, M y A, BRAVO (2009): *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. Departamento de Microbiología Molecular. Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlínea/CAPITULO_16/Capitulo16.pdf.
- STATHERS, T.; REES, D.; KABI, S.; MBILINYI, L.; SMIT, N.; KIOZYA, H.; NYANGO, A y D, JEFFRIES (2003): Sweetpotato infestation by *Cylas* spp. in East Africa. 1: Cultivar differences in field infestation and the role of plant factors. *International Journal of Pest Management* 49(2):131–140.
- STEWART, C. N.; ADNAG, M. J.; ALL, J. N.; RAMACHANDRAN, S. y W.A., PARROT (1996): Genetic transformation, recovery and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene. *Plant physiology* 112:121-129.
- TABASHNIK, B.; VAN RENSBURG, J y Y, CARRIERE (2009): Field-Evolved insect resistance to Bt Crops: Definition, Theory, and Data. *Entomological Society of America.* 102(6): 2011-2025.
- TANG, W.; CHEN, H.; XU, C.; LI, X.; LIN, Y. y O., ZHANG (2006): Development of insect-resistant transgenic indica rice with a synthetic *cryIC** gene. *Molecular Breeding* 18:1-10.
- TZFIRA, T y V, CITOVSKEY (2000): From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology* 1(4): 202-212.

- VALDERRAMA, A.; ARANGO, R y L, AFANADOR (2005): Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: “Ingeniería genética natural aplicada”. Medellín. Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín 58:1.
- VALDERRAMA, A.; VELASQUEZ, N.; RODRIGUEZ, E.; ZAPATA, A.; ABBAS ZAIDI, M.; ALTOSAAR, I y R, ARANGO (2007): Resistencia to the Guatemala potato moth, *Tecia solanivora* Povolny in three transgenic Andean varieties of potato *Solanum tuberosum* L. expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protein. Journal of Economic Entomology 100(1):172-179.
- VAUGHN, T.; CAVATO, T.; BRAR, G.; COOMBE T.; DEGOOYER, T.; FORD, S.; GROTH, M.; HOWE, A.; JOHNSON, S.; KOLACZ, K.; PILCHER, C.; PURCELL, J.; ROMANO, C.; ENGLISH, L., y J., PERSHING (2005): A method of controlling Corn Rootworm Feeding using a *Bacillus thuringiensis* protein expressed in transgenic maize. Crop Sciences 45: 931-938.
- YOSHIDA, N.; HAYASHI, K., y K., NAKAMURA (1991): A nuclear gene encoding β -amylase of sweet potato. Gene 120:255-259.

X. ANEXOS

10.1 TABLAS

Tabla 1. Lista de las bacterias utilizadas en la presente investigación

Bacteria	Código*	Cepa	Plásmido	Construcción	Marcador de selección
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AT126	EHA105	pCIP78	β -amy: cry7Aa1	nptII
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AT127	EHA105	pCIP79	gSPOA1: cry3Ca1	nptII
<i>Escherichia coli</i>	EC105	DH5 α	PCIP78	β -amy: cry7Aa1	nptII
<i>Escherichia coli</i>	EC186	DH5 α	PCIP79	gSPOA1: cry3Ca1	nptII

*Código perteneciente a la Colección de Bacterias del Laboratorio de Biología Molecular, CIP.

Tabla 2. Medio MPB

Reactivo	For 1L
Sales MS (CAISSON)	4.43 g
Sucrosa	30 g
MPB Store	5 ml

Tabla 3. MPB store

Reactivos	1 L
Ácido ascórbico	40 g
L-arginina	20 g
Putrescina	4 g
Ácido giberélico	4 g
Pantotenato de Calcio	0.4 g
Agua destilada	1000 ml

Tabla 4. Medio MIB

Reactivos	1 L
Sales MS	4.43 g
Sucrosa	30 g
Acetosiringona*	30 mg
4-Fa*	0.2 mg
Gelrite	2 g

Ajustar a pH 5.5 y autoclavar a 121° C por 15 minutos.

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio

Tabla 5. Medio MO-4FA

Reactivos	1 L
Sales MS	4.43 g
Sucrosa	30 g
4-Fa*	0.2 mg
Kanamicina*	50 mg
Timetin*	200 mg
Gelrite	2 g

Ajustar a pH 5.8 y autoclavar a 121° C por 15 minutos.

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio

Tabla 6. Medio MO-Zea

Reactivos	1 L
Sales MS	4.43 g
Sucrosa	30 g
Zeatina Ribosida*	0.2 mg
Kanamicina*	50 mg
Cefotaxima*	200 mg
Gelrite	2 g

Ajustar a pH 5.8 y autoclavar a 121° C por 15 minutos.

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio

Tabla 7. Medio 303

Reactivos	1 L
Sales MS	4.43 g
Manitol	20 g
Glucosa	20 g
MES	0.5 g
Polivinil pirrolidona (PVP)	0.5 g
Glutamina	0.2 g
Adenina (sulfato)	0.04 g
Phytigel	3 g
Vitaminas GAP*	1 ml
Zeatina Ribosida*	1 mg
ANA*	0.1 mg
Kanamicina*	100 mg

Ajustar a pH 5.8 y autoclavar a 121° C por 15 minutos.

* Agregar después de autoclavar y enfriar el medio

Tabla 8. Gel de agarosa al 1%

Compuesto	100 ml
Agarosa (1%)	1 gr
Buffer TBE 1X	100 ml
Bromuro de etidio *	1 µl

* Agregar el bromuro de etidio en la solución entibiada, mezclar y dispensar en el molde. Buffer TBE 10X: Tris Base 108 g; ácido bórico 55 g; EDTA (0.5 M pH 8) 40 ml; agua destilada 1000 ml.

Tabla 9. Buffer CTAB 2X

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

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

Tabla 14. Buffer TBS

Compuesto	1 L
Tris Base	2.82 g
NaCl	29.22 g

Ajustar a pH 7.5 con HCl (37%)

Tabla 15. Buffer de absorción de anticuerpos inespecíficos

Compuesto	50 ml
Buffer TBS	50 ml
Leche en polvo	1 g
Hoja fresca no transformada (control)	1.66 g

La hoja se tritura en este buffer, se deja sedimentar por 30 minutos y se filtra el sobrenadante.

Tabla 16. Buffer T-TBS

Compuesto	1 L
TBS	1000 ml
Tween-20 (0.05%)	500 μ l

Tabla 17. Buffer de extracción

Compuesto	50 ml
Tris -HCl (0.25M)	50 ml
EDTA (5mM)	0.09 g
Acido ascórbico (0.1%)	0.05 g

Tabla 18. Laemli buffer

Compuesto	50 ml
Glicerol (20%)	10 ml
SDS (2%)	1 g
Tris-HCl 1M (pH 6.8)	35 ml
B-mercaptoetanol (10%)	5 ml
Bromofenol azul (0.1%)	0.05 g

Tabla 19. Gel de acrilamida 10%

Compuesto	10 ml (10%)
Agua destilada	2.72 ml
Tris-HCl 1M (pH 8.8)	3.75 ml
SDS (10%)	100 μ l
Acrilamida/Bis (30%/0.8%)	3.3 ml
APS (10%)	300 μ l
TEMED	20 μ l

Compuesto	10 ml (4%)
Agua destilada	7.2 ml
Tris-HCl 1M (pH 6.8)	1.25 ml
SDS (10%)	100 μ l
Acrilamida/Bis (30%/0.8%)	1.34 ml
APS (10%)	300 μ l
TEMED	20 μ l

Tabla 20. Buffer de transferencia 1X

Compuesto	1 L
Buffer de transferencia 10X (25mM)	200 ml
Metanol (20%)	200 ml
Agua destilada	800 ml

Buffer de transferencia 10X: Tris-Base (250 mM) 30.20g; Glicina (1.92 M) 144 g; agua destilada 1000 ml.

Guardar a 4°C

Tabla 21. Buffer de corrida 1X

Compuesto	1 L
SDS (10%)	10 ml
Buffer de corrida 10X	100 ml
Agua destilada	890 ml

Buffer de corrida 10X: Tris-Base (250 mM) 30.20g; Glicina (1.92 M) 144 g; agua destilada 1000 ml.

Guardar a 4°C

Tabla 22. Buffer de diálisis (5mM)

Compuesto	1 L
KH ₂ PO ₄	0.1 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1.45 g
NaCl (69 mM)	4 g
KCl (1.4 mM)	0.1 g
NaN ₃ (1.5 mM)*	0.1 g
PBS (1/2)	1000 ml

* Solo si la solución se va almacenar varios días. Ajustar a pH 7.4

Tabla 23. Buffer PBS

Compuesto	1 L
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2.9 g
NaCl (137 mM)	8 g
KCl (2.7 mM)	0.2 g
NaN ₃ (3 mM)*	0.2 g
Agua destilada	1000 ml

* Solo si la solución se va almacenar varios días. Ajustar a pH 7.4

Tabla 24. Buffer de cobertura

Compuesto	1 L
Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃ *	2.93 g
NaN ₃ (3 mM) *	0.195 g
Agua destilada	1000 ml

Tabla 25. Buffer de maceración

Compuesto	100 ml
PBS Tween-20	100 ml
PVP-40 (2%)	2 g
Leche en polvo (1%)	1 g

Tabla 26. Buffer de conjugado

Compuesto	100 ml
PBS Tween-20	100 ml
PVP-40 (2%)	2 g
Leche en polvo (0.2%)	0.2 g

Tabla 27. Agua DEPC (1X)

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

Dejar disolviendo 24 horas en oscuridad, autoclavar y enfriar.

Tabla 28. Gel de agarosa 2%

Compuesto	100 ml
Agarosa (2%)	2 gr
Buffer TBE 1X-DEPC	100 ml
Bromuro de etidio *	2 μ l

* Agregar el bromuro de etidio en la solución entibiada, mezclar y dispensar en el molde.

Tabla 29. Buffer TBE 1X - DEPC

Compuesto	1 L
Agua DEPC	900 ml
Buffer TBE 10 X-DEPC	100 ml

Buffer TBE 10X-DEPC: Tris Base 108 g; ácido bórico 55 g; EDTA (0.5 M pH 8) 40 ml; agua DEPC 1000 ml.

Tabla 41. Promedio de cuantificación de la proteína Cry7Aa1 (µg/gr) en hojas de invernadero

Cry7Aa1 en hojas	Líneas	Repeticiones			Cry7Aa1 (µg/gr)
		1	2	3	
	5	0	0	0	0
	7	0.031746	0.001943	0.0156977	0.016
	9	0.000229	0.001528	0	0.001
	12	0.001176	0	0	0.000
	14	0	0	0	0.000
	17	0.018246	0	0.008093	0.009
	20	0	0.001	-	0.0005

Tabla 42. Promedio de cuantificación de la proteína Cry3Ca1 (µg/gr) en hojas de invernadero

Cry3Ca1 en hojas	Líneas	Repeticiones		Cry3Ca1 (µg/gr)
		1	2	
	I	0.034	0.003	0.019
	III	0.061	0.005	0.033
	V	0.041	0.004	0.023
	VII	0.027	0.002	0.015
	XI	0.016	0.003	0.010
	XII	0.029	0.001	0.015
	XIII	0.018	0	0.009
	XIV	0.011	0	0.006
	XV	0.026	0.003	0.015

Tabla 43. Promedio de cuantificación de la proteína Cry3Ca1 ($\mu\text{g}/\text{gr}$) en raíces tuberosas

Cáscara de raíces tuberosas Cry3Ca1			
Líneas	Repeticiones		Promedio ($\mu\text{g}/\text{gr}$)
	1	2	
III	0	0	0.00
XIII	0.05	0.24	0.15
XV	0	2.93	1.47

Pulpa de raíces tuberosas Cry3Ca1			
Líneas	Repeticiones		Promedio ($\mu\text{g}/\text{gr}$)
	1	2	
III	0	0	0.00
XII	0.39	0.89	0.64
XIII	0.82	0	0.41
XV	0.97	0.34	0.66

Tabla 44. Promedio de cuantificación de la proteína Cry7Aa1 ($\mu\text{g}/\text{gr}$) en raíces tuberosas

Cáscara de raíces tuberosas Cry7Aa1			
Líneas	Repeticiones		Promedio ($\mu\text{g}/\text{gr}$)
	1	2	
7	0.04	0.08	0.06
9	0.01	0.09	0.05
14	0.01	0.07	0.04
17	0.05	0.31	0.025

Pulpa de raíces tuberosas Cry7Aa1			
Líneas	Repeticiones		Promedio ($\mu\text{g}/\text{gr}$)
	1	2	
7	0.03	0.05	0.04
9	0.02	0.01	0.015
14	0.01	0.03	0.02
17	0.01	0.05	0.03

10.2 FIGURAS

Figura 15. Dilución de anticuerpos Cry7Aa1 (IgG:IgG conjugada) 1/500:1/500, 1/1000:1/1000, 1/1500:1/1500.

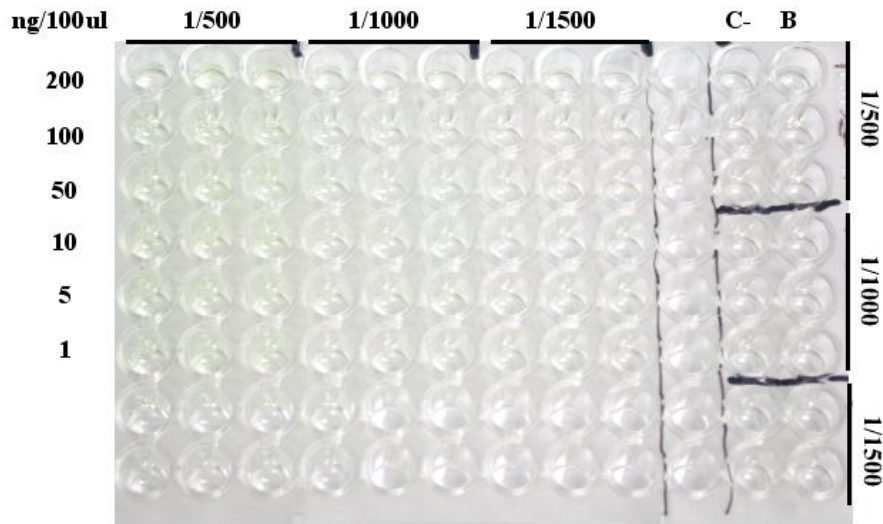


Figura 16. Dilución de anticuerpos Cry3Ca1 (IgG:IgG conjugada) 1/500: 1/100, 1/500:1/250, 1/500:1/500

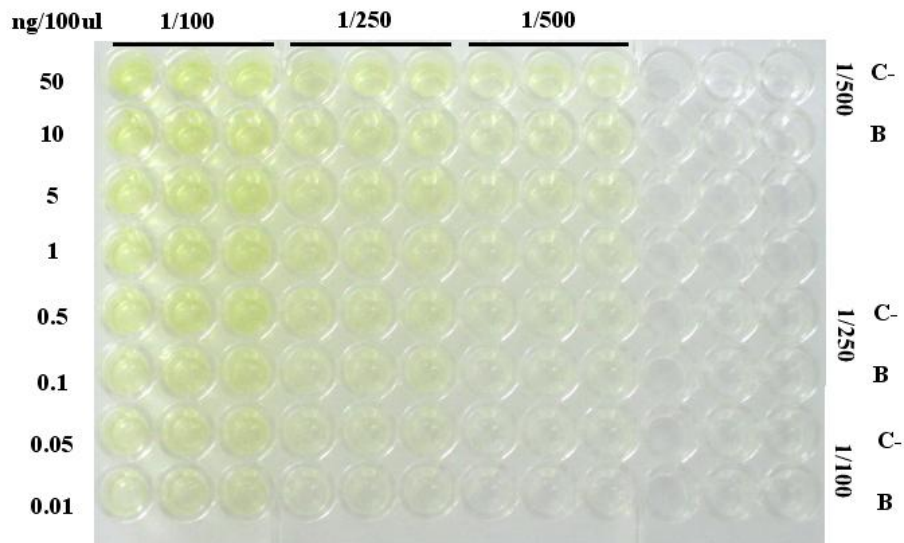


Figura 24. Raíces tuberosas producidas en el invernadero de bioseguridad

