

# UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias Agrarias

Escuela de Agronomía

Protocolo de transformación genética de tres cultivares de papa *Solanum tuberosum* L. ssp *tuberosum*. (Hawkes), con el gen magainina 2 mediante *Agrobacterium tumefaciens* (Sm. y Town.) Conn.

Tesis presentada como parte  
de los requisitos para optar al  
grado de Licenciado en  
Agronomía

**Alejandro Esteban Torres Barrientos**

Valdivia Chile 2002

**PROFESOR PATROCINANTE:**

Maria Ximena Henzi Gutierrez

Ing. Agr. Ph. D.

---

**PROFESORES INFORMANTES:**

Ilona Concha Grabinger.

Bioquimico. M. Sc., Dr en Ciencias..

---

Andres Contreras Mendez.

Ing. Agr.

---

Ricardo Riegel Schlegel

Ing. Agr. Dr. Rer. For.

---

## **Agradecimientos**

En primer lugar quisiera dar las gracias a la Prof. Patrocinante de esta tesis Ximena Henzi G. por su colaboración y gran apoyo a lo largo de toda esta investigación. También agradecer a los informantes Profesor Andrés Contreras y Ricardo Riegel. A la profesora Ilona Concha por su apoyo a lo largo de toda esta tesis y en especial en la últimas etapas, así también agradecer a la Prof. Andrea Báez.

Agradecer al Prof. A.J. Conner Ph.D. Crop & Food Research., Nueva Zelanda. Al Laboratorio de cultivo de Tejidos de la Universidad Austral de Chile, donde se realizo esta tesis. Al Dr. Carlos Farias del Instituto de Patología Animal y a su equipo de trabajo por el apoyo brindado.

Quisiera Agradecer al Prof. Peter Seemann y a Sr. Carlos Puschel por las excelentes fotografías que complementan esta tesis.

También quisiera dar las gracias a Sandra Ascencio y Judith Carrasco por el apoyo y compañía en el Laboratorio de Cultivo de tejidos Vegetales, así también a Inés Mora.

Agradecer a las Secretarias del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal Irene y Jessica; a Silvia y Maria Luisa por su ayuda y apoyo brindado a lo largo de todos mis años de estudios.

Agradecer a mis amigos que estuvieron siempre a mi lado cuando los necesite como Loreto, Rola, Helga, Odeth, Ilona, Claudia, Manuel, Cesar, Pato, Danilo, Matías y a todos cuantos participaron de esta tesis.

***A Dios***

***A Mis Padres Ana Luisa y Juan***

## INDICE DE MATERIA

| Capítulo                                                           | Página |
|--------------------------------------------------------------------|--------|
| 1        INTRODUCCION                                              | 1      |
| 2        REVISION BIBLIOGRAFICA                                    | 3      |
| 2.1      Enfermedades en el sur de Chile                           | 3      |
| 2.1.1    Pudriciones blandas                                       | 4      |
| 2.1.1.1   Síntomas                                                 | 5      |
| 2.1.1.2   Medidas de manejo                                        | 6      |
| 2.1.2    Sarna común                                               | 7      |
| 2.1.2.1   Síntomas                                                 | 8      |
| 2.1.2.2   Medidas de manejo                                        | 9      |
| 2.2      Mejoramiento de la papa                                   | 9      |
| 2.3      Péptidos líticos                                          | 11     |
| 2.3.1    Tipos                                                     | 11     |
| 2.3.1.1   Magainina                                                | 12     |
| 2.3.1.2   Cecropina                                                | 12     |
| 2.3.2    Aplicaciones de los péptidos líticos                      | 13     |
| 2.4      Metodologías de obtención de plantas transgénicas         | 14     |
| 2.4.1    Género <i>Agrobacterium</i>                               | 14     |
| 2.4.1.1   Proceso de transferencia del T-DNA                       | 16     |
| 2.5      Transformación                                            | 18     |
| 2.5.1    Inoculación y co-cultivo                                  | 18     |
| 2.5.2    Eliminación                                               | 20     |
| 2.5.3    Selección                                                 | 20     |
| 2.5.4    Regeneración                                              | 21     |
| 2.6      Factores que influyen en la transformación de los tejidos | 21     |
| 2.7      Confirmación de la inserción de los genes                 | 23     |

| Capítulo |                                                                                                      | Página |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 3        | MATERIAL Y METODOS                                                                                   | 24     |
| 3.1      | Ubicación                                                                                            | 24     |
| 3.2      | Material vegetal                                                                                     | 24     |
| 3.2.1    | Mantenimiento de las plantas                                                                         | 24     |
| 3.3      | Cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>                                                            | 24     |
| 3.3.1    | Mantenimiento de las bacterias                                                                       | 25     |
| 3.4      | Transformación de los cultivares                                                                     | 26     |
| 3.4.1    | Comprobación de la transformación de las plantas con el gen NFTII                                    | 26     |
| 3.5      | Efecto de la dilución en la transformación del cultivar Desirée<br>(Primer experimento)              | 27     |
| 3.6      | Forma de corte en explantes de entrenudo (Segundo experimento)                                       | 30     |
| 3.7      | Efecto del cultivar y tipo de explante sobre el porcentaje de<br>transformación (Tercer experimento) | 31     |
| 3.7.1    | Análisis estadístico para el experimento 3                                                           | 31     |
| 3.7.2    | Tipos de explantes                                                                                   | 32     |
| 3.7.3    | Evaluaciones en callo y regeneración                                                                 | 32     |
| 3.8      | Análisis molecular                                                                                   | 33     |
| 4        | PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS                                                               | 34     |
| 4.1      | Método de utilización de bacterias                                                                   | 34     |
| 4.2      | Efecto de la forma de corte en explantes de entrenudo                                                | 35     |
| 4.3      | Explantes de entrenudo y hoja                                                                        | 38     |
| 4.3.1    | Tipo de explante y cultivar                                                                          | 41     |
| 4.4      | Respuesta de cultivares                                                                              | 42     |
| 4.5      | Proceso de regeneración                                                                              | 43     |
| 4.6      | Análisis molecular                                                                                   | 48     |
| 5        | CONCLUSIONES                                                                                         | 50     |
| 6        | RESUMEN                                                                                              | 51     |

| Capítulo       | Página |
|----------------|--------|
| SUMMARY        | 52     |
| 7 BIBLIOGRAFÍA | 53     |
| ANEXOS         | 60     |

**INDICE DE CUADROS**

| Cuadro |                                                                                                                                                                           | Página |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1      | Resumen de ensayos de campo realizados en Estados Unidos, entre 1987 y 1999, subdivididos en periodos de tres años, de acuerdo a las categorías del material transgénico. | 11     |



## INDICE DE FIGURAS

| Figura |                                                                                                                                                                            | Página |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1      | Síntomas provocados por <i>Erwinia</i> en tubérculos y en campo, en plantas de papa.                                                                                       | 5      |
| 2      | Síntomas en tubérculos de papa provocados por <i>S. scabies</i>                                                                                                            | 8      |
| 3      | Mapa de un plasmidio Ti nopalina                                                                                                                                           | 15     |
| 4      | Proceso de transformación                                                                                                                                                  | 19     |
| 5      | Plasmidio pBINPLUS                                                                                                                                                         | 25     |
| 6      | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en medio LB                                                                                                                               | 25     |
| 7      | Medio de cultivo líquido L.B para <i>A. tumefaciens</i> sin bacterias (izquierda) y con bacterias (derecha)                                                                | 26     |
| 8      | Representación de los pasos de una transformación y resumen de los factores a estudiar para los tres experimentos                                                          | 27     |
| 9      | Tipo de corte en explantes de entrenudo                                                                                                                                    | 28     |
| 10     | Secado de los explantes en papel filtro estéril                                                                                                                            | 29     |
| 11     | Disposición explantes en placa                                                                                                                                             | 29     |
| 12     | Corte en explantes de hoja                                                                                                                                                 | 32     |
| 13     | Número de explantes que presentaron callos transgénicos en explantes de entrenudo del cultivar Desirée, al utilizar <i>A. tumefaciens</i> en forma diluida y sin dilución. | 35     |
| 14     | Número de explantes que presentaron callos transgénicos en explantes de entrenudo del cultivar Desirée, cortados en forma longitudinal y en forma de disco.                | 36     |
| 15     | Número de explantes con callos transgénicos según el tipo de corte en relación a la cobertura de callos por explante                                                       | 37     |
| 16     | Número de explantes con brotes transgénicos del cultivar Desirée, según el tipo de corte y su respuesta en cobertura de brotes por explante.                               | 37     |
| 17     | Distintos grados de transformación en explantes de entrenudo                                                                                                               | 38     |

## Figura

## Página

|    |                                                                                                                                                                              |    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 18 | Presencia de callos en las zonas de corte en explantes de hoja                                                                                                               | 38 |
| 19 | Porcentaje de callos transgénicos relativos al tipo de explante                                                                                                              | 40 |
| 20 | Porcentajes de brotes transgénicos según tipo de explante                                                                                                                    | 40 |
| 21 | Porcentaje de explantes con sobrecrecimiento de <i>A. tumefaciens</i>                                                                                                        | 41 |
| 22 | Porcentaje de callos transgénicos de tres cultivares, según tipo de explante                                                                                                 | 42 |
| 23 | Porcentaje de callos transgénicos, de acuerdo al cultivar                                                                                                                    | 43 |
| 24 | Porcentaje de brotes transgénicos a los 7 días en regeneración, de acuerdo a la fuente de citoquinina a utilizar                                                             | 44 |
| 25 | Porcentaje de brotes transgénicos a los 28 días en regeneración, de acuerdo a la fuente de citoquinina a utilizar                                                            | 45 |
| 26 | Porcentaje de brotes transgénicos, según cultivar                                                                                                                            | 46 |
| 27 | Brotes transgénicos de tres cultivares, relativos al tipo de citoquinina a utilizar                                                                                          | 47 |
| 28 | Distintos grados de brotación en explantes de entrenudo                                                                                                                      | 47 |
| 29 | Planta <i>in vitro</i> transgénica del cultivar Desirée                                                                                                                      | 48 |
| 30 | Gel de electroforesis que compara 4 plantas transgénicas Desirée (hoja y tallo) con el gen NPTII, con respecto a un testigo del mismo cultivar sin la presencia de dicho gen | 49 |

**INDICE DE ANEXOS**

| Anexo |                                                                                                                                           | Página |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1     | Medio LB sólido                                                                                                                           | 61     |
| 2     | Medio LB líquido                                                                                                                          | 61     |
| 3     | Prueba de independencia entre dilución y la presencia de callo                                                                            | 62     |
| 4     | Prueba de independencia entre la presencia de callo y la forma de corte en explantes de entrenudo                                         | 62     |
| 5     | Prueba de independencia entre la cobertura de callo por explante y la forma de corte                                                      | 63     |
| 6     | Prueba de independencia entre la cobertura de brotes por explante y la forma de corte                                                     | 63     |
| 7     | Análisis de varianza en relación al porcentaje de explantes con callo, según los factores cultivar y explante                             | 64     |
| 8     | Análisis de varianza en relación al porcentaje de explantes con brotes a los 7 días en regeneración, según los factores explante y método | 65     |
| 9     | Análisis de varianza en relación al porcentaje de brotes regenerados a los 28 días, según los factores cultivar, explante y método        | 66     |
| 10    | Análisis de Kruskal-Wallis para contaminación en explantes de hoja y entrenudo                                                            | 67     |

## 1 INTRODUCCION

Dentro de las enfermedades causadas por bacterias, que atacan al cultivo de la papa en el sur de Chile, se destaca el género *Erwinia*, el cual, ya sea en campo o en almacenaje provoca severas pudriciones blandas; y el género *Streptomyces* cuyo efecto es reducir la calidad de los tubérculos. Frente a esta situación, se puede señalar que las formas de enfrentar los problemas causados por este grupo de agentes son de manera principalmente preventiva.

La introducción de resistencias contra estas enfermedades a líneas genéticamente avanzadas o a cultivares, utilizando el mejoramiento tradicional a partir de material resistente, se ve limitado por la dificultad de mantener las características genéticas del cultivar utilizando este tipo de mejoramiento.

La ingeniería genética representa una alternativa de mejoramiento interesante de evaluar ya que, no sólo se limita a la resistencia presente en plantas similares, sino también, abre una mayor alternativa de genes a utilizar de distintas especies. La utilización de genes de acción lítica tales como magainina 2, contra bacterias, representarían una opción que ayuda a reducir las pérdidas producidas por estas bacterias. Además, esta metodología permitiría mantener las características que hacen interesante a un cultivar.

Para el proceso de transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* existen numerosos protocolos publicados para *Solanum tuberosum*, los que presentan diferencias entre si. En esta tesis se compararán estas metodologías, con el objetivo de determinar la más eficiente, en relación a inoculación y tratamiento de los explantes previo y durante el proceso de transformación y regeneración, que conduzcan a generar un protocolo que permita la transferencia de genes líticos a cultivares de papa de importancia económica en Chile.

Los objetivos específicos de esta tesis son:

- Establecer una metodología de inoculación eficiente para *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105/pBINPLUS.
- Evaluar la respuesta de transformación de los distintos tipos de explantes (hojas, tallos).
- Determinar una metodología que permita una rápida regeneración de las células transformadas.
- Determinar la respuesta de los cultivares Desirée, Kennebec y Shepody a la transformación en relación a la presencia de callo y regeneración de éstos.
- Evaluar a través de la reacción en cadena de la polimerasa, la inserción de los genes transferidos, neomicina fosfotransferasa II (NFTII).

## 2 REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Enfermedades en el sur de Chile.

La principal zona productora de papas semillas y consumo en Chile, esta representada por la Décima Región. Este cultivo constituye una alternativa de rotación y una fuente de trabajo e ingresos para la región (ACUÑA, 1993). Además, la zona ofrece una serie de condiciones de clima y suelo ideales para su producción, así como también, no presentar enfermedades descalificadoras tales como la marchitez bacteriana *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi, el carbón de la papa *Angiosorus solani* Thirumulachar & O`Brein y el nemátodo dorado *Heterodera rostochiensis* Wollenweber (CONTRERAS, 1991).

Entre las principales enfermedades que atacan al cultivo, en el sur de Chile, se destacan dentro de los hongos: el tizón tardío de la papa provocado por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, tizón temprano causado por *Alternaria solani* Sorauer, sarna negra *Rhizoctonia solani* Kühn, fusariosis (*Fusarium sp*), sarna polvorulenta *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh. Dentro de las bacterias se destaca la sarna común *Streptomyces scabies* (Thaxter) Waksman y Henrici y las pudriciones húmedas producidas por *Erwinia spp* (CONTRERAS, 1997).

Según WILSON y CONNER (1995), la sarna común, el pie negro y las pudriciones blandas en los tubérculos; provocan serias pérdidas a nivel mundial debido a la reducción en la producción y calidad; con el consecuente aumento de costos, producto del manejo. Estas enfermedades se encuentran entre los problemas fitopatológicos de importancia en la décima región para el cultivo de la papa (ACUÑA, 1994).

Según ACUÑA y RIFFO (1993), en prospecciones hechas para detectar la presencia de infecciones latentes de *Erwinia spp* en semilleros de la Décima Región, en Chile, el porcentaje varía entre 40 a 100% para semilla prebásica y básica, lo que indica la alta cantidad de tubérculo semilla que tiene la bacteria presente.

En condiciones de campo y almacenaje se pierde alrededor de un 5% y un 10% de túberos respectivamente, pudiendo presentarse pérdidas superiores al 20% en cultivos de papas provenientes de tubérculos con la infección latente y en ausencia de otra enfermedad (Ciampi *et al.*, 1983 citado por ACUÑA y RIFFO, 1993).

En la Décima Región, en relación a inspecciones realizadas a semilleros de Palena, Llanquihue, Chiloé y Valdivia; en patologías a nivel de piel; la sarna común representa la tercera en importancia después de la sarna plateada y sarna negra o rhizoctoniasis.<sup>1</sup>

**2.1.1 Pudriciones Blandas.** Las enfermedades que generan las *Erwinias* pectinolíticas son complejas ya que envuelve varias especies y subespecies de bacterias, por los diferentes tejidos que atacan y por las distintas fuentes primarias de inóculo (DE BOER, 1994).

Dentro de las pudriciones blandas, *Erwinia carotovora* ssp *carotovora* (Jones) Bergey *et al.* (Ecc) es la más común, pareciendo ser la más importante en el género; mientras *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica* (Van Hall) Dye (Eca) es una variante de temperaturas más bajas, limitándose sólo al cultivo de la papa (AGRIOS, 1995).

Según CIAMPI *et al.* (1991), *Erwinia carotovora* es un importante patógeno que causa pérdidas de plantas y tubérculos en condiciones de campo, mientras bajo condiciones de almacenaje las cepas de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Erwinia*; son más importantes.

Eca y Ecc son bacterias que poseen forma de bastón, flagelo peritrico, tamaño aproximado de 0,7 a 1,5 µm, que no forman endosporas y son aerobios facultativos (CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA CIP, 1980). Son habitantes del suelo, donde pueden sobrevivir asociados a restos de tubérculos, plantas o persistir en suelos húmedos y templados fríos (LATORRE, 1992).

De acuerdo a CIAMPI *et al.* (1991), en aislamientos realizadas en el sur de Chile, a partir de tubérculos enfermos en almacenaje, se puede apreciar que las principales

---

<sup>1</sup> CHILE, Servicio Agrícola Ganadero (SAG). 1999. Décima Región. Comunicación Personal.

bacterias presentes son Eca y Ecc. Bajo condiciones óptimas de almacenaje estas bacterias pueden permanecer pasivas, pero si el tubérculo está húmedo, con mala ventilación o su superficie está dañada, las bacterias proliferan causando las pérdidas (DE BOER, 1994).

2.1.1.1 Síntomas. De acuerdo a AGRIOS (1995), las lesiones producidas por las pudriciones húmedas comienzan con pequeñas manchas líquidas que crecen en diámetro, profundizan y producen un ablandamiento del tejido, lo que es bien definido en un principio, pero luego toma una coloración crema mucilaginosa, formando una masa desorganizada de células. En la Figura 1 se pueden observar tubérculos afectados.



**FIGURA 1** Síntomas provocados por *Erwinia* en tubérculos y en campo, en plantas de papa.

FUENTE: Adaptado de CIP (1980).

Las bacterias invaden los espacios intercelulares donde se multiplican y generan enzimas pectinolíticas, que macera los tejidos por la destrucción de la lámina media. También pueden producir pequeñas cantidades de enzimas celulolíticas que provoca la difusión del agua desde las células al espacio intercelular, con lo cual la célula se plasmoliza y muere (AGRIOS, 1995; CIP, 1980).

El tejido afectado por pudriciones, toma una coloración crema o canela y consistencia blanda granular, cuya separación del tejido sano se demarca fácilmente por la formación de bordes castaños a negros. Es inodora y a medida que la pudrición avanza toma un olor desagradable, consistencia viscosa y pegajosa, debido a la llegada de organismos secundarios (CIP, 1980).



Asociadas a pudriciones blandas, se pueden encontrar también bacterias pectinolíticas de los géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Flavobacterium* (CIP, 1980).

Tubérculos afectados por estas bacterias, desarrollan una apariencia externa intacta, pero poseen internamente un líquido turbio, el cual puede salir al exterior por agrietaduras tomando una coloración gris, canela o café oscura al contacto con el aire (AGRIOS, 1995).

La enfermedad puede aparecer primeramente en campo cuando se parte desde semilla infectada, además, la infección se puede producir por heridas o por invasión a través de las lenticelas. La dispersión, tanto en campo como en almacenaje, se facilita por la acción de insectos (AGRIOS, 1995).

El “pie negro”, causado por Eca. provoca la aparición de un ennegrecimiento de la parte basal del tallo desde el tubérculo semilla, lo que se acompaña con necrosis vasculares por sobre las lesiones. En la Figura 1, es posible apreciar esta sintomatología (DE BOER, 1994; LATORRE, 1992). Estas lesiones pueden abarcar todo o parte del tallo, el follaje se puede tornar clorótico, las hojas pueden enrollarse hacia arriba en un comienzo, marchitarse y morir. Los brotes antes de emerger pueden ser invadidos y morir (CIP, 1980).

2.1.1.2 Medidas de manejo. Las pudriciones blandas se pueden reducir evitando la humedad excesiva del suelo durante la cosecha, lo que reduce la posibilidad de infecciones por lenticelas, cosechando a temperaturas menores a 20°C, reduciendo el daño de tipo mecánico en los tubérculos, protegiéndolos de la desecación o la radiación solar directa (CIP, 1980; DE BOER, 1994; LATORRE, 1992).

Los tubérculos, antes del almacenamiento deben ser enfriados a temperaturas menores de 10°C, para luego mantenerlos a temperaturas de 1,6 °C a 4,5°C, con buena ventilación, bajo contenido de CO<sub>2</sub>. Se debe impedir la formación de películas de líquido sobre los tubérculos que favorece las pudriciones (AGRIOS 1995; CIP, 1980)

Según AGRIOS (1995), se deben desechar los tubérculos dañados o en malas condiciones, eliminar los focos de infección que aparezcan en el almacenamiento y desinfectar el lugar de almacén.

Lograr una buena suberización de los tubérculos antes de la siembra o una desinfección de éstos, ayuda a reducir las infecciones provocadas por *Fusarium* que predisponen a la acción de las bacterias del género *Erwinia*. Otra medida importante sería la de arrancar aquellas plantas que presentes síntomas en terreno (CIP, 1980).

**2.1.2 Sarna común.** La sarna común de la papa causada por *S. scabies*, se encuentra a través de todo el mundo siendo más frecuente en suelos arenosos, con pH neutros a ligeramente alcalinos y en años con relativa sequía (AGRIOS, 1995).

Las lesiones en los tubérculos son superficiales, erupciones o cavidades, las que causan pérdidas directas por reducción de la calidad del tubérculo, y por ende, de su comercialización, no así de su rendimiento o su mantención en almacenaje (CIP 1980; LORIA, 1994).

*S. scabies* es un patógeno que puede sobrevivir por tiempo indefinido como micelio o esporas en la mayoría de los suelos, exceptuando los más ácidos (AGRIOS, 1995; LATORRE, 1992). También, sobrevive en restos de plantas infectadas en el suelo, pudiendo penetrar a tejidos sanos por heridas o aberturas naturales (AGRIOS, 1995).

*Streptomyces acidiscabies* Lambert y Loria, no es tan común como *S. scabies*. Es capaz de soportar pH más bajos, lo que permite la aparición de sarna en suelos ácidos y posee la característica de no sobrevivir largos períodos en el suelo (LORIA, 1994).

*S. scabies* es una bacteria, que a pesar de su crecimiento micelial sobre medios de cultivo, carece de núcleo y posee pared celular rígida, pero también se asemeja morfológicamente a los hongos por la presencia de filamentos vegetativos de diámetros menores a 1µm, conidios en forma de barril, conidioforos ramificados (CIP, 1980; AGRIOS, 1995).

La infección de los tubérculos se produce, a través, de las lenticelas jóvenes o estomas antes que se diferencie el peridermo o a través de heridas (CIP, 1980). Los filamentos se desarrollan intercelularmente y posteriormente intracelulares, las lesiones quedan separadas del resto del tejido por capas de peridermo (CIP, 1980).

2.1.2.1 Síntomas. Una vez que el patógeno ha penetrado al interior del tubérculo, este crece entre unas cuantas capas de células las que mueren y permiten su vida saprofítica. Además, genera sustancias que estimulan a las células vivas a dividirse con rapidez y a producir capas de células de corcho que aíslan al patógeno. Los síntomas en tubérculos se pueden observar en la Figura 2 (AGRIOS, 1995).



**FIGURA 2** Síntomas en tubérculos de papa provocados por *S. scabiei*.

FUENTE: CIP (1980).

Las lesiones de la sarna común en los tubérculos, tienen una coloración canela claro al castaño, con una ligera capa de corcho protuberante en 1 a 2 mm, o hundidas de no más de 7 mm de profundidad las cuales son más oscuras. Pueden ser de forma definida circular de 5 a 8 mm de diámetro rara vez mayores a 10 mm pudiendo también ser irregulares (CIP, 1980).

Las células por debajo de la lesión forman capas de células de corcho que presionan el tejido hacia fuera lo que les da una apariencia costrosa, esto abre la puerta para organismos secundarios (AGRIOS, 1995).

Apariciones de síntomas más severos de la enfermedad se generan en condiciones de suelo más bien secos (AGRIOS, 1995).

2.1.2.2 Medidas de manejo. Su diseminación se produce por el agua en el suelo, o por suelo llevado por el viento o en tubérculos infectados (AGRIOS, 1995).

*S. scabies*, puede encontrarse en el suelo, especialmente en aquellos para la producción de papas o en los tubérculos, por esto se debe evitar utilizar tubérculos semillas contaminados para no introducir cepas agresivas. (LORIA, 1994).

La humedad en el suelo durante el manejo y semanas después de la iniciación de tuberización puede reducir la severidad de algún tipo de sarna, además, el pH del suelo cuando es menor a 5,4 impide ataques severos de algunos tipos de sarna (LORIA, 1994).

Como medidas preventivas se debe mantener altos los niveles de humedad del suelo durante y después del establecimiento de los tubérculos, desde 4 a 9 semanas de acuerdo a la variedad, evitar aplicaciones excesivas de cal, utilizar variedades con un grado de resistencia, rotaciones y utilización de semilla sana (CIP, 1980).

Cultivares resistentes pueden proporcionar un grado significativo de control, sin embargo, la inmunidad no ha sido identificada, existen pocos cultivares resistentes y éstos aun pueden desarrollar la enfermedad, si las densidades del patógeno son altas o las condiciones del suelo son favorables (LORIA, 1994).

## **2.2 Mejoramiento de la papa.**

El mejoramiento tradicional de plantas implica el movimiento de características deseables a plantas, a través, de técnicas de genética Mendeliana, lo que ha permitido aumentos de rendimientos e incorporación de resistencias a enfermedades. Esto involucra bastante tiempo alrededor de 15 años la introducción, selección, y el establecimiento de la característica deseada en un cultivar comercial (DESTEFANO *et al.*, 1991). Tampoco es una opción atractiva cuando ciertas características se quieren introducir en líneas de mejoramiento avanzadas o sobre cultivares (DALE y HAMPSON, 1995).

Los métodos de mejoramiento tradicionales en papa, se ven reducidos en su eficiencia debido a la esterilidad y tetraploidia, sumado a los altos niveles de heterocigosis (BEAUJEAN *et al.*, 1998).

Además, la introducción de resistencia a enfermedades por los métodos tradicionales, limita la utilización de genes que están en un pequeño grupo de organismos sexualmente compatibles (DESTEFANO *et al.*, 1991; WILSON y CONNER, 1995).

En relación a evaluaciones realizadas al material genético de papa chilena, es importante señalar la existencia de resistencia a virus X, Y y PLRV, a Eca, *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) y *Meloidogyne* spp, destacándose, también, los altos contenidos de proteínas, almidón, materia seca y otras determinaciones hechas en azúcares reductores, solanina y vitamina C. (CONTRERAS, 1984) Es destacable señalar que el germoplasma chileno es una fuente potencial de resistencia a pudriciones húmedas y pie negro (CIAMPI y ANDRADE, 1984). Encontrándose además algunos clones con un grado de resistencia a *S. scabies* (MONTALDO y SANZ, 1962).

Otra condición que dificulta los cruzamientos, son las diferencias en ploidia entre la especie cultivada y los parientes silvestres (CUBILLOS, 1990).

KALAZICH *et al.* (2000), señala que el pie negro en campo y las pudriciones blandas en bodega generadas por Eca, son las enfermedades más importantes en el sur de Chile, la incorporación de resistencia genética a variedades comerciales a esta enfermedad ha sido difícil por lo cual la Ingeniería Genética es una alternativa para la obtención de resistencia.

La Ingeniería Genética permite la introducción de características específicas dentro de un cultivar comercial sin la hibridación del mejoramiento tradicional, manteniendo así las características deseables para un determinado cultivar (WILSON y CONNER, 1995). En el Cuadro 1, se puede observar las principales aplicaciones de estas tecnologías, siendo la resistencia a enfermedades una importante aplicación para cultivos en general.

**CUADRO 1 Resumen de ensayos de campo realizados en Estados Unidos, entre 1987 y 1999, subdivididos en períodos de tres años, de acuerdo a las categorías del material transgénico.**

| Categorías de transgenia | Años (% de cada categoría respecto a intervalos de 3 años) |      |      |      |      |
|--------------------------|------------------------------------------------------------|------|------|------|------|
|                          | 1987                                                       | 1990 | 1993 | 1996 | 1999 |
| Tolerancia a herbicidas  | 67                                                         | 22   | 33   | 24   | 24   |
| Resistencia a insectos   | 22                                                         | 21   | 22   | 23   | 9    |
| Resistencia a virus      | 11                                                         | 29   | 16   | 16   | -    |
| Resistencia a bacterias  | -                                                          | 5    | 2    | 1    | -    |
| Resistencia a hongos     | -                                                          | 4    | 4    | 8    | 6    |
| Propiedades agronómicas  | -                                                          | 3    | 2    | 3    | 6    |
| Calidad de productos     | -                                                          | 8    | 18   | 17   | 52   |
| Genes marcadores         | -                                                          | 3    | 1    | 3    | -    |
| Resistencia Nemátodos    | -                                                          | -    | <1   | -    | -    |
| Otras                    | -                                                          | 6    | 2    | 5    | 3    |

FUENTE: DUNWEL (1999).

## 2.3 Péptidos líticos.

Son pequeños péptidos de 23 a 47 aminoácidos, los cuales parecen formar parte de un sistema inducible de defensa que actúa rompiendo las membranas celulares (WILSON y CONNER, 1995).

En general, el sitio de acción de estas moléculas parece ser los lípidos presentes en la membrana plasmática, a los cuales se unen casi exclusivamente por sus características estructurales; un dominio catiónico rodeado por una superficie hidrofóbica Kini y Evans (1989), citado por DESTEFANO *et al.* (1993), lo que provoca alteraciones en el potencial y permeabilidad de la membrana, induciendo una lisis osmótica rápida (DESTEFANO *et al.*, 1993).

**2.3.1 Tipos.** En forma natural es posible distinguir péptidos que poseen diferentes orígenes tales como: defensinas encontradas en humanos Ganz *et al.* (1985), citado por WILSON y CONNER (1995), magaininas encontradas en la rana *Xenopus laevis* Daud ZASLOFF (1987); cecropina de la polilla gigante de la seda *Hyalophora cecropia* L. (HULTMARK *et al.*, 1980).

Magainina y cecropina a diferencia de otros péptidos presentan una falta de actividad hemolítica, mostrando selectividad para la membrana de células procariontes (Boman y Hultmark 1987 citado por WILLSON y CONNER, 1995). De esta manera

WILSON y CONNER (1995), señalan que los genes que codifican para estos péptidos podrían ser utilizados para ser incorporados en cultivos como la papa para mejorar su nivel de resistencia a enfermedades bacterianas.

2.3.1.1. Magainina. pertenece a una familia de péptidos líticos posibles de aislar desde la piel de la rana africana *X. laevis*. Tiene una actividad antimicrobial de amplio espectro, con lo cual a bajas concentraciones es capaz de inhibir el crecimiento de muchas especies de bacterias, hongos e inducir lisis osmótica en protozoos (ZASLOFF, 1987). Este péptido está conformado por 23 aminoácidos encontrándose dos tipos: magainina 1 y magainina 2, diferenciadas por residuos en los aminoácidos 10 y 22, (CHEN *et al.*, 1988).

Este péptido es una  $\alpha$ -hélice anfifílica, la cual interactúa con la doble capa lipídica y proteínas específicas dentro de la membrana (Wade *et al.* 1990, citado por LUDTKE y HUANG, 2000). En general, los péptidos líticos provocan la ruptura de la membrana celular, forman canales iónicos selectivos a aniones Guy y Raghunathan, (1988), citado por KRISTYANNE *et al.*, (1997) o por la despolarización de la membrana provocan la muerte celular (Westerhoff *et al.*, 1989, citado por KRISTYANNE *et al.*, 1997).

La características de selectividad podrían estar dadas por la presencia de proteínas específicas dentro de la membrana, lo que impediría a magainina actuar sobre células eucariontes a bajas concentraciones (LUDTKE y HUANG, 2000). También, se señala que la presencia de fosfolípidos ácidos en las membranas bacterianas a diferencia con los niveles de colesterol y otros esteroides, en las células hospedadoras, cooperarían en parte a esta selectividad (Maloy y Kari 1995, citado por KRISTYANNE *et al.*, 1997).

La acción de magainina sobre las bacterias se ha demostrado a través de la elaboración de péptidos sintéticos de magainina, que comparten propiedades biológica y cromatográficas similares o idénticas al purificado desde la piel de *X. laevis*, lo que demuestra que el amplio espectro de acción de magainina no se debe a contaminantes, sino a su acción en sí (ZASLOFF *et al.*, 1988).

2.3.1.2 Cecropina. Es aislada de la hemolinfa de polilla *H. Cecropia* y provee una defensa antibacterial en invertebrados (Steiner *et al.*, 1981, citado por ZASLOFF, 1987). Este

péptido, tiene una actividad contra un amplio rango de bacterias fitopatógenas (Jaynes *et al.*, 1987, citado por WILLSON y CONNER, 1995).

Un análogo sintético a la cecropina B corresponde a cecropina SB-37, cuya estructura corresponde a una hélice  $\alpha$ -anfipática, que tiene una actividad lítica sobre la membrana citoplasmática de las bacterias (KALAZICH *et al.*, 2000).

**2.3.2 Aplicaciones de los péptidos líticos.** La transferencia de genes que codifiquen para péptidos antimicrobianos a cultivos como papa, debe cumplir algunas condiciones como no ser tóxicos para la papa y deben inhibir la actividad de determinados microorganismos patógenos (WILLSON y CONNER, 1995).

En experimentos realizados para evaluar la acción de los péptidos líticos en papas *in vitro*, demostraron que las concentraciones generadas de péptidos líticos en células transgénicas que expresen tales genes no tendrían una acción fitotóxica sobre las células vegetales, también se observó una fuerte inhibición de *Streptomyces sp.* dada por cecropina A y P1 y magainina 2 amida. La misma acción de estos pepetidos se observo sobre *Erwinia*, pero en especial se notó la acción de la cecropina B.(WILLSON y CONNER, 1995).

En evaluaciones de campo hechas en la estación experimental del Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA Remehue, en la ciudad de Osorno, Chile, sobre clones transgénicos que contienen el gen cecropina al ser inoculadas con Eca, se determinó resistencia significativa de los clones transgénicos por sobre plantas no transformadas del cultivar Desirée, manteniendo las líneas transgénicas las características morfológicas de la variedad (KALAZICH *et al.*, 2000).

La inserción de genes que codifiquen para la cecropina B en plantas de papa del cultivar Desirée realizadas en Chile, incrementaron la resistencia y redujeron la severidad de pie negro o de pudriciones blandas en ensayos de campo (ARCE *et al.*, 1999).

La bioactividad de magainina 2 ha sido comprobada sobre patógenos de plantas tales como *Thielaviopsis brasicola* (Berkeley y Broome) Ferraris, *R. solani*, *Fusarium oxysporum* Schle., *Verticillium dahliae* Kleb, en los cuales se han observado cambios en



tamaño y forma de las mitocondrias, degradación de estas y de las matrices citoplasmáticas, reducción en los ribosomas y vacuolización del citoplasma 12 horas después de la aplicación del péptido. Todo esto deja de manifiesto el potencial de este péptido para otorgar resistencia a hospederos de estos patógenos (KRISTYANNE *et al.*, 1997).

Un problema que se podría presentar con este tipo de control es el desarrollo de células resistentes que son capaces de escapar de la acción lítica del péptido, lo cual se podría superar con la incorporación de genes que codifiquen para más de una forma de péptidos líticos, lo que aumenta la probabilidad de quebrar la resistencia por mutaciones de los patógenos (WILLSON y CONNER, 1995). Además, la presencia de más de una forma del péptido tiene una acción sinérgica, como se demostró en ensayos *in vitro* realizados sobre *S. acidiscabies*, *S. scabies* y *E. carotovora*, donde se evaluó el efecto de cecropina A y maganina 2 (WILLSON y CONNER, 1995).

## 2.4 Metodologías de obtención de plantas transgénicas.

De la gran cantidad de estrategias de transferencia de genes existentes, sólo pocas han sido exitosas en un amplio rango de especies. La inserción directa al protoplasma celular de un determinado ADN se puede realizar con polietilén glicol, electroporación o microinyección. Alternativamente los tejidos de plantas pueden ser bombardeados con partículas cubiertas con ADN, el cual ha sido un método ampliamente utilizado en la transformación de plantas monocotiledóneas (PUDDEPHAT *et al.*, 1996).

Otro importante sistema de obtención de plantas transgénicas, es la utilización de vectores como *A. tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* (Riker *et al.*) Conn (POTRYKUS, 1991).

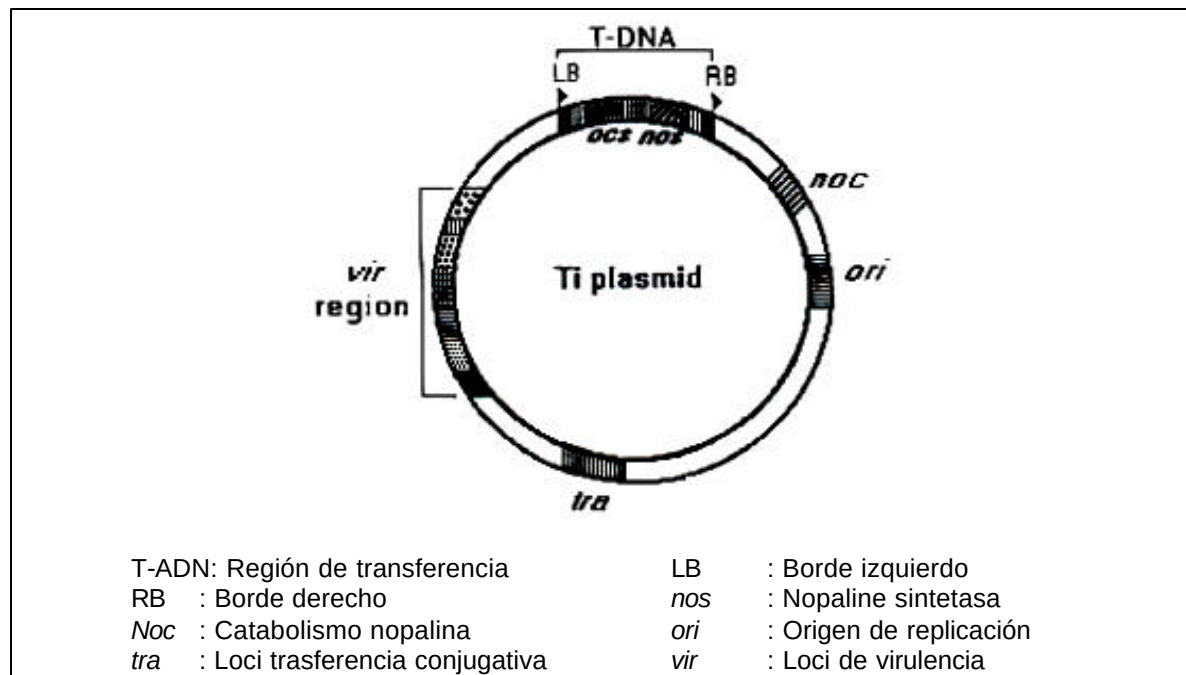
**2.4.1 Género *Agrobacterium*.** es una bacteria de suelo, gram negativo que tiene la capacidad de transferir ADN de su plasmidio Ti o Ri al núcleo de las células de la planta donde se integra dentro de los cromosomas y se expresa (BINNS, 1999).

El género *Agrobacterium* pertenece a la familia *Rhizobiaceae*, poseen forma bacilar de 0,8 por 1,5 a 3,0  $\mu\text{m}$ , puede poseer de uno a cuatro flagelos unidos lateralmente y tiene la característica de ser aeróbico y no esporulante (BUCHANAN y GIBBSON, 1974).

Dentro del género *Agrobacterium*, existen las especies *A. tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck y Van Delden) Conn, *A. rhizogenes* y *Agrobacterium rubi* (Hildebrand) Starr y Weiss. Todas estas son habitantes del suelo en especial *A. radiobacter* que es común en la mayoría de ellos. El resto llega principalmente a través de material vegetal contaminado (BUCHANAN y GIBBSON, 1974).

La “agalla de la corona” es provocada por *A. tumefaciens* el cual afecta a plantas leñosas y herbáceas de 140 géneros, de más de 60 familias; *A. rubi* induce la “agalla del tallo” en frambuesas y *A. rhizogenes* la “raíz pilosa” en manzano (AGRIOS, 1995). Sus hospederos son principalmente plantas dicotiledóneas y algunas gimnospermas (De Cleene & De Ley, 1981, citado por GRANT *et al.*, 1991).

La forma por la cual *Agrobacterium* causa enfermedad, es a través de la transferencia de un segmento de su plasmidio Ti en los sitios de la planta donde existen heridas (HOOYKAAS *et al.*, 1991). El plasmidio Ti es un círculo cerrado de ADN constituido por aproximadamente 100 genes, donde se encuentra la región del T-ADN formada por 20 kb. variando entre 14 a 42 kb., bordeada por secuencias de 25 pares de bases repetidas en cada extremo (RAVEN *et al.*, 1992; GRANT *et al.*, 1991). El plasmidio y sus partes se pueden ver en la Figura 3.



**FIGURA 3: Mapa de un plasmidio Ti Nopalina.**

FUENTE: LIPP (1993)

El tipo de síntoma que provoca *Agrobacterium* está dado por el tipo de plasmidio Ti inductor de tumor o Ri inductor de raíces pilosas (AGRIOS, 1995). Este segmento se integra en el genoma de la planta, lo que se traduce en la codificación de enzimas responsables de la biosíntesis de fitohormonas, o que afectan la respuesta de las células de la planta a estas sustancias (GRANT *et al.*, 1991).

El T-ADN es portador de varios genes, dentro de los cuales se destacan uno que codifica para enzimas que participan en la síntesis de opinas, dos que codifican enzimas que intervienen en la síntesis de auxinas y uno que codifica para una enzima que cataliza la síntesis de citoquininas. Todas estas cooperan con el crecimiento y división descontrolada de células de la planta hospedera (RAVEN *et al.*, 1992).

En el plasmidio Ti o Ri es también posible distinguir una región de virulencia (*vir*) que participa en la escisión, transferencia e integración del T-ADN en el genoma de la planta y una región responsable del catabolismo de los opinas para su utilización por parte de la bacteria (GRANT *et al.*, 1991). Las opinas son derivados de aminoácidos que la bacteria utiliza como fuente de carbono y nitrógeno. (RAVEN *et al.*, 1992).

Las cepas de *Agrobacterium* pueden ser clasificadas de acuerdo al tipo de opina, ya que cada una lleva genes específicos para la síntesis y también sus respectivos genes para su catabolismo (GRANT *et al.*, 1991). Las cepas se describen de acuerdo a las opinas que producen en el tumor, dentro de las cuales se destacan las cepas octopina, nopalina, succinopina y leucinopina (HOOYKAAS *et al.*, 1991).

2.4.1.1 Proceso de transferencia del T-ADN. Han sido identificado numerosos genes como participantes en el proceso de transferencia de T-ADN, algunos localizados en el cromosoma de la bacteria, los genes *chv*, mientras que otros se presentan en el plasmidio Ti, genes *vir* (HOOYKAAS *et al.*, 1991).

El primer paso de la transferencia del T-ADN, es la unión de la bacteria a las células, en los sitios heridos de la planta; en este proceso juega un papel activo *Agrobacterium* en relación al menos activo que juega la planta (GRANT *et al.*, 1991).

Los genes *chv* afectan la biosíntesis y la secreción de sustancias, tales como  $\beta$  1,2 glucan y succinoglican (GRANT *et al.*, 1991). Cualquier mutación en algún loci de estos genes genera cepas incapaces de unirse a las células de la planta (Douglas *et al.*, 1985 citado por HOOYKAAS *et al.*, 1991). En papa se ha encontrado que los genes *chv* no son importantes para el proceso de unión de la bacteria con la planta (Hooykaas *et al.*, 1987, citado por HOOYKAAS *et al.*, 1991).

La activación de los genes *vir* se produce como respuesta a señales moleculares sintetizadas por las plantas heridas (NESTER y GORDON, 1994), tales como ciertas azúcares monosacáridos y sustancias fenólicas (BINNS, 1999).

La región *vir* del tipo octopina está conformada por 24 genes *vir* en 7 operones los cuales pueden contener de 1 a 11 genes, estos se nombran desde *vir*-A hasta *vir*-H (HOOYKAAS *et al.*, 1991). Cuatro de estos operones son esenciales para la virulencia *vir* A, *vir* B, *vir* D y *vir* G, por lo cual, cualquier mutación de ellos guía a cepas avirulentas. Toda mutación en los otros loci guía a atenuar la formación de tumores o a restringir el rango de hospederos para la inducción del tumor (HOOYKAAS *et al.*, 1991).

Los genes *vir* A y *vir* G, son requeridos para la activación de todos los otros genes *vir* (Winans *et al.*, 1986, citado por NESTER y GORDON, 1994). La proteína *vir* A es una proteína transmembranar que al unirse a la sustancias fenólicas forma un complejo. Este funciona como una quinasa, fosforilando la proteína *vir* G la cual es capaz de unirse a las secuencias promotoras de los otros genes *vir*, con lo cual se activa la transcripción del resto de genes (GRANT *et al.*, 1991).

Las proteínas generadas por los genes *vir*D1 y *vir*D2 procesan el T-ADN, reorganizando y cortando las secuencias bordes debido a su actividad endonucleasa (RIVA *et al.*, 1998). La proteína *vir*D2 es capaz de unirse en forma covalente por un enlace fosfodiester al extremo 5' del T-ADN. Este enlace es de alta energía y completamente reversible lo que permitiría su posterior integración dentro del genoma de la planta (Tinland *et al.*, 1995, citado por ZHU *et al.*, 2000).

La hebra de T-ADN y el *vir* E2 son trasnlocados desde la bacteria al citoplasma de la célula vegetal por un poro codificado por el operon *vir* B (ZHU *et al.*, 2000). Una vez en

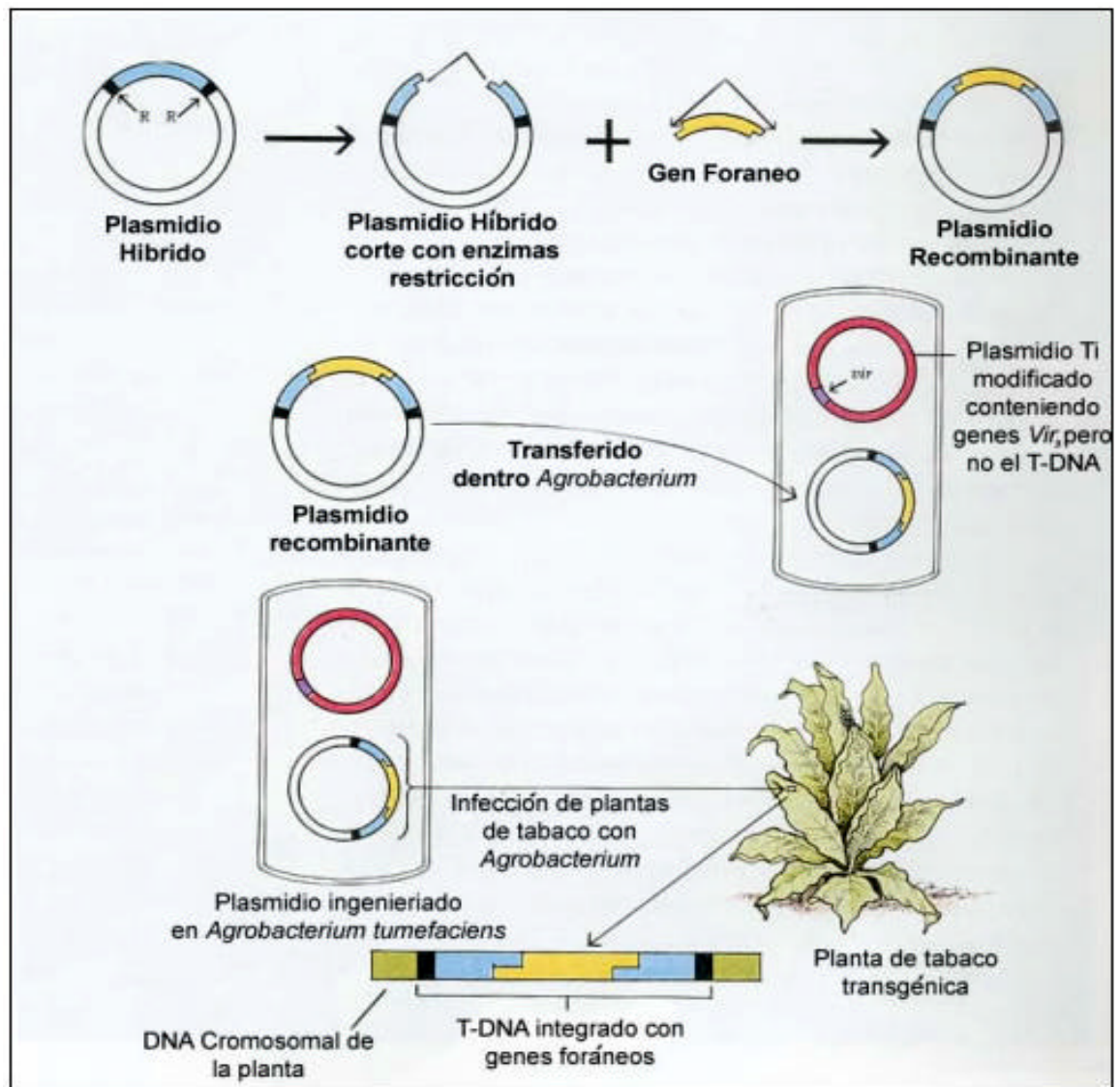
el citoplasma de la célula vegetal, el complejo del T-ADN y vir D2 es cubierto por el virE2 (Binns *et al.* 1995, citado por RIVA *et al.*, 1998) Estos dos vir juegan un importante rol en la localización de señales del núcleo (RIVA *et al.*, 1998). Es así como el carboxilo terminal del virD2, se piensa guía al núcleo el T-ADN, en conjunto con la proteína del hospedero  $\alpha$ Karioferina (ZHU *et al.*, 2000).

El T-ADN transferido se integra en uno o más de los cromosomas de la célula de la planta, lo que provoca la formación del tumor de la agalla de la corona por la sobre producción de auxina y citoquininas (HOOYKAAS *et al.*, 1991).

## 2.5 Transformación.

Según CONNER *et al.* (1991), la transferencia de genes a través de *Agrobacterium* involucra, en términos generales, el reemplazo de los genes del T-ADN responsable de inducir el tumor de la agalla de la corona, por otros genes, que posteriormente se expresarán en la planta producto de una co-cultivación de los tejidos de la planta con el *Agrobacterium* modificado. Por lo tanto, cualquier secuencia entre las secuencias bordes puede ser transferida dentro de las células de la planta (GRANT *et al.*, 1991). Un esquema se presenta en la Figura 4.

**2.5.1 Inoculación y co-cultivo.** La metodología de inoculación consiste en sumergir explantes de las plantas a modificar como cotiledones, hojas, tallos, capas delgadas de células, pecíolos cotiledonares, pedúnculos, hipocotilos, microesporas o proembriones, en cultivos de *Agrobacterium* modificados, su posterior secado en papel filtro y su cultivo en medios de co-cultivo; permitiendo la posterior generación de callos (GRANT *et al.*, 1991). Otra alternativa, es utilizar sólo un medio que permita la formación de callo y la regeneración, lo que simplifica el proceso (M'HAMDI *et al.*, 1998).



**FIGURA 4. Proceso de transformación**

FUENTE: Adaptado de RAVEN *et al.* (1992).

Según CONNER *et al.* (1991), el tiempo de inoculación para lograr la transformación de papas es de 2 a 3 días después de haber sumergido los explantes por 30 segundos en *Agrobacterium*. Por otra parte, WENYU y XUERONG, (1997), proponen tiempos de inoculación que van desde los 4 a 10 min, dependiendo del tipo de explante y un período de co-cultivo de 4 días.

Para la obtención de explantes se pueden utilizar plantas *in vitro*, estas últimas tienen la ventaja de eliminar la necesidad de esterilizar el material antes de co-cultivar con

*Agrobacterium*. Esto reduce la posibilidad de contaminación microbiológica y el estrés del tratamiento químico sobre los tejidos a transformar (CONNER *et al.*, 1991).

**2.5.2. Eliminación.** Posteriormente a la inoculación y co-cultivo, 2 a 3 días después, los explantes se transfieren a un medio con un antibiótico cefotaxime o carbenicillina que suprima el crecimiento de *Agrobacterium* (GRANT *et al.*, 1991). Otra alternativa, es la utilización del antibiótico timentina, el cual ha demostrado ser eficiente en la eliminación de las bacterias y no afectar el proceso regeneratorio posterior, lo que puede ocurrir con los antibióticos anteriormente nombrados (NAUERBY *et al.*, 1997).

**2.5.3 Selección.** El siguiente paso de la transformación, es la selección de aquellas células que fueron modificadas (HIGGINS *et al.*, 1992). Esto se puede realizar con la ayuda de genes marcadores componentes útiles para la selección de células modificadas con T-ADN (GRANT *et al.*, 1991).

Para identificar las células de la planta modificadas se puede utilizar genes con resistencias específicas a algunos químicos como antibióticos, los que le permiten a las células modificadas desarrollarse en niveles que normalmente serían tóxicos (CONNER *et al.*, 1991). El gen marcador más popular utilizado en la transformación de plantas es el gen neomicina fosfotransferasa II (NFT II) que confiere resistencia a kanamicina (Conner y Meredith, 1989, citado por CONNER *et al.*, 1991).

Las células de las plantas que expresan el gen NFTII son capaces de fosforilar la kanamicina u otros antibióticos lo que les confiere la resistencia (CONNER *et al.*, 1991).

Para seleccionar colonias de células de papa modificadas a partir de *Agrobacterium* con esta resistencia, se transfieren a medios a los cuales se les ha adicionado kanamicina luego de 4 a 5 días desde su incubación (CONNER *et al.*, 1991). La selección se puede iniciar desde el momento en que se previene el crecimiento de *Agrobacterium* (GRANT *et al.*, 1991). La concentración del agente selectivo es mantenido posteriormente, a través de todo el desarrollo de la planta (GRANT *et al.*, 1991). Este en ocasiones puede llegar a impedir el desarrollo de brotes por lo cual se debe reducir su concentración u omitir en regeneración para el caso de papa (CONNER *et al.*, 1991).

La mayoría de las colonias de células seleccionadas por su resistencia a kanamicina mantienen esta característica posteriormente a la selección, registrándose muy pocos escapes. Esto se puede explicar por la acción de colonias de células vecinas a estos escapes que desactivan a kanamicina y de esta manera detoxifican el medio, lo que contribuye significativamente a aumentar su frecuencia (CONNER *et al.*, 1991).

La expresión transciente ocurre en grandes zonas seguidas de la transferencia de *Agrobacterium*, lo que contribuye a aumentar la frecuencia de estos escapes. Esto puede deberse a la no integración del T-ADN, por la pérdida de ADN o de la expresión de los genes posterior a la formación de las colonias (CONNER *et al.*, 1991).

**2.5.4 Regeneración.** Luego de la selección, de las colonias de células transformadas se procede a la regeneración de plantas (CONNER *et al.*, 1991). Los métodos de transformación pueden mejorar su eficacia si es posible optimizar los procesos regeneratorios, lo cual es variable dentro de una especie, cultivar y diferentes células de las plantas (M`HAMDI *et al.*, 1998).

Es importante lograr reducir la duración de esta fase, ya que un mayor tiempo implica problemas de variación somaclonal (WENYU y XUERONG, 1997). El tiempo es variable de acuerdo a la citoquinina utilizada (M`HAMDI *et al.*, 1998) es así como la utilización de ribósido de zeatina en el medio de regeneración en transformaciones realizadas en papa, permite reducir la fase de callo y acelerar la formación de brotes con lo que se reduce el problema de la variación somaclonal (BEAUJEAN *et al.*, 1998).

## **2.6 Factores que influyen en la transformación de los tejidos.**

La eficiencia de la transformación en plantas dicotiledóneas es dependiente de muchos factores como el cultivar, el medio del pre-cultivo de los explantes y la cepa de *Agrobacterium* utilizada (HIGGINS, 1992). La eficiencia de transformación puede ser incrementada por la manipulación de los explantes o el aumento de la virulencia de la bacteria (HENZI *et al.*, 2000).

El tiempo de co-cultivación es un factor que puede incrementar la transformación, ya que este permite la infección a las células de la planta por parte de la bacteria, para lo



cual la región *vir* del plasmidio debe ser inducida para lograr así la transferencia del T-ADN, con un óptimo de 2 a 3 días (HIGGINS, 1992).

Como se señaló anteriormente, la inducción de los genes *vir* es producida por sustancia fenólicas, tales como: acetociringona y alfa-hidroxi-acetociringona (Stachel *et al.*, 1985 citado por GODWIN *et al.*, 1991). De estos estímulos de inducción, el acetociringona parece ser el único que podría mejorar la frecuencia de transferencia (Higgins, 1992 citado por HIGGINS, 1992). Para el caso de *Brasica oleracea* L var. *italica*. se ha podido observar aumentos en la eficiencia de transformación no sólo con la adición de acetociringona sino también con la utilización de opinas ya sea en el medio de cultivo de las bacterias o en el de co-cultivo (HENZI *et al.*, 2000).

Otras condiciones importante para lograr una alta inducción son: mantener una temperatura menor a 30°C, aumentar la presencia de glucosa presente en el medio y mantener un pH de acuerdo al plasmidio a utilizar, en el caso de octopina y leucinopina se requiere un pH 5,3 y para nopalina se prefiere un pH 5.8 (HOOYKAAS *et al.*, 1991).

El tipo de explante es otro factor influyente, las hojas de papa son fácilmente dañadas durante la manipulación lo que implica una disminución en el porcentaje de transformación (De Block, 1988, citado por BEAUJEAN *et al.*, 1998). Por el contrario, explantes internodales son más resistentes a la manipulación y más dóciles en condición *in vitro*. Además, no presentan un grado de variabilidad tan grande como los explantes de hoja los cuales tienen respuestas diferenciales al cultivo *in vitro* de acuerdo a su edad (BEAUJEAN *et al.*, 1998).

En trabajos realizados por WENYU y XUERONG (1997), en papas del cultivar Desirée, en donde se compara la presencia de callo o brotes sobre los explantes inoculados de hojas, discos de microtúberos y tallos. Las hojas demostraron tener altas frecuencias de transformación cercanas al 81% en relación a discos de microtubérculos con un 70% y explantes de tallo con un 49%.

Se propone también, la utilización de explantes de pecíolo, ya que al tener una menor zona de corte implica una mayor facilidad para eliminación de *A. tumefaciens* con el

menor cultivo subsecuente en medios con antibiótico, además de producir tasas de regeneración de un 98 a 100% para el cultivar Desirée (YEE *et al.*, 2001).

## **2.7 Confirmación de la inserción de los genes.**

Para probar la naturaleza transgénica de una planta es necesario la utilización de una serie de herramientas como los tratamientos control, encontrar una fuerte correlación entre los tratamientos y los resultados predichos, además de entre los datos físicos y fenotípicos, evidenciar la presencia del gen foráneo, correlacionar las características físicas y fenotípicas con la transmisión a la descendencia sexual y por último, un análisis molecular y genético en esta descendencia.(POTRYKUS, 1991).

La integración de un gen foráneo en el genoma de una planta puede ser determinado vía un Southern o una PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) (GRANT *et al.*, 1991).

En investigaciones realizadas sobre clones de papa utilizando el gen lisozima se evaluó el número de copias en las cuales se integró este gen en el genoma de la planta a través de un Southern Blot y su nivel de expresión a través de Northern Blot, lo cual se correlacionó con el nivel de expresión detectado en los clones analizados (SERRANO *et al.*, 2000).

La reacción en cadena de la polimerasa es capaz de amplificar enormemente una copia de un gen o parte de este por la acción de la ADN polimerasa, a través de una serie de ciclos repetidos de síntesis y desnaturación lo que implica aumentos geométricos en el número de tramos amplificados (GRIFFITHS *et al.*, 1992). Esto se logra con la utilización de partidores de alrededor de 20 nucleótidos de largo los que son complementarios a las secuencias de término que se desea amplificar (HARTL y JONES, 1998).

### 3 MATERIAL Y METODO

#### 3.1 Ubicación.

Todo el desarrollo de esta tesis; desde el cultivo *in vitro* de las plantas de papa, cultivo de *A. tumefaciens* y el proceso de transformación; se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile.

#### 3.2 Material vegetal.

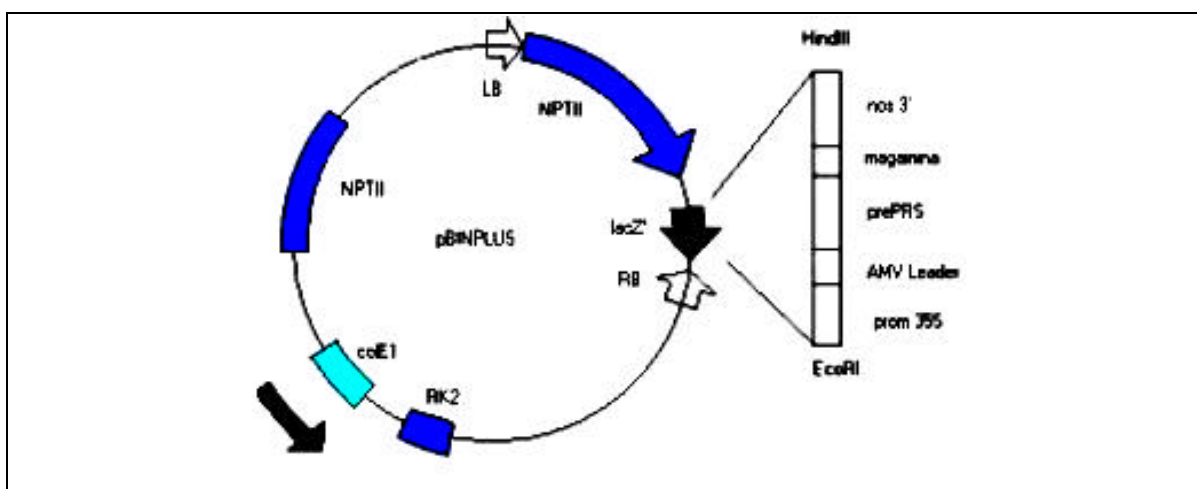
Para la transformación se utilizaron plantas de papa *Solanum tuberosum* ssp *tuberosum* de tres cultivares de importancia económica, presentes en el sur de Chile: Desirée, Kennebec, Shepody; pertenecientes a la colección *in vitro* de la Universidad Austral de Chile.

Estas fueron mantenidas en cámara de cultivo con un fotoperíodo de 16 horas luz, con una intensidad lumínica de 3500 lux a 24°C +/- 2°C.

**3.2.1. Mantención de las plantas.** Las plantas de papa se cultivaron por espacio de 2-3 meses en un medio que posee macronutrientes, micronutrientes y vitaminas MS Murashige y Skoog (1962), citado por GEORGE, (1993), al que se le adicionó 40 mg/L de ácido ascórbico, 500 mg/L de caseína hidrolizada, 30 g/L de sacarosa y 6 g/L de agar Sigma; se le ajustó el pH a 5,8 con KOH al 0,5 N (CONNER *et al.*, 1991). Luego se autoclavó a 121°C por 15 min. a 1,2 atm. Los reguladores de crecimiento 6-bencil amino purina (BAP) y ribósido de zeatina (RZ) se agregaron al medio previo a la esterilización, para el caso de los antibióticos se adicionaron después de la esterilización a través de filtro esterilizado.

#### 3.3 Cepas de *Agrobacterium tumefaciens*.

Se utilizó como vector la cepa EHA 105 que posee el plasmidio pBINPLUS (ver Figura 5), el que contiene el gen magainina y el gen marcador neomicina fosfotransferasa II (NFTII), que confiere resistencia a kanamicina. Además, lleva resistencia a kanamicina fuera de la región del T-ADN. Este plasmidio fue diseñado en Crop & Food Research Ltda., Nueva Zelanda y donado con fines científicos a Ximena Henzi G. Ph.D., al proyecto DID S199914 por A.J. Conner Ph.D.



**FIGURA 5: Plasmidio pBINPLUS<sup>2</sup>**

**3.3.1 Mantención de las bacterias.** Esto se realizó en un medio sólido Luria y Broth (LB) Anexo 1, al cual se le adicionó 25 mg/L de kanamicina, para que sólo sean capaces de crecer en este medio aquellas bacterias que posean el plasmidio pBINPLUS. Las bacterias se incubaron a 28°C, durante 5 días. Su crecimiento se puede observar en la Figura 6.

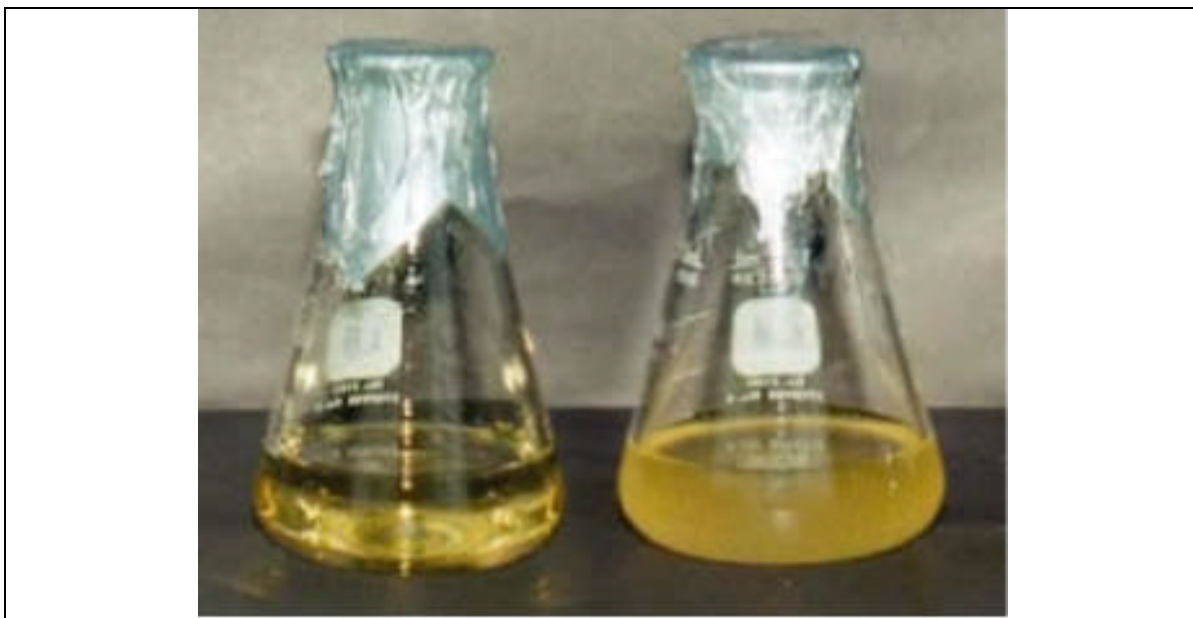


**FIGURA 6 *Agrobacterium tumefaciens* en medio LB**

Posteriormente se seleccionaron colonias individuales, que se cultivaron en medio LB líquido (Anexo 2); a este se le agregó también kanamicina en dosis de 50 mg/L, como agente selectivo.

<sup>2</sup> CONNER, A. 1999. Soil, plant and ecological division. Lincoln University. New Zealand.  
Comunicación Personal

El cultivo se mantuvo en un agitador orbital a 100 rpm. durante una noche a 28 °C. Como resultado se obtuvo un cultivo de *A. tumefaciens* que alcanzó su fase logarítmica de crecimiento y mayor actividad para el proceso de transformación <sup>3</sup>(ver Figura 7).



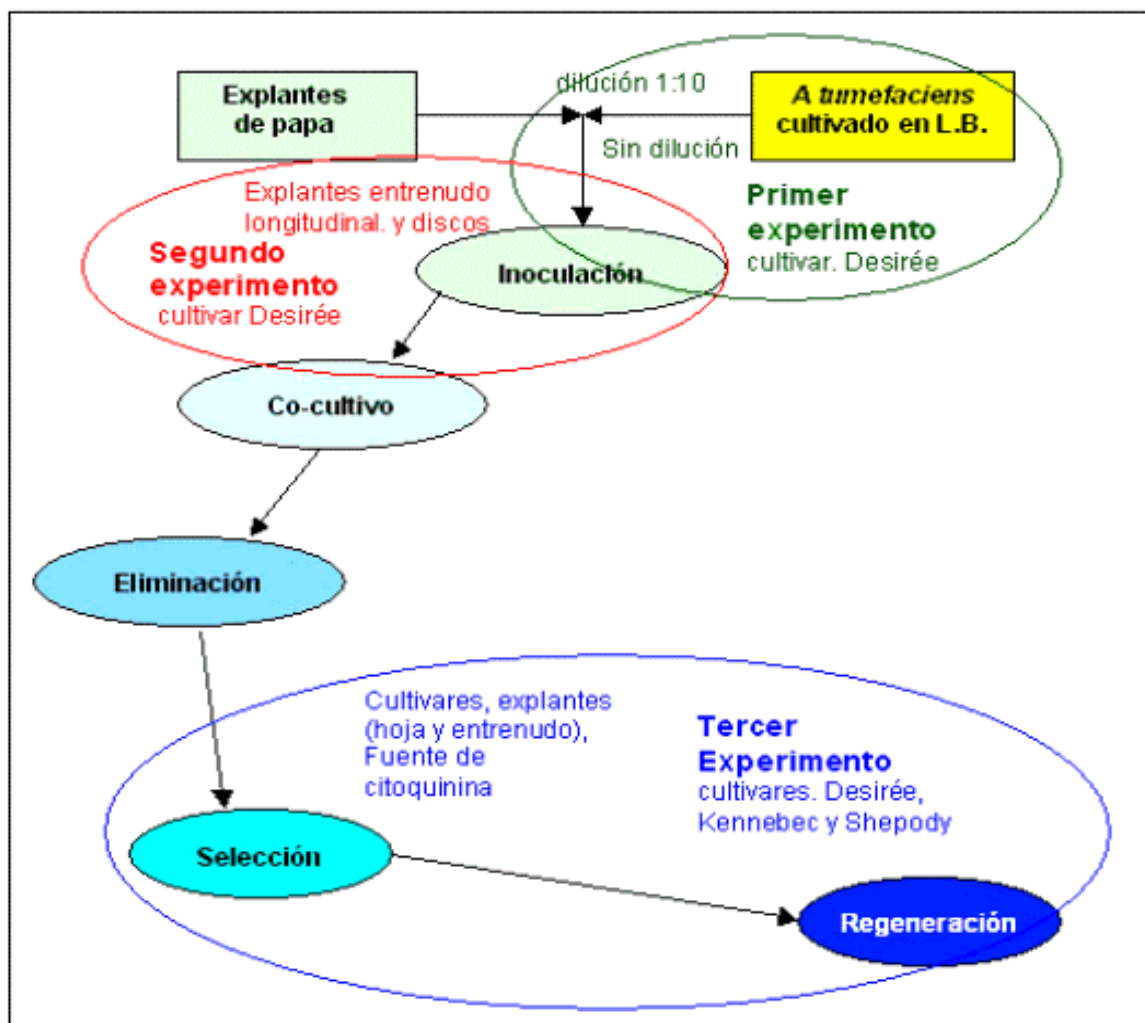
**FIGURA 7** Medio de cultivo líquido LB para *A. tumefaciens* sin bacterias (izquierda) y con bacterias (derecha).

### **3.4 Transformación de los cultivares.**

Esta investigación consideró tres fases: en las dos primeras se utilizó el cultivar Desirée para evaluar distintos métodos de inoculación y formas de corte de los explantes. En la tercera fase se evaluó la respuesta de los tres cultivares Desirée, Kennebec y Shepody a dos protocolos distintos de regeneración que varían en la fuente de citoquinina a utilizar. El resumen de estas fases se puede observar en la Figura 8.

**3.4.1 Comprobación de transformación de las plantas con el gen NFTII.** Para probar la inserción de el gen NFTII en los cultivares, se realizó un análisis de la reacción en cadena de la polimerasa PCR, utilizando los partidores específicos para este gen.

<sup>3</sup> HENZI, X. 2000. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Comunicación Personal.



**FIGURA 8** Representación de los pasos de una transformación y resumen de los factores a estudiar para los tres experimentos.

### 3.5 Efecto de la dilución en la transformación del cultivar Desirée (Primer experimento).

En este primer experimento, se utilizaron plantas *in vitro* de 2-3 meses, del cultivar Desirée, utilizando explantes de entrenudo cortados longitudinalmente y de tamaño uniforme 3 a 4 mm, los que se aprecian en la Figura 9. Estos se inocularon con *A. tumefaciens*, el cual fue cultivado en medio LB por espacio de una noche. Esto permitió plantear dos tratamientos:

- 10 mL de la solución LB+Bacterias.
- Dilución 1:10, (1mL solución LB+Bacterias : 10 mL LB fresco).

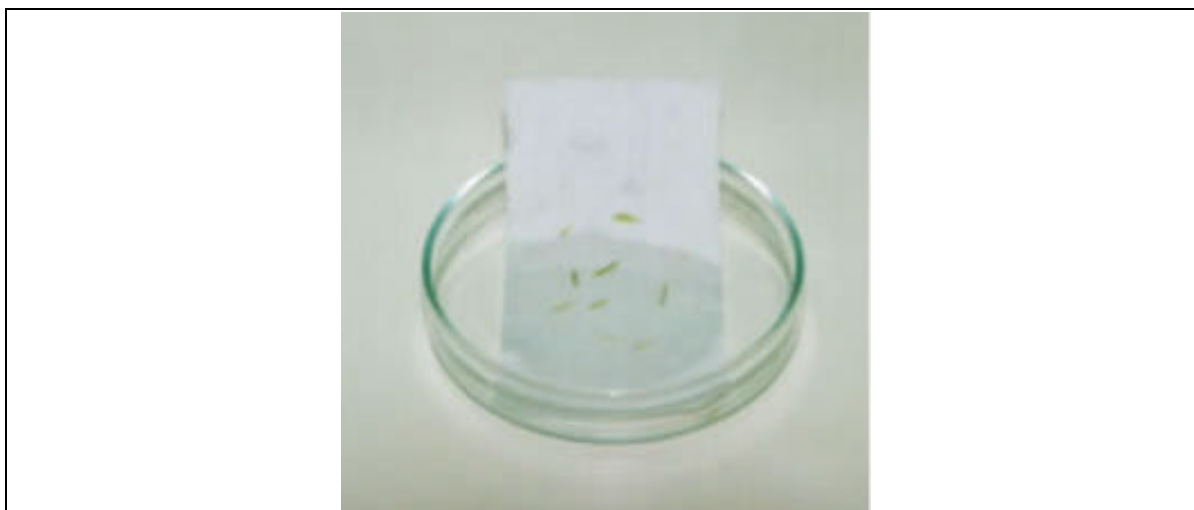
Para lo cual se depositó la cantidad de LB anteriormente indicada en una placa Petri, conjuntamente con los explantes previamente cortados con la ayuda de una lupa. El tiempo de inoculación fue de 1 min.



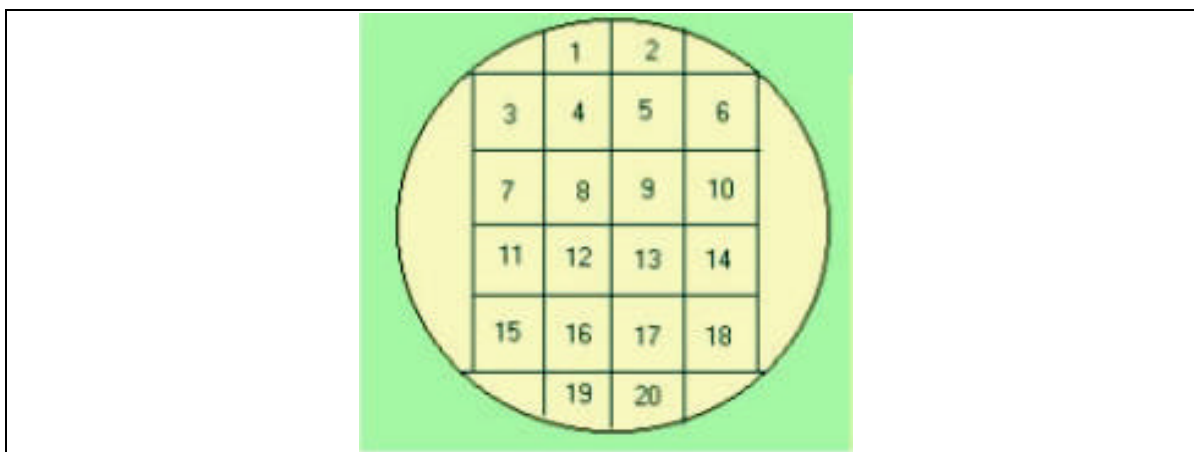
**FIGURA 9 Tipo de corte en explantes de entrenudo.**

Una vez terminado el período de inoculación, se eliminó el sobrenadante y se secaron los explantes con papel filtro estéril (ver Figura 10); para posteriormente depositarlos en un medio denominado de co-cultivo, que consiste en el mismo utilizado para el cultivo previo de las plantas, más 0,2 g/L de ácido naftalen acético (ANA) y 2 mg/L de 6-bencil amino purina (BAP). En este medio se mantuvieron por un período de 3 días. Se utilizaron 20 explantes por placa Petri ordenados según la Figura 11.

Una vez terminado este período de co-cultivo, los explantes fueron cambiados al medio de eliminación, que consiste en el mismo anterior pero a este se le adicionó 300 mg/L de timentina (tricarcilin de sodio y clavunato de potasio). Este antibiótico tiene como fin eliminar a *A. tumefaciens*. En esta etapa los co-cultivos fueron mantenidos por espacio de 2 días, para luego ser transferidos a medio fresco.



**FIGURA 10 Secado de los explantes en papel filtro estéril.**



**FIGURA 11 Disposición explantes en placa.**

Posteriormente se trasladaron a un medio denominado de selección, ya que posee un agente para seleccionar sólo a aquellos grupos de células transformadas. Este medio es igual al anterior, manteniendo los 300 mg/L de timentina más 100 mg/L de kanamicina; esta última tiene la función de seleccionar a aquellos grupos de células transformadas. En esta etapa los explantes se mantuvieron por un período de 6 semanas, realizando cambios de medio cada 2 semanas.

Cada tratamiento se realizó con 8 repeticiones, para las cuales se evaluaron la cantidad de explantes que presentaron callos transgénicos por placa. Para poder determinar si existía independencia entre la dilución y la formación de callo, se realizó una prueba de independencia Chi-cuadrado.



### 3.6 Forma de corte en explantes de entrenudo (Segundo experimento).

En este segundo experimento, también se utilizaron plantas de papas *in vitro* del cultivar Desirée de 2 a 3 meses de edad, con el fin de determinar si existía independencia entre la presencia de callo y la forma de corte de los explantes, para lo cual se utilizó una prueba de Chi-cuadrado, con 3 repeticiones.

Las dos formas de corte fueron:

- a) Cortando los entrenudos longitudinalmente.
- b) Cortando los entrenudos sólo en los extremos o en forma de disco. (ver Figura 9).

El tiempo de inoculación fue de 1 minuto, utilizando las bacterias diluídas en proporción 1:10. Luego se trasladaron a un medio de co-cultivo y permanecieron en éste por tres días. La metodología posterior es igual a la utilizada en el primer experimento.

En este experimento también se evaluó la regeneración, para lo cual se empleó el mismo medio MS modificado del comienzo, reduciendo la cantidad de sacarosa a 5 g/L, eliminando las auxinas y añadiendo reguladores de crecimiento tales como: 5 g/L ácido giberélico GA3 y 6-bencil amino purina BAP 2 mg/L.

En este experimento se quiso determinar si existía independencia entre:

- la presencia de callos en el explante y la forma de corte.
- la cobertura de callos por explante (alta o baja) y la forma de corte.
- la cobertura de brotes por explante (alta y baja) y la forma de corte.

En el primer caso se determinó el total de explantes que presentaron callo para las dos formas de corte, y también el número de explantes que no lo presentaron para los dos tipos de corte. Con estas cuatro categorías se procedió a realizar una tabla de contingencia para evaluar independencia entre estos dos factores: la forma de corte y la presencia de callos.

En el caso de la cobertura de alta o baja cantidad de callo, se consideró como alta la presencia de focos que cubran más del 50% del explante, y como baja menor al 50%.

Para el caso de los brotes, se tomó también la cobertura en el explante, siendo alta cuando era mayor al 50%, o menor si los brotes se presentaban en una superficie menor al 50% del explante.

### **3.7 Efecto del cultivar y tipo de explante sobre el porcentaje de transformación (Tercer experimento).**

En esta etapa se utilizaron tres cultivares de papa, Desirée, Kennebec y Shepody, de 2 a 3 meses de edad en condición *in vitro*. La evaluación se realizó en la fase de callo, en donde se determinó si existían diferencias entre los cultivares, tipos de explante y la existencia de alguna interacción entre cultivares y explante.

Luego, en la fase de regeneración, se evaluó la influencia del tipo de citoquinina a utilizar en la obtención de brotes a partir de los explantes inoculados. Se evaluó la respuesta a 6-bencil amino purina BAP (2 mg/L) y ribósido de zeatina (0,8 mg/L). Este medio es igual al utilizado en regeneración en el experimento dos, sólo diferenciándose en la fuente de citoquinina a utilizar.

A los 7 días en regeneración, se evaluó el número de explantes inoculados que fueron capaces de regenerar, sólo para el cultivar Desirée, ya que en el caso de los otros dos no existía aun presencia de brotes. Una segunda evaluación se realizó a los 28 días en regeneración para los tres cultivares.

**3.7.1 Análisis estadísticos para el experimento 3.** Para determinar diferencias estadísticas entre los distintos factores se utilizó el análisis de varianza previa comprobación del supuesto de homogeneidad de varianza. Para aquellos que no cumplieron con esta condición se les sometió a la transformación de Bliss.

$$A_{\text{seno}} \sqrt{\frac{x}{100}} \quad (3.1)$$

Los análisis involucraron los siguientes factores: cada uno con tres repeticiones

a) Explante (hoja y entrenudo).

Cultivar (Desirée, Kennebec y Shepody).

b) Explante (hoja y entrenudo).

Método (BAP y ZR).

Para cultivar Desirée a los 7 días.

C) Cultivar (Desirée, Kennebec y Shepody).

Explante (hoja y entrenudo).

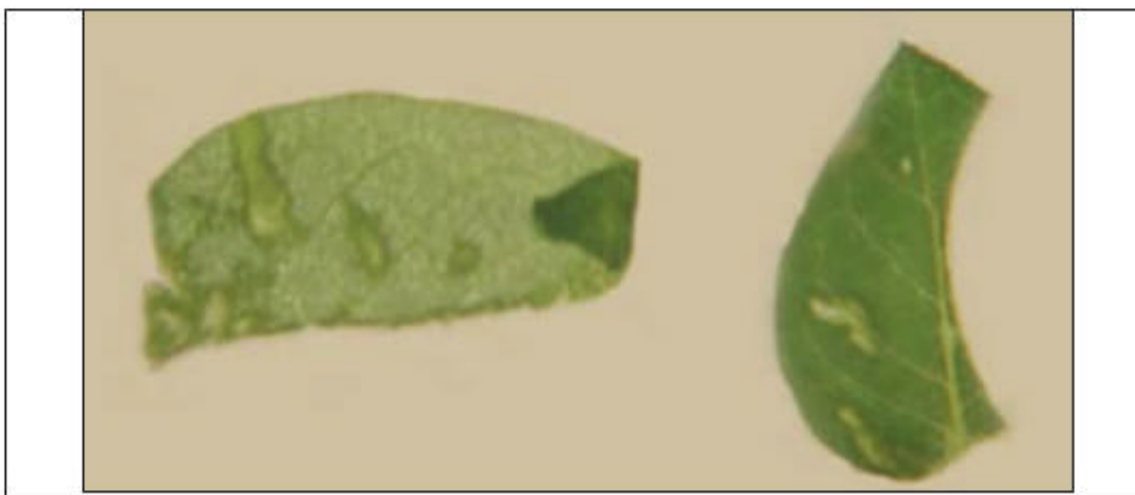
Método (BAP y RZ).

A los 28 días.

Para aquellos factores que presentaron diferencias estadísticas, se les aplicó el test de comparaciones múltiples de Tukey.

En el caso de la contaminación por *A. tumefaciens*, al no lograr homogeneidad de varianza se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

**3.7.2 Tipos de explantes.** Se utilizaron explantes de hojas cortadas por la nervadura, como se aprecia en la Figura 12; y explantes de tallo cortados en forma de disco sólo en los extremos (ver Figura 9).



**FIGURA 12** Corte en explantes de hoja.

**3.7.3 Evaluaciones en callo y regeneración.** Durante la fase de regeneración se mantuvo una intensidad baja de luz, tapando las placas con papel blanco (CONNER *et al.*, 1991).

Se evaluó la respuesta de los explantes en la fase de selección, en la cual se determinó por cada placa el porcentaje de explantes que presentaban callo después de 6 semanas en este medio. Luego, en la fase de regeneración se determinó el porcentaje de explantes que formaron brotes; a partir de aquellos sometidos a inoculación; a los 7 días y a las 4 semanas de estar en regeneración, a estos valores se les sometió a un análisis de varianza.

En esta última etapa al tener contaminación en regeneración producto de la reaparición de *A. tumefaciens*, se trató de determinar si existían diferencias estadísticas significativas entre la contaminación para cada tipo de explante, lo cual se realizó a través de un análisis no paramétrico.

### **3.8 Análisis molecular.**

La cuarta fase de esta tesis tenía como objetivo comprobar la transformación de las plantas, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para lo cual, de las plantas regeneradas se tomó material aéreo: tallos y hojas, de los cuales se extrajo ADN genómico, de acuerdo a (Lassner *et al.*, 1989 citado por HENZI, 1999), el cual fue sometido a un PCR (HENZI *et al.*, 1998); utilizando partidores para el gen NFTII; bajo condiciones de 40 ciclos de 94° C (1 min.), 45° C (1 min.) y 72 ° C. (2 min.) para la amplificación de este gen, con el fin de determinar la naturaleza transgénica de estas plantas.

Para evaluar la PCR se preparó un gel de agarosa con 0,32g de agarosa, 40 mL de agua destilada. Esta mezcla se calentó en el microondas hasta lograr una apariencia transparente, luego se le agregó 0,8 mL de TAE 50X (Tris acetato EDTA 0,04 M Tris acetato, 0,01 M EDTA a pH 8) y 4 µL de bromuro de etidio. Seguido de esto, la mezcla se puso en un molde con el fin de que gelifique. Una vez logrados los pocillos en el gel, se procedió a cargar las muestras que correspondían a 10 µL de reacción PCR y 2 µL de tampón de carga (Glicerol 30%, azul de bromofenol 0.0025%, disuelto en TE que corresponde a 10 mM Tris-HCL pH 8 y EDTA 1 mM)

Una vez lograda la migración de las bandas, se observó el gel con un transiluminador ultravioleta.

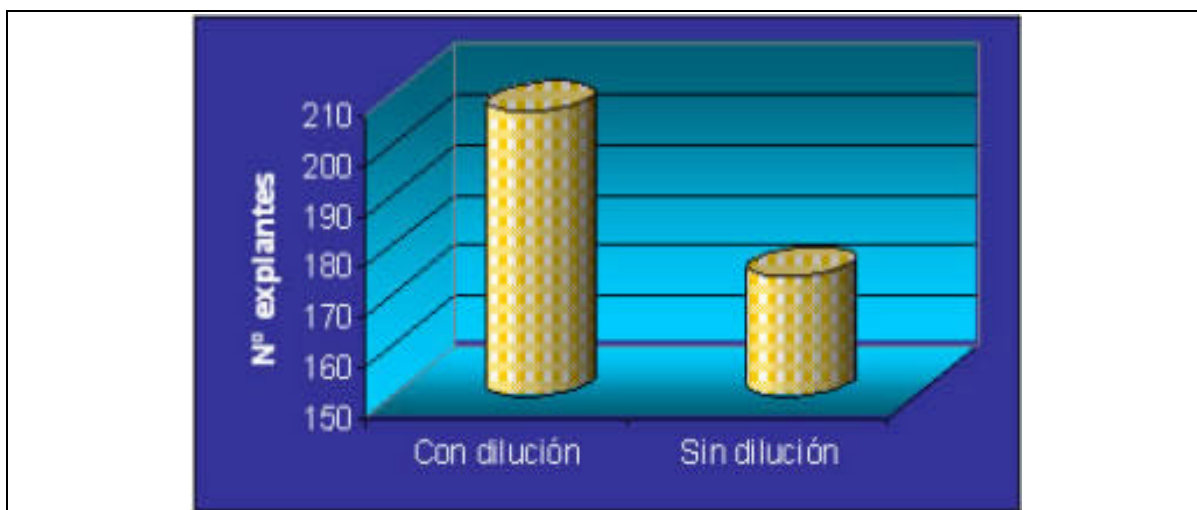
## 4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

### 4.1 Método de utilización de bacterias.

En la transformación de plantas mediante *A. tumefaciens* existe una gran diversidad de protocolos, los cuales varían entre especies y dentro de éstas. En el caso de *S. tuberosum* existen distintas metodologías de transformación. Es así como para la etapa de inoculación, algunos autores utilizan las bacterias en forma diluida en proporción de 1:10 (BEAUJEAN *et al.*, 1998), y otros las utilizan en forma no diluida (WENYU y XUERONG, 1997; CONNER *et al.*, 1991). En pepino se ha determinado que la concentración de las bacterias; en este caso *A. tumefaciens*; es un factor influyente en la frecuencia de callo a obtener (SARMENTO *et al.*, 1992).

En esta investigación se evaluó si existía independencia entre la presencia de callos transgénicos y la utilización de las bacterias sin dilución o diluidas en una proporción de 1:10. En la Figura 13, se presentan el número de explantes con callos transgénicos obtenidos al final de la etapa de selección, en la cual sólo deberían crecer aquellos grupos de células que han sido transformados, pues llevan un período de 6 semanas en presencia de kanamicina, y sólo aquellos grupos de células transformadas serían capaces de detoxificar este antibiótico. Los datos indican que existe una dependencia entre la presencia de callos transgénicos y la dilución de las bacterias (P-valor < 0,05). (Anexo 3).

De acuerdo a estos resultados queda de manifiesto que la forma más apropiada de utilizar las bacterias en la etapa de inoculación es diluyéndolas, ya que una menor cantidad de bacterias en los explantes, podría reducir la posibilidad de contaminación y muerte de éstos. Es así como WENYU y XUERONG, (1997), señalan que una exposición muy larga de los explantes a las bacterias, provocaría la muerte o la ausencia de brotación de los callos, generados a partir de los explantes, debido a que las bacterias pasarían a ser contaminantes en esos niveles.



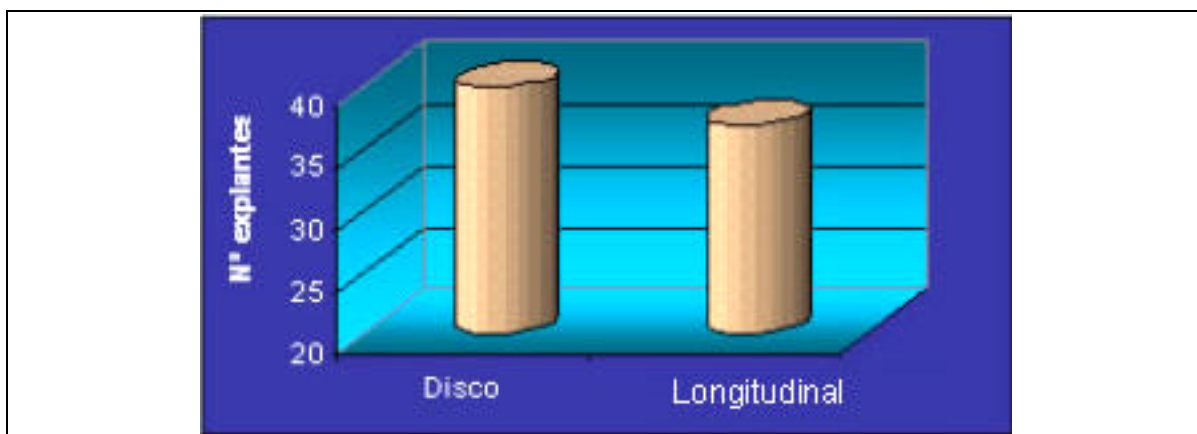
**FIGURA 13** Número de explantes que presentaron callos transgénicos en explantes de entrenudo del cultivar Desirée al utilizar *A. tumefaciens* en forma diluida y sin dilución.

Este primer experimento fijó la metodología de inoculación a utilizar en los experimentos posteriores.

#### **4.2 Efecto de la forma de corte en explantes de entrenudo.**

Una exitosa transformación dependerá de la combinación de numerosos factores. Dentro de los factores que se relacionan con el tejido a transformar, es importante evaluar previamente qué tejidos no sólo son capaces de ser transformados sino también de regenerar.

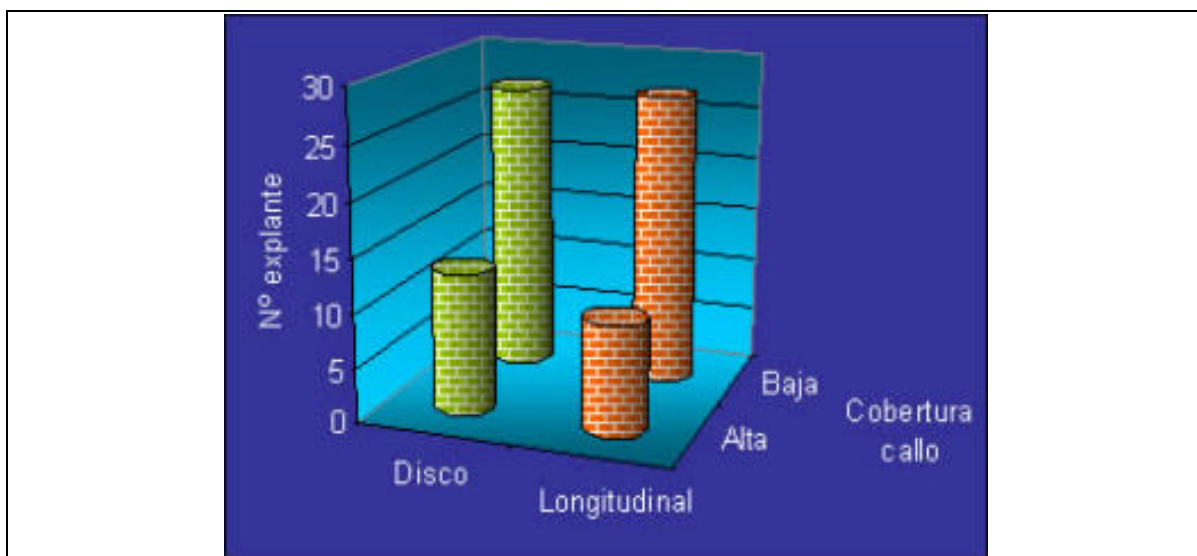
Existen distintas formas de tratar los explantes de entrenudo, previo al proceso de inoculación, ya sea cortándolos a manera de disco o en forma longitudinal. Es así como BEAUJEAN *et al.* (1998) logró tasas de transformación de un 90% al cortarlos en forma longitudinal. Para determinar si existía independencia entre el tipo de corte y la cantidad de explantes con callos transgénicos, se evaluaron ambos tipos de corte. Los resultados obtenidos en estos experimentos se muestran en la Figura 14. El valor obtenido mediante chi-cuadrado ( $P\text{-valor} > 0,05$ ) (Anexo 4) coloca en evidencia que la presencia de callos transgénicos es independiente del tipo de corte en los explantes de entrenudo.



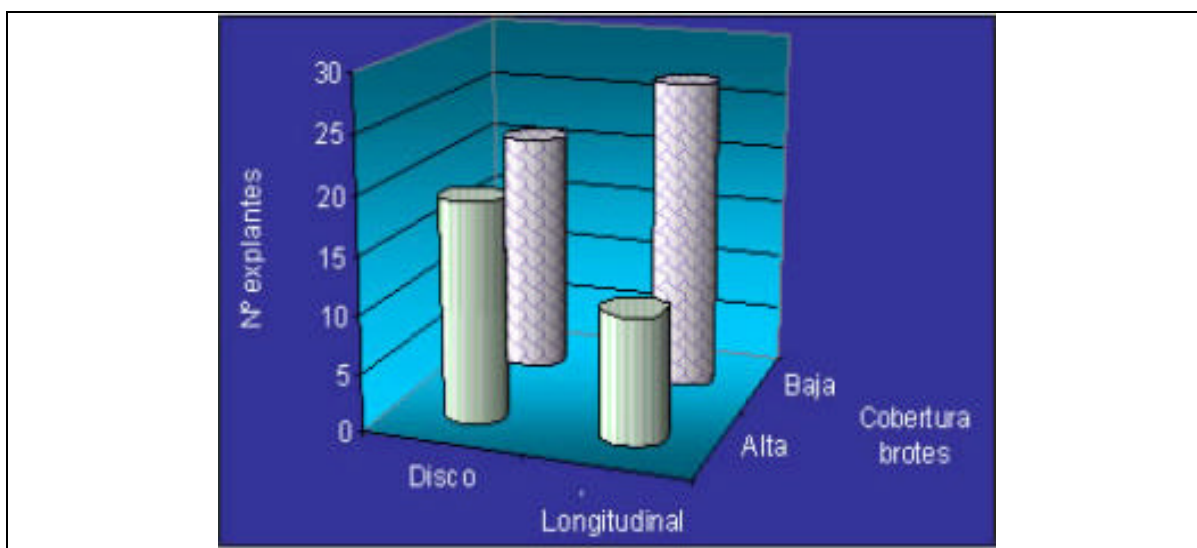
**FIGURA 14** Número de explantes que presentaron callos transgénicos en explantes de entrenudo del cultivar Desirée, cortados en forma longitudinal y en forma de disco

Se quiso determinar también si el tipo de corte podría influir en la cobertura de callos por explante (Figura 15), o si podría tener la manipulación generada por el tipo de corte algún efecto sobre la brotación (Figura 16). BEAUJEAN *et al.* (1998), propone que un corte longitudinal de los explantes de entrenudo permitiría dejar disponible una mayor zona vascular accesible para *A. tumefaciens*, lo que permitiría obtener una mayor cantidad de brotes. Para estas dos situaciones, el chi-cuadrado arrojó independencia (Anexo 5, 6). Por lo tanto, de acuerdo a estos experimentos, el tipo de corte no influiría en la cobertura de callos transgénicos ni en la brotación por explante. Por consiguiente en los experimentos posteriores se utilizaron explantes de entrenudo cortados en forma de disco sólo por su mayor facilidad de manipulación.

La forma de corte longitudinal en los explantes de entrenudo, es bastante compleja, debido al tamaño del explante y a que este tipo de corte implica una mayor manipulación de éstos, lo que puede provocar daños o una mayor probabilidad de contaminación. En relación a este último punto, en trabajos realizados en *Brassica*, una pequeña superficie de corte en los explantes, facilita la eliminación de *Agrobacterium* (Moloney *et al.*, 1989, citado por YEE *et al.*, 2001), lo que reduce la posibilidad de contaminación.



**FIGURA 15** Número de explantes con callos transgénicos según el tipo de corte en relación a la cobertura de callos por explante.



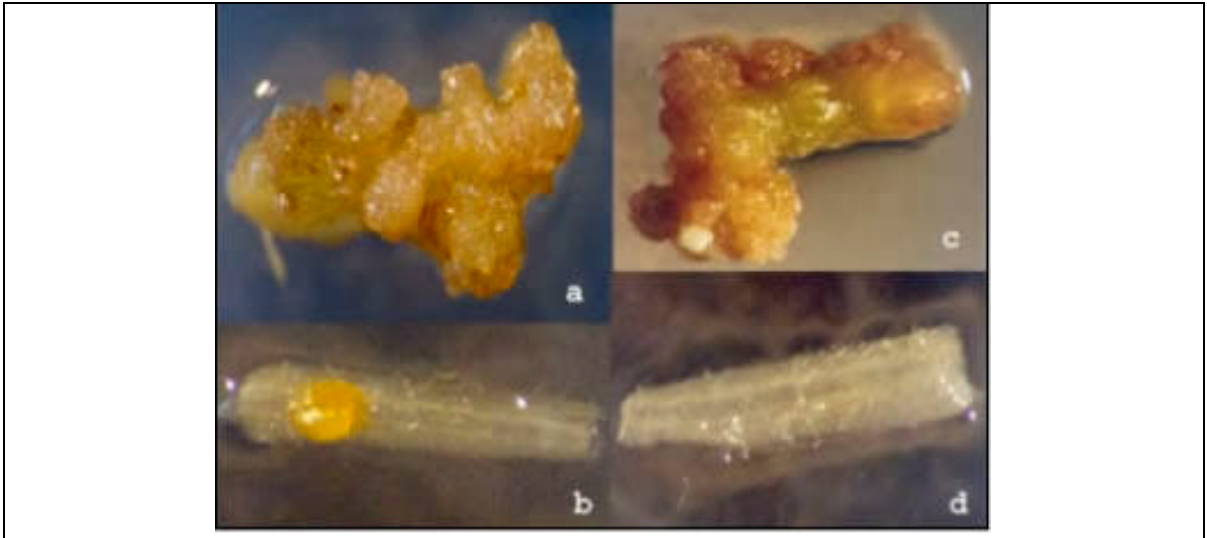
**FIGURA 16** Número de explantes con brotes transgénicos del cultivar Desirée, según el tipo de corte y su respuesta en cobertura de brotes por explante.

En la Figura 17 es posible observar la respuesta en cobertura de callos, alta en explantes cortados a manera de disco (a y c), y baja en explantes cortados en forma longitudinal (b) o la ausencia de callo como en el caso d. En relación a la cobertura por brotes, también es posible ver en la Figura 28, explantes de entrenudo con alta cantidad de brotes (a y c), o en baja cantidad (b).

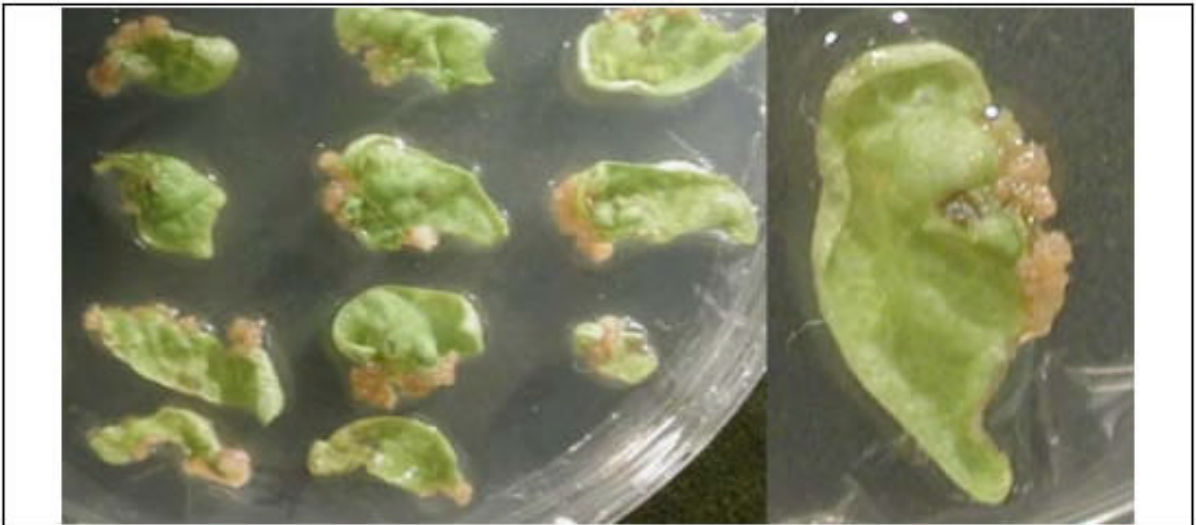


#### 4.3. Explantes de entrenudo y hoja.

En esta parte de la investigación se evaluó la respuesta a la transformación de los tipos de explante: hoja y entrenudo, cortados en forma de disco. Los resultados obtenidos en estos ensayos mostraron que en los explantes de entrenudo, los callos se encontraban en los extremos de los explantes, es decir, en las zonas de corte o podían cubrir gran parte del explante; tener sólo algunas zonas transformadas o no tenerlas (Figura 17 a, c, b, d). Para el caso de las hojas, los callos aparecieron sólo en las zonas de corte o donde se encontraban dañadas (Figura 18).



**FIGURA 17** Distintos grados de transformación en explantes de entrenudo.



**FIGURA 18** Presencia de callos en las zonas de corte en explantes de hoja.

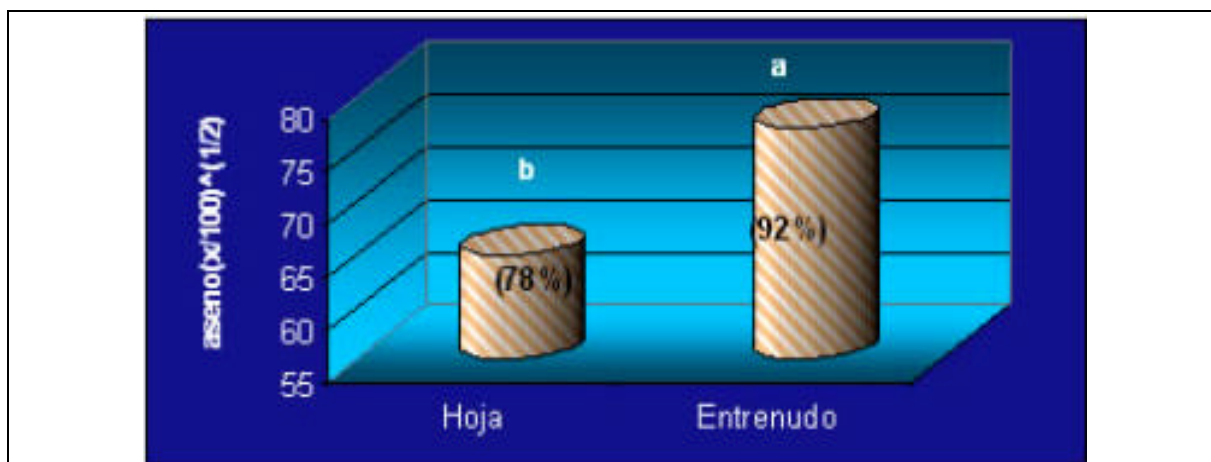
Se pudo determinar que existen diferencias estadísticas altamente significativas (Anexo 7) para los dos tipos de explantes en relación a la cantidad de explantes con callo

(ver Figura 19). Con porcentajes de transformación de un 92% en explantes de entrenudo y un 78% en explantes de hoja. Esta diferencia se podría explicar debido a la mayor resistencia que presentan los explantes de entrenudo a la manipulación y su mayor facilidad de trabajo en condiciones *in vitro* (BEAUJEAN *et al.*, 1998). Mientras los explantes de hoja al presentar mayores daños, presentan muerte de explantes en *có*-cultivo o en la fase de callo (WENYU y XUERONG, 1997), lo que reduce las tasas de transformación para este tipo de explante.

Al evaluar la respuesta de los dos tipos de explantes a la regeneración, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre ellos (ver Figura 20, Anexo 9). Al relacionar este resultado con el anterior, referente a la presencia de explantes con callo, se pudo observar que los explantes de entrenudo, aunque generaron una mayor cantidad de explantes con callo, sólo un 22% de estos generaron brotes; mientras los explantes de hoja, aunque formaron una menor cantidad de explantes con callo, regeneraron en un 32%, lo que compensó la menor producción de callo por este tipo de explante, provocando que no existieran diferencias estadísticas en regeneración.

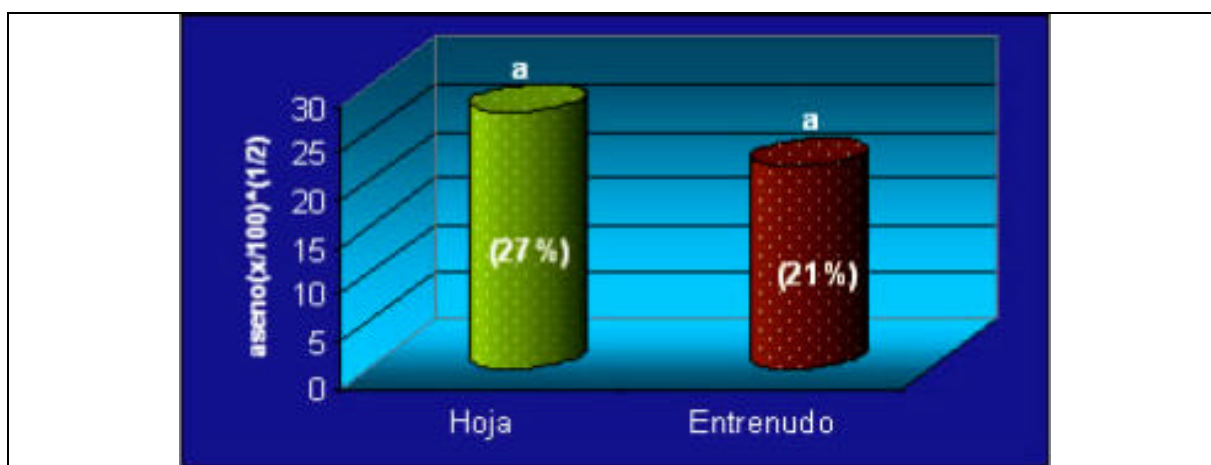
Se debe agregar que los explantes de hoja en general tienen un mayor tiempo de regeneración, lo que podría influir en la aparición de variación somaclonal y de alteración de las características del cultivar (WENYU y XUERONG, 1997). Por lo cual, lo que se busca son métodos que permitan la obtención de bajas frecuencias de variación somaclonal, sumado a independencia del genotipo y lograr regeneración en el menor tiempo posible para que estas técnicas tengan aplicaciones comerciales en la obtención de transgénicos (BEAUJEAN *et al.*, 1998).

Una ventaja de los explantes de entrenudos, son sus bajas tasas de pseudo-transformación (WENYU y XUERONG, 1997). Lo que aseguraría una transformación real, es decir, que las plantas regeneradas a partir de este tipo de explantes tienen una mayor probabilidad de ser transgénicas que los brotes generados a partir de explantes de hoja.



\* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 1% TUKEY.

**FIGURA 19 Porcentajes de callos transgénicos relativos al tipo de explante.**



\* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5% TUKEY.

**FIGURA 20 Porcentajes de brotes transgénicos según tipo de explante.**

Un problema presentado por los explantes de hoja, fue su mayor contaminación con *A. tumefaciens*, en comparación con los explantes de entrenudo (P-valor < 0.01, Anexo 10), lo cual se evidenció al término del proceso de regeneración, aproximadamente a la semana 5, en donde comenzaron a aparecer explantes con crecimiento de *A. tumefaciens* en porcentajes indicados en la Figura 21. LEPPE, (1993) observó contaminación después de varias semanas de cultivo y regeneración en explantes de entrenudo.

La aparición de estas bacterias en el proceso regenerativo, a pesar de la presencia del antibiótico, en este caso timentina, se pudo deber a la superficie del explante o la

presencia de una zona de corte mayor, lo que facilitaría la mantención de las bacterias en los explantes de hoja en relación a los explantes de entrenudo que sólo presentan corte en los extremos. Es así como YEE, *et al.* (2001) propone el uso de explantes de pecíolo en conjunto con la lámina, ya que éstos al tener una menor superficie de corte, ofrecen una mayor facilidad en la eliminación de *A. tumefaciens* después del proceso de co-cultivo. Otros autores proponen lavados de los explantes por espacio de 30 min entre el cambio desde co-cultivo a selección con una solución líquida de MS más cefotaxime, el cual es un antibiótico para eliminar a *A. tumefaciens* (BEAUJEAN *et al.*, 1998) y de esta forma reducir la posibilidad de contaminación por su reaparición.



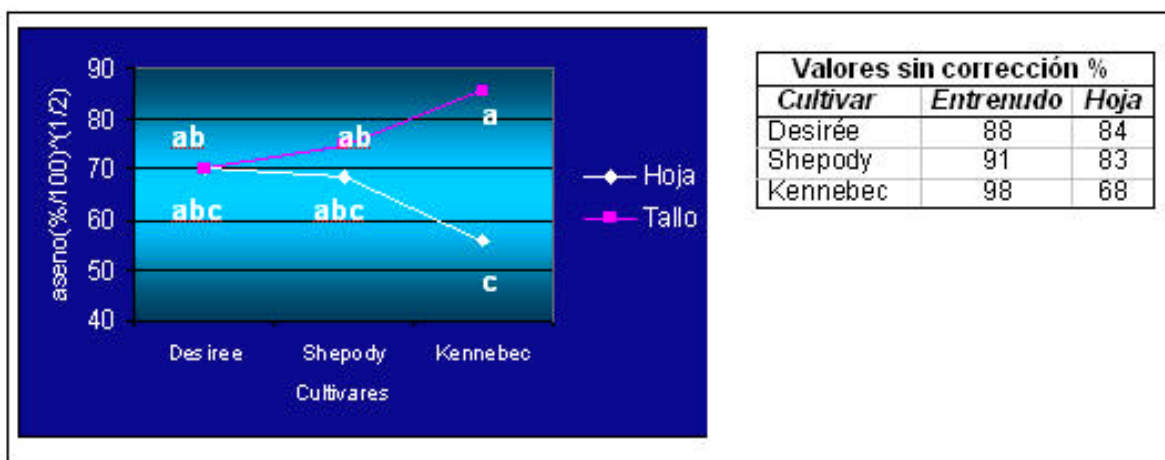
**FIGURA 21** Porcentaje de explantes con sobrecrecimiento de *A. tumefaciens*.

**4.3.1 Tipo de explante y cultivar.** En cuanto a la respuesta de los cultivares y el tipo de explante a utilizar, para el caso de los cultivares Desirée y Shepody no existieron diferencias estadísticas significativas, es decir la cantidad de callos transgénicos a obtener en estos cultivares no depende del tipo de explante. Para el caso de Kennebec queda de manifiesto una diferencia estadística altamente significativa (Anexo 7) entre los tipos de explante, siendo un 31% mayor el explante de entrenudo por sobre el de hoja (Figura 22). Por lo tanto, en un proceso de transformación para este último cultivar se deberían utilizar explantes de entrenudo, lo que reafirma lo propuesto por WENYU y XUERONG, (1997), los cuales señalan la existencia de interacción entre cultivar y explante.

Esta interacción es común en los procesos de transformación y en especial en la etapa de regeneración, es así como explantes de hipocótilos de *Brassica rapa* resultan ser los que proveen las tasas más altas de regeneración, y por ende, transformación (Radke *et al.*, 1992, citado por PUDDEPHAT *et al.*, 1996). En el caso de *Brassica oleracea* var.

*Italica* Plenck. se ven influenciadas las frecuencias de transformación y regeneración por el efecto cultivar y explante, obteniéndose con los explantes de hojas las tasas más altas (HENZI *et al.*, 1999).

La relación de los explantes y cultivares en regeneración no es significativa (Anexo 9), con lo cual se podría concluir que daría igual utilizar, para estos cultivares, cualquier explante ya sea hoja o tallo. Esta condición se contrapone a resultados encontrados por (Zinder y Belknap 1993, citado por WENYU y XUERONG, 1997), en los cuales queda en evidencia la estrecha relación entre explantes de discos de microtubérculos y los genotipos de papa Lemhi Russet, Russet BurkanK, Wadseon y Yanke Chipre. Esta relación no fue apreciada en este ensayo, debido tal vez, a diferencias entre los genotipos y explantes utilizados.



\* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 1% TUKEY

**FIGURA 22 Porcentajes de callos transgénicos de tres cultivares según tipo de explante.**

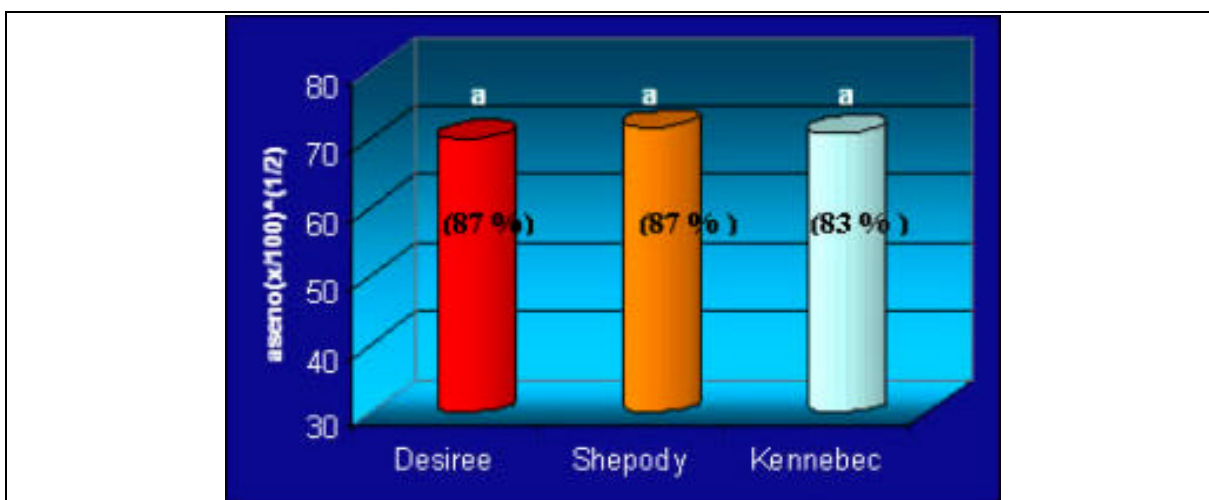
#### 4.4 Respuesta de cultivares.

Al evaluar el porcentaje de callos transgénicos por cultivar al finalizar la etapa de selección, se pudo determinar que no existen diferencias estadísticas significativas entre ellos (Anexo 7), lo que se observa en la Figura 23. Esto coincide con resultados obtenidos en ensayos de regeneración de papa entre los cultivares Désirée, Nagore y Superior, en los cuales al mes de cultivo no se observaban diferencias estadísticas significativas en la presencia de callo para explantes de hoja con porcentajes que variaban entre 70-90% (M`HAMDI *et al.*, 1998).

Por el contrario, HIGGINS *et al.* (1992), al evaluar la expresión del gen Gen de la  $\beta$ -Glucuronidasa (GUS), el cual permite evaluar en forma temprana el proceso de transformación, determinó diferencias entre cultivares al comienzo del proceso de transformación, dada por la condición genotípica de la variedad.

Las diferencias entre genotipos son más notorias en la fase de regeneración, es así como en trabajos donde se evaluaba la capacidad regeneratoria de 34 variedades de papa, sólo la mitad de ellas fue capaz de regenerar con explantes de disco de tubérculos. (DALE y HAMPSON, 1995).

Esta diferente respuesta entre cultivares no sólo se observa en papa, sino también en transformaciones realizadas sobre cultivares de *Brassica oleracea* var. *Italica* con *A. rhizogenes*, donde no sólo se aprecian diferencias en regeneración sino también en transformación (HENZI *et al.*, 1999).



\* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5% TUKEY.

**FIGURA 23 Porcentaje de callos transgénicos, de acuerdo al cultivar.**

#### 4.5 Proceso de regeneración.

En general, los primeros brotes ya fueron visibles a los 7 días desde el cambio de medio inductor de callo a regeneración para el cultivar Desirée. Para el caso de los cultivares Kennebec y Shepody, estos aparecieron hacia el día 14.

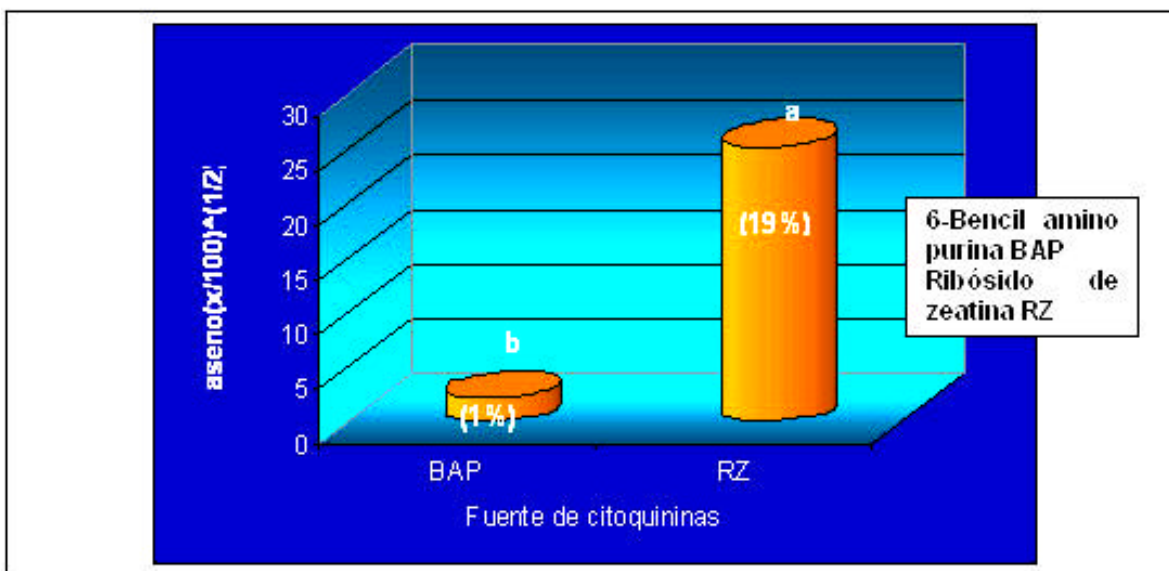
Distintos autores proponen diferentes fuentes de citoquininas BEAUJEAN *et al.* (1998), CONNER *et al.* (1991), por lo cual esta investigación trató de determinar la más eficiente en el proceso regenerativo para los tres cultivares. Los resultados obtenidos



evidencian diferencias estadísticas altamente significativas entre la utilización de 6-bencil amino purina y ribósido de zeatina, en relación a la regeneración observada a los 7 días (Figura 24, Anexo 8). Esta mayor eficiencia del ribósido de zeatina se traduce en la obtención de brotes en el menor tiempo posible, lo que concuerda con lo señalado por BEAUJEAN *et al.* (1998), el cual señala la reducción de la fase de callo y la aceleración en la formación de yemas por parte de esta citoquinina. Sólo el cultivar Desirée logró generar brotes a los 7 días, no observándose diferencias entre los explantes de entrenudo y hojas.

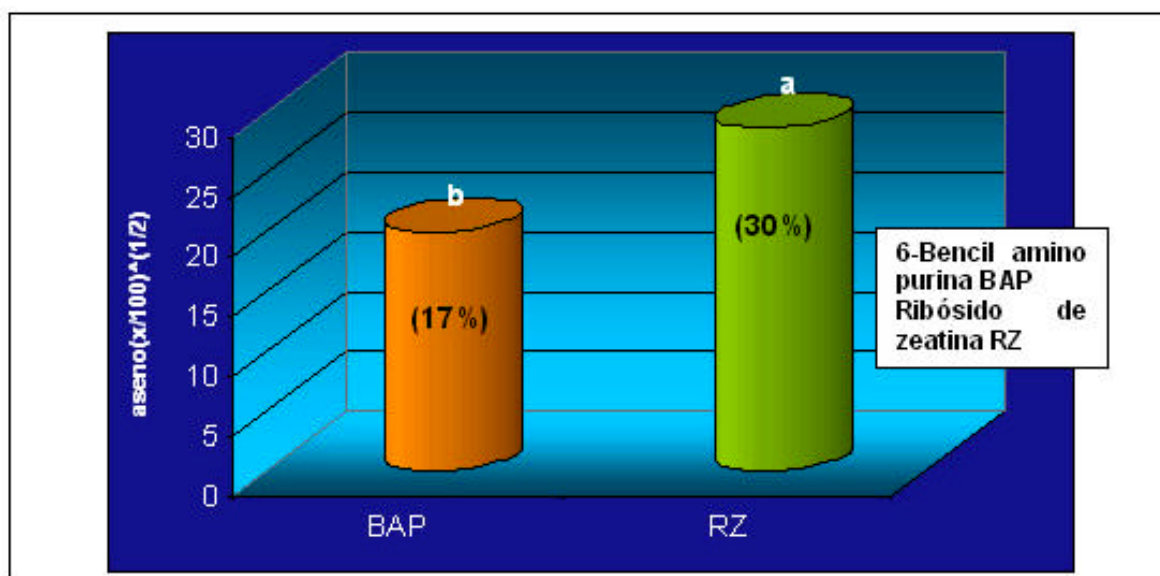
Esta condición de mayor rapidez en el proceso regeneratorio se vuelve a apreciar a los 28 días, donde el ribósido de zeatina es superior un 13% a la otra fuente de citoquinina BAP. (Figura 25, Anexo 9).

Al analizar si existían diferencias estadísticas entre los cultivares en regeneración, se determinaron porcentajes muy bajos para los cultivares Kennebec y Shepody, 8 y 5% respectivamente, lo que contrasta con los porcentajes superiores observados en el cultivar Desirée de alrededor de un 58% (ver Figura 26). Esto indicaría que el medio utilizado en el proceso de regeneración no sería el óptimo para estos cultivares. Esta diferencia en respuesta reafirma que el proceso de regeneración es variable entre células, tejidos, cultivares y especies (M'HAMDI *et al.*, 1998).



\* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 1% TUKEY.

**FIGURA 24** Porcentaje de brotes transgénicos a los 7 días en regeneración, de acuerdo a la fuente de citoquinina a utilizar.



\* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 5% TUKEY.

**FIGURA 25 Porcentaje de brotes transgénicos a los 28 días en regeneración, de acuerdo a la fuente de citoquinina a utilizar.**

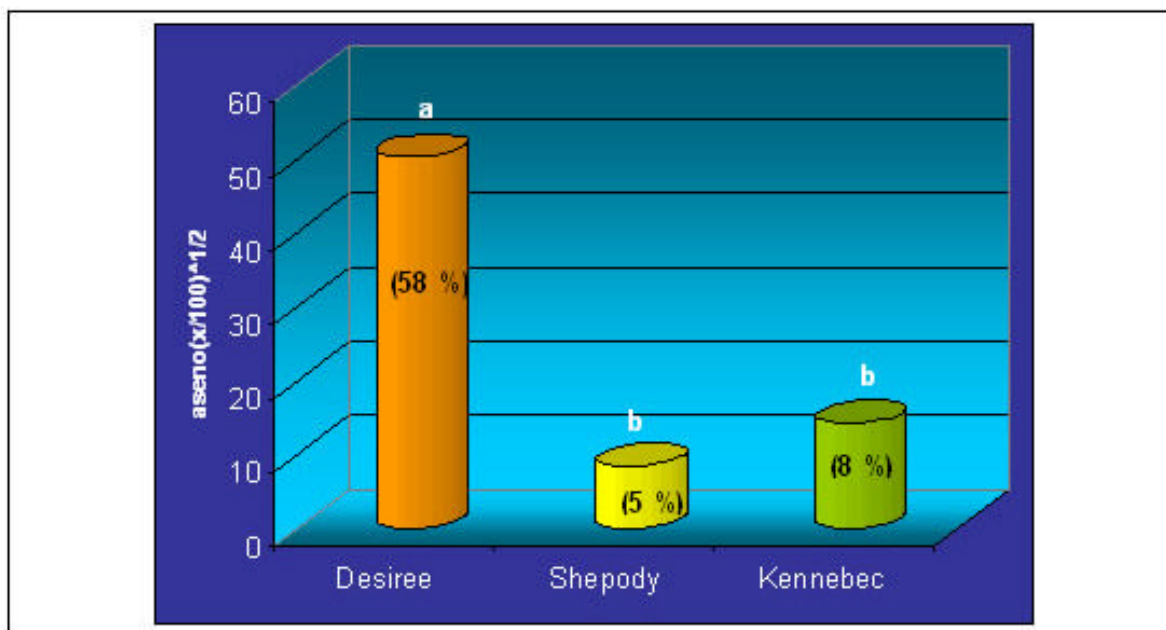
Desirée ha presentado un porcentaje de regeneración de 58%, lo que es bajo en relación a los valores encontrados por BEAUJEAN *et al.* (1998), quien señala porcentajes cercanos al 88%, lo que se podría deber a diferencias en los métodos, especialmente en la fuente de auxinas, ya que este autor utilizó 2,4 ácido diclorofenoxiacético 2,4 D y ribósido de zeatina a lo largo de todo el proceso de transformación y regeneración. En ensayos de sólo regeneración realizados por YEE *et al.* (2001), se alcanzaron porcentajes que variaban entre 98-100% usando medios que inducen la formación de callo y posteriormente la brotación.

Shepody presentó una baja regeneración, lo que es coincidente con trabajos realizados por YEE *et al.* (2001), quienes señalan que las cantidades endógenas de reguladores de crecimiento para este cultivar provocarían una menor regeneración. Este mismo autor propone la utilización de sub-cultivos adicionales en regeneración, es decir, ampliar el tiempo de regeneración para este cultivar.

Para el caso de Kennebec su porcentaje de regeneración es muy bajo en relación a otros trabajos de regeneración, lo cual se podría explicar por la diferencia de respuesta de los explantes, ya que en algunos trabajos alcanza tasas de regeneración de 87-98 %, pero con explantes de pecíolo con la lámina entera. Además, en los medios de cultivo, se utiliza



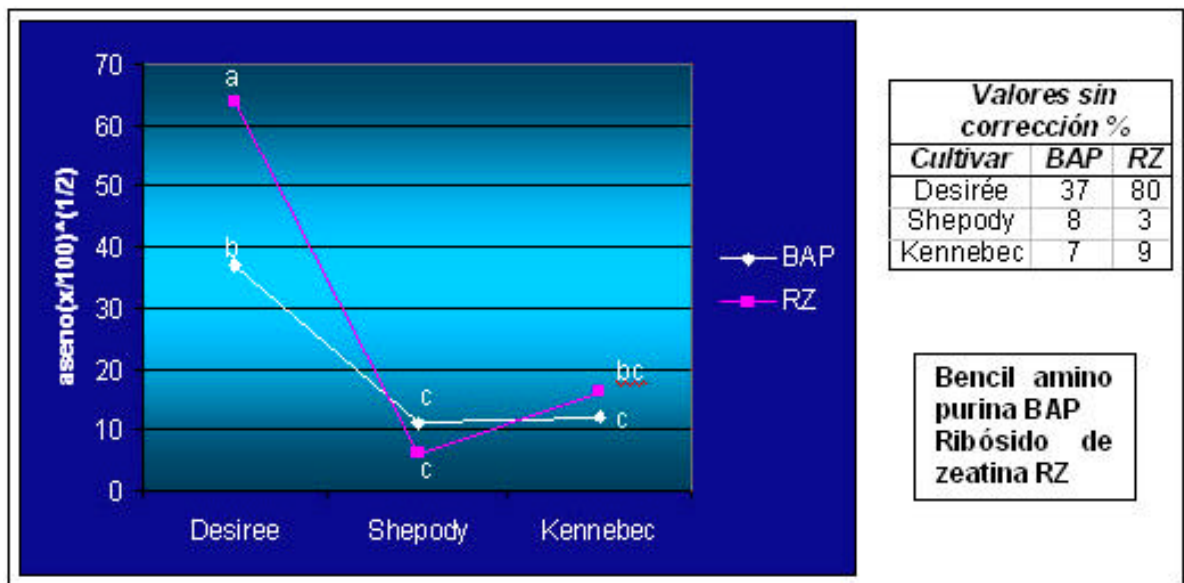
un medio inductor de callo y regeneración en forma combinada; ácido indol acético (AIA) 0,5-2 mg/L, 3 mg/L de BAP y 1 mg/L ácido giberélico (YEE, *et al.*, 2001); lo que contrasta con el medio de regeneración utilizado en esta investigación, tanto en la fuente de citoquinina, concentración y presencia de auxinas. Además, el trabajo de YEE *et al.* (2001), sólo corresponde a regeneración sin la utilización de *A. tumefaciens*, lo que altera los resultados que se obtienen en un proceso regeneratorio, ya que éste no sólo se ve influenciado por este factor (DALE Y HAMPSON, 1995).



\* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 1% TUKEY.

**FIGURA 26 Porcentajes de brotes transgénicos, según cultivar.**

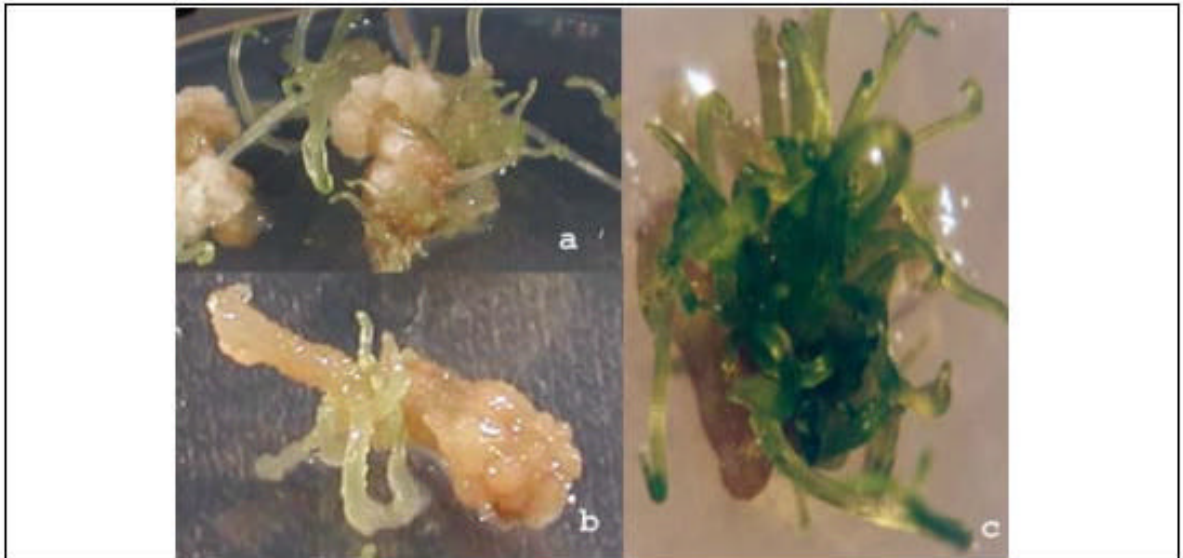
Por otra parte, se pudo observar la existencia de una interacción altamente significativa (Anexo 9) entre el cultivar Desirée y la fuente de citoquinina ribósido de zeatina. Este cultivar respondió en un 43% de mayor regeneración, en relación a la utilización de 6bencil amino purina. Para los otros cultivares no hubieron diferencias estadísticas significativas (Figura 27). Ya sea los niveles endógenos de reguladores del crecimiento en Shepody, la composición del medio para Kennebec, o el tipo de explante pueden haber enmascarado este efecto.



\* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 1% TUKEY.

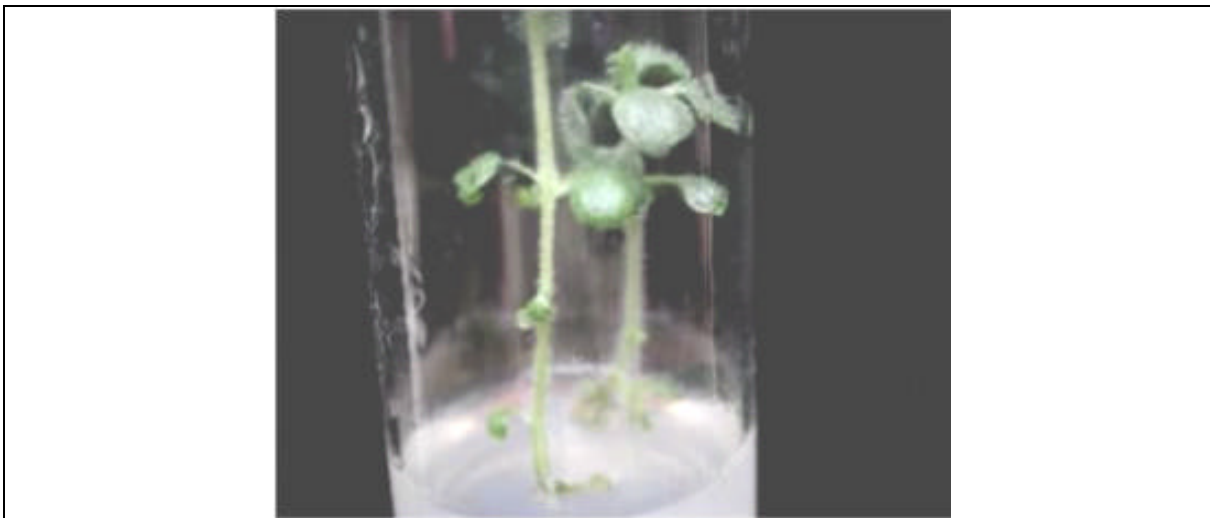
**FIGURA 27 brotes transgénicos de tres cultivares, relativos al tipo de citoquinina a utilizar.**

El promedio de brotes obtenido para el cultivar Desirée fue de 3.53 brotes por explante, lo que es bajo en relación a otros trabajos de transformación, los cuales varían de 6,8- 11.1 (YEE *et al.*, 2001; BEAUJEAN *et al.*, 1998). En la Figura 28, se muestran distintos grados de regeneración para explantes de entrenudo.



**FIGURA 28 Distintos grados de brotación en explantes de entrenudo.**

Una vez terminado el período de regeneración, se procedió a sacar los brotes y llevarlos a un medio de cultivo igual al utilizado en la mantención de las plantas. Sólo se pudieron obtener plantas del cultivar Desirée, ya que los pocos brotes formados para los cvs Shepody y Kennebec, se perdieron por la reaparición de *A. tumefaciens*. Por lo cual, se obtuvieron 16 líneas transgénicas para el cultivar Desirée (Figura 29).



**FIGURA 29** Planta *in vitro* transgénica del cultivar Desirée.

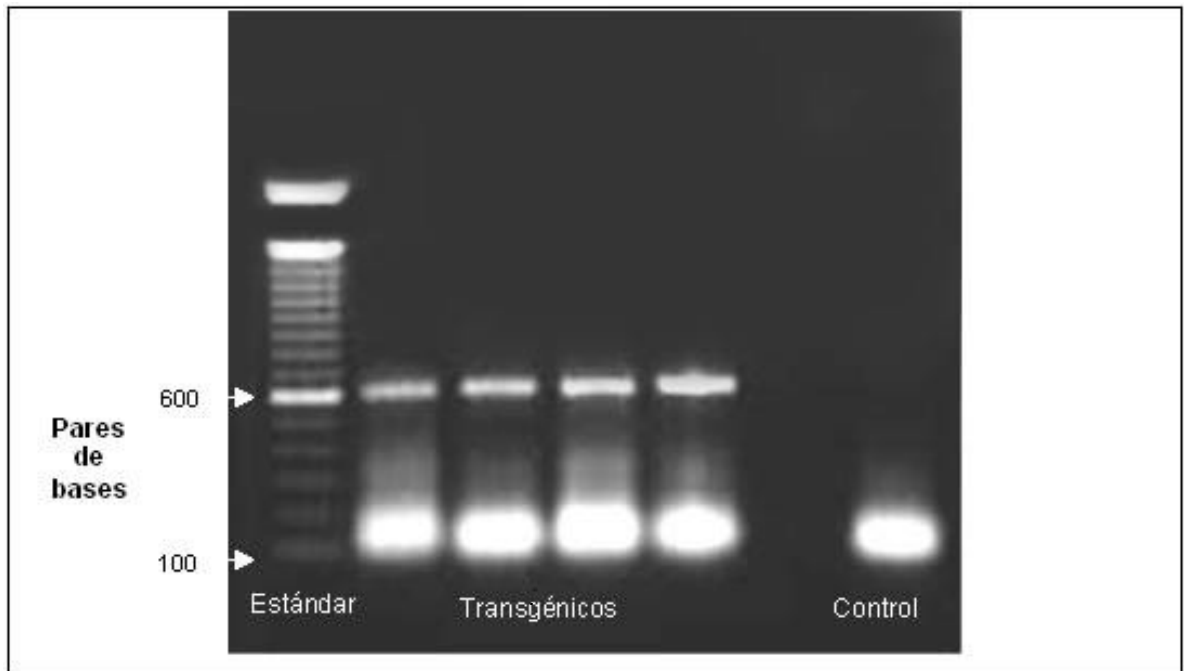
#### **4.6 Análisis molecular.**

Una vez enraizadas las plantas, se extrajo ADN desde las hojas y tallos del cultivar Desirée. Este fue sometido a la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando partidores específicos para lograr amplificar el gen NFTII en las líneas transgénicas obtenidas.

Una primera confirmación de la naturaleza transgénica de las plantas, ya se obtuvo al observar el crecimiento; tanto de callo como regeneración de éstos en medios selectivos con kanamicina; ya que sólo las células transformadas son capaces de crecer en niveles normalmente tóxicos para una célula vegetal. (CONNER *et al.*, 1991).

En la Figura 30, se puede apreciar claramente la presencia de la banda amplificada para el gen NFTII (603 bp), la cual está presente en las líneas transgénicas seleccionadas y no en el testigo, que es una planta Desirée sin transformar. Esto asegura la naturaleza transgénica de las plantas debido a la presencia de el gen marcador NFTII.

Algunas de las pruebas que se deberían realizar en estas líneas transgénicas, son: PCR para el gen magainina, evaluaciones del número de copias insertas dentro del genoma de la planta, evaluación de su expresión, y posteriormente ver su respuesta en invernadero.



**FIGURA 30** Gel de electroforesis que compara 4 plantas transgénicas Desirée (hoja y tallo) con el gen NFTII, con respecto a un testigo del mismo cultivar sin la presencia de dicho gen.

## 5 CONCLUSIONES

De acuerdo a este trabajo se puede concluir:

- Una metodología eficiente de inoculación sería la utilización de las bacterias diluidas en una proporción de 1:10, ya que la presencia de callos en explantes de entrenudo es dependiente de la dilución de las bacterias.
- La presencia y cobertura de callo, así como también la cobertura de brotes en explantes de entrenudo es independiente del tipo de corte.
- Hasta la etapa de selección, los explantes más apropiados en relación a la presencia de callo fueron los de entrenudo, pero al evaluar regeneración no existieron diferencias.
- Es posible reducir el tiempo de regeneración utilizando como fuente de citoquinina el ribósido de zeatina, ya que este permitió una regeneración más rápida en comparación a 6-bencil amino purina, y una mayor cantidad de explantes con brotes después de un mes de regeneración.
- Los cultivares Desirée, Kennebec y Shepody no presentaron diferencias estadísticas significativas en cuanto a la presencia de callo hasta la etapa de selección, pero si la presentaron en regeneración, siendo Desirée el cultivar que logró las tasas más altas de regeneración de un 58%.
- A través de la técnica PCR fue posible evaluar la presencia en el genoma de las plantas del gen marcador NFTII, lo que evidenció la naturaleza transgénica de estas plantas.
- El protocolo óptimo de transformación, para esta investigación, comprendería la utilización de las bacterias diluidas en proporción de 1:10, explantes de entrenudo cortados en forma de disco, y en regeneración utilizar como fuente de citoquininas el ribósido de zeatina.

## 6 RESUMEN

Dentro de las enfermedades bacterianas que atacan al cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en el sur de Chile, se destaca la acción de género *Erwinia*, que provoca pudriciones blandas; y el género *Streptomyces*, que produce la sarna común.

Las únicas formas de enfrentar estos problemas son de manera preventiva o a través del mejoramiento genético. Dentro de este último encontramos la ingeniería genética, que representa una alternativa interesante, ya que mantiene las características del cultivar incorporando sólo los genes de interés.

Existen numerosos protocolos publicados para la transformación de *S. tuberosum*, sin embargo, ellos presentan una gran diversidad.

El objetivo de este trabajo fue determinar una metodología eficiente de inoculación y tratamiento de los explantes previo y durante el proceso de transformación y regeneración, que conduzcan a generar un protocolo que permita la transferencia de genes líticos a cultivares de papa de importancia económica en Chile.

Se utilizaron tres cultivares de papa: Desirée, Kennebec y Shepody, los cuales fueron transformados con el vector *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105. Este vector posee el plasmidio pBINPLUS, en el que está contenido el gen magainina 2. Este gen codifica un péptido de acción lítica, que tendría una acción sobre *Erwinia* y *Streptomyces*.

De acuerdo, a esta investigación, el protocolo óptimo de transformación comprendería la utilización de las bacterias diluidas en proporción de 1:10, explantes de entrenudo cortados en forma de disco y la utilización de ribósido de zeatina como fuente de citoquinina en regeneración.

## SUMMARY

*Erwinia* soft rot and common scab caused by *Streptomyces* spp. are among the most important bacterial diseases that affect potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) in southern Chile.

The only way of facing these problems is through prevention or genetic breeding. In the latter case, genetic engineering represents an interesting alternative, since it maintains cultivar characteristics by incorporating only the specific gene of interest.

A number of protocols for the transformation for *S. tuberosum* have been published, however, they show great diversity in their methodology.

The objective of this research was to determine an efficient methodology for the inoculation and treatment of the explants before and during the transformation and regeneration process. This methodology would lead to the generation of a protocol which allows to transfer litic genes to cultivares of economic importance in Chile.

Three potato cultivars (Desirée, Kennebec and Shepody) were transformed using the vector *Agrobacterium tumefaciens*, strain EHA105. This carries the pBINPLUS plasmid, which contains the magainin 2 gen, that codifies for a peptide with litic activity, which would have an action upon *Erwinia* and *Streptomyces*.

Results of this study showed that the most appropriate protocol of transformation would include the use of *A. tumefaciens* diluted up to a proportion of 1:10, cut explants in form of disc and the use of zeatin riboside as cytokinin source in regeneration.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- ACUÑA, I. 1993. Diagnóstico de la pudrición blanda y pie negro (*Erwinia* spp.) de la papa. In: Lopez, C y Espinoza, N. (eds). Enfermedades bacterianas de la papa. Memorias del taller sobre enfermedades bacterianas de la papa. 15-18 de marzo de 1993. Brasilia. Brasil. pp: 71-82.
- ACUÑA, I. 1994. Enfermedades bacterianas del cultivo de la papa. In: Rojas, J; Accatino, P y Kalazich, J. (eds). Metodologías para la producción y uso de tubérculos de papa en Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Serie Remehue N°51. Pp. 77-87.
- ACUÑA, I. y RIFFO, P. 1993. Prospecciones de pié negro y potencial de infección latente (*Erwinia* sp) en semilleros de papa de la X Región de Chile. Agricultura Técnica 53(2):179-183.
- AGRIOS, G. 1995. Fitopatología. 2ª ed. México. Editorial Limusa. 838p.
- ARCE, P.; MORENO, M.; GUTIERREZ, M.; GEBAUER, M.; DELL'ORTO, P.; TORRES, H.; ACUÑA, I.; OLIGER, P.; VENEGAS, A.; JORDANA, X; KALAZICH, J. y HOLUIGUE, L. 1999. Enhanced resistance to bacterial infection by *Erwinia carotovora* Subsp *atroseptica* in transgenic potato plants expressing the attacin or cecropin SB-37 genes. American Journal of Potato Research 76:169-177.
- BEAUJEAN, A.; SANGWAN, R.; LECARDONNEL, A. y SANWAN B. 1998. Agrobacterium-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. Journal of Experimental Botany 49(326): 1589-1595.
- BINNS, A. 1999. Genetic and biochemical analysis of *Agrobacterium*-plant cell interaction. University of Pennsylvania. <<http://www.sas.upenn.edu/biology/faculty/binns/index.html>> (03 marzo 2000).



- BUCHANAN, R. y GIBBSON, N. 1974. Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology. 8<sup>a</sup> ed. USA. Waverly Press. 1268p.
- CHEN, H.; BROWN, J.; MORELL, J. y HUANG, C. 1988. Synthetic magainin analogues antibacterial activity. FEBS letters. Elsevier Science Publishers. 236: 462-466.
- CIAMPI, L. y ANDRADE, N. 1984. Preliminary evaluation of bacterial soft rot resistance in native chilean potato clones. American Potato Journal 61:109-112.
- CIAMPI, L.; OJEDA, S. y BUSTAMANTE, P. 1991. Bacterial soft rot of potatoes in southern Chile in winter period. Agro Sur Chile 19(1):1-7.
- CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. CIP. 1980. Compendio de enfermedades de la papa. Lima. Perú. CIP. 163p.
- CONNER, A.; WILLIAMS, M.; GARDENER, R.; DEROLES, S.; SHAW, M. y LANCASRER, J. 1991. Agrobacterium- Mediated transformation of New Zealand potato cultivars. New Zealand Journal of Crops and Horticulture Science 19: 1-8.
- CONTRERAS, A. 1984. Germoplasma Chileno de Papa (*Solanum* ssp). **In**. Contreras, A y Esquinas, J. (eds). Anales del simposio de recursos fitogenéticos . Valdivia. Chile. 20-22 de noviembre. pp. 43-75.
- CONTRERAS, A. 1991. El cultivo de la Papa. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 33p.
- CONTRERAS, A. 1997. Producción de papa-semilla, para pequeños agricultores del sur de Chile. 2<sup>a</sup> ed. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 83p.
- CUBILLOS, A. 1990. Biotecnologías e ingeniería genética y su aplicaciones en papa. **In**. Hidalgo, O y Rincón, H. Avances en el mejoramiento genético de la papa, en los países del cono sur. Centro internacional de la papa. Buenos Aires. Argentina. 26-29 de Enero 1990. pp. 223-260.

- DALE, P. y HAMPSON, K. 1995. An assessment of morphogenic and transformation efficiency in a range of varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Euphytica* 85: 101-108.
- DE BOER, S. 1994. Prospects for control of potato diseases caused by pectolytic *Erwinias*. **In**. *Advances in potato pest. Biology and management*. Aps press. The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota. 655p.
- DESTEFANO, L.; NAGPALA, P.; KIM, J.; DODDS, J. y JAYNES, J. 1991. Use of synthetic genes to enhance nutritional quality and disease resistance. **In**. Centro Internacional del la Papa (ed). *Molecular methods for potato improvement*. Centro Internacional de la Papa. Lima Peru. pp. 44-64.
- DESTEFANO, L. NAGPALA, P; CETIBER, S. DENNY, T. y JAYNES, J. 1993. Using genes encoding novel peptides and proteins to enhance disease resistance in plants. **In**. Chet, I. (ed). *Biotechnology in plant to disease control*. Wiley-Liss. New York. pp: 175-189.
- DUNWELL, J. 1999. Transgenic Crops: The Next Generation, or an Example of 2020 Vision. *Annals of Botany* 84:269-277.
- GEORGE, E. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 2<sup>a</sup> ed. England. Exegetics Ltda. 555 p.
- GRANT, J.; DOMMISSE, M.; CHRISTEY, M. y CONNER, A. 1991. Gene transfer to plants using *Agrobacterium*. **In**: Murray, D. (ed). *Advanced methods in plant breeding and biotechnology*. CAB, International Biotechnology in Agriculture N°4.
- GRIFFITHS, A.; JEFFREY, M.; SUZUKI, D.; LEWONTIN, R y GELBART, W. 1992. *Introducción al análisis genético*. New York USA. Interamericana. 863p.
- GODWIN, I.; TODD, G.; FORD, B. y NEWBURY, H. 1991. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. *Plant Cell Reports* 9:671-675.

- HARTL, D. y JONES, E. 1998. Genetics, Principles and Analysis. 4<sup>a</sup> ed. United States. Jones and Bartlett publishers. 737p.
- HENZI, X; CHRISTEY, M.; McNEIL, D. y DOWNS, C. 1998. Transgenic Broccoli (*Brassica oleracea* L. CV. "*Italica*") plants containing an antisense acc oxidase gene. *Acta Horticulturae* 464: 147-151.
- HENZI, X.; CHRISTEY, M.; McNEIL, D. y DAVIES, K. 1999. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* L. Var. *Italica*) with an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase gene. *Plant Science* 143:55-62.
- HENZI, X. 1999. Genetically modified broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) containing an antisense acc oxidase gene. Thesis Ph.D. Lincoln University. Canterbury, New Zealand. 167 p.
- HENZI, X.; CHRISTEY, M. y McNEIL, D. 2000. Factors that influence *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*). *Plant Cell Reports* 19:994-999.
- HIGGINS, E.; HULME, J. y SHIELDS, R. 1992. Early events in transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*. 82: 109-118.
- HIGGINS, E. 1992. Early assessment of factors affecting the efficiency of transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *AgBiotech News and Information* 4: 341-346.
- HOOYKAAS, P.; MELCHERS, L.; RODENBURG, K. y TURK, S. 1991. The *Agrobacterium* virulence system. In: Herrmann, R y Larkins, B. *Plant Molecular Biology* 2. New York. Plenum Press. pp 193-204.
- HULTMARK, D.; STEINER, H.; RASMUSON, T. y BOMAN, H. 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bacterial proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry*. 106:7-16.

- KALAZICH, J.; HOLUIGUE, L.; TORRES, H.; ROJAS, J.; LOPES, H. GUTIERREZ, M. y ARCE, P. 2000. Resistencia de Campo a *Erwinia carotovora* sub-especie atroceptica en clones de papa transgénicas que expresan los géneros lisozima, atacina y la cecropina análoga SB-37. XIX Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa. 28 de febrero –3 de marzo del 2000. La Habana. Cuba.
- KRISTYANNE, E.; KIM, K. y STEWART, J. 1997. Magainine 2 effects on the ultrastructure of five plants pathogens. 89(3): 353-360.
- LATORRE, B. 1992. Enfermedades de las plantas cultivadas. 4ª ed. Santiago, Chile. Ediciones Universidad Católica de Chile. 628p.
- LEPPE, A. 1993. Producción de platas transgénicas de papa (*Solanum tuberosum*) resistentes a *Erwinia* sp. Mediante técnicas de ingeniería genética con *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis Lic. Agr. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Agronomía. Santiago, Chile. 141 p.
- LIPP, K. 1993. Molecular and cellular mechanisms of *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science* 45(2): 104-109.
- LORIA, R. 1994. Common and acid scab of potato: Management etiology and potential uses for the phytotoxins produced by *Streptomyces* species. In. *Advances in potato pest. Biology and management*. St Paul. Minnesota. Aps press. The American Phytopathological Society. 655p.
- LUDTKE, S. y HUANG, H. 2000. Membrane Thinning Caused by Magaimin-2. <<http://ion.rice.edu/~huang/papers/paper1/paper.frame.html>> (23 de junio 2001).
- M´HAMDI, M.; CEVALLOS, E.; RITTER, E. y RUIZ DE GALARRETA, J. 1998. Evolución de la capacidad de regeneración en *Solanum tuberosum* L. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* 13(1-2):159-166.

- MONTALDO, A. y SANZ, C. 1962. Las especies de papas silvestres y cultivadas de Chile. *Agricultura Técnica* 22(1-2):66-152.
- NAUERBY, B.; BILLING, K. y WYNDAELE, R. 1997. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbencillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 123: 169-177.
- NESTER, E. y GORDON, M. 1994. Molecular strategies in the interaction between *Agrobacterium* and its host. In. *Agrobacterium Host Interaction*. pp 9-13.
- POTRYKUS, I. 1991. Gene Transfer to Plant: Assessment of published Approaches and Results. *Plant Molecular Biology*. 42: 205-225
- PUDDEPHAT, I.; RIGGS, T. y FENINING, T. 1996. Transformation of *Brassica oleracea* L. acritical review. *Molecular Breeding*. 2:185-210.
- RAVEN, P.; EVERT, R. y EICHHORN, S. 1992. *Biology of Plant*. 5ª ed. New York. Worth Publishers. 769 p.
- RIVA, G.; GONZALEZ, J.; VAZQUEZ, R. y AYRA, C. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1(3): 1-19. <<http://www.ejb.org/content/vol1/issue3/full/1/index.html>> (18 de julio 2001)
- SARMENTO, G.; ALPERT, K.; TANG, F. y PUNJA, Z. 1992. Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and expression of kanamycin resistance in pickling cucumber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31:184-193.
- SERRANO, C.; ARCE, J.; TORRES, H.; GEBAUER, M.; GUTIERREZ, M.; MORENO, M.; JORDAN, X.; VENEGAS, A.; KALAZICH, J. y HOLUIGUE, L. 2000. Expression of the chicken lysozyme gene in potato enhances resistance to infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *American Journal of Potato Research* 77(3): 191-199.

- WENYU, Y. y XUERONG, Z. 1997. Transformation of in vitro grown potato using an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. *Phytomorphology* 47(2): 141-149.
- WILLSON, C. y CONNER A. 1995. Activity of antimicrobial peptides against the causal agents of common scab, black leg and tuber soft rot diseases of potato. *New Zealand Natural Sciences* 22: 43-50.
- YEE, S.; STEVENS, B.; COLEMAN, S.; SEABROOK, J. y LI, Z. 2001. High Efficiency Regeneration *in vitro* from Potato Petioles with Intact Leaflets. *American Journal of Potato Research* 78: 151-157.
- ZASLOFF, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Microbiology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84: 5449-5453.
- ZASLOFF, M.; MARTIN, B. y CHEN, H. 1988. Antibacterial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Microbiology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85: 910-913.
- ZHU, J.; OGER, P.; SCHRAMMERIJER, B.; HOOYKAAS, P.; FARRAND, S. y WINANS, S. 2000. Minireview. The bases of Crown Gall Tumorigenesis. *Journal of Bacteriology* 182 (14): 3885-3895.

## **ANEXOS**

**ANEXO 1 Medio LB sólido.**

| Concentración              |        |
|----------------------------|--------|
| 1% Bactotriptona           | 10 g/L |
| 0,5 % extracto de levadura | 5 g/L  |
| 0,5 % NaCl                 | 5 g/L  |
| Bacto Agar                 | 15 g/L |

**ANEXO 2 Medio LB Liquido.**

| Concentración              |        |
|----------------------------|--------|
| 1% Bactotriptona           | 10 g/L |
| 0,5 % extracto de levadura | 5 g/L  |
| 0,5 % NaCl                 | 5 g/L  |



### ANEXO 3 Prueba de independencia entre dilución y la presencia de callo

| Dilución |     |            |       |
|----------|-----|------------|-------|
| Callo    | Sin | Con (1:10) | Total |
| Con      | 174 | 207        | 381   |
| Sin      | 140 | 108        | 248   |
| Total    | 314 | 315        | 629   |

| Chi-cuadrado | Grados de libertad | p-valor |
|--------------|--------------------|---------|
| 6,99         | 1                  | 0,0082  |
| 6,56         | 1                  | 0,0104* |

\* Con corrección de Yates

### ANEXO 4 Prueba de independencia entre la presencia de callo y la forma de corte en explantes de entrenudo

| Tipo de corte |       |              |       |
|---------------|-------|--------------|-------|
| Callo         | Disco | Longitudinal | Total |
| Con           | 40    | 37           | 77    |
| Sin           | 20    | 23           | 43    |
| Total         | 60    | 60           | 120   |

| Chi-cuadrado | Grados de libertad | p-valor  |
|--------------|--------------------|----------|
| 0,33         | 1                  | 0,5679   |
| 0,14         | 1                  | 0,7034 * |

\* Con corrección de Yates

### ANEXO 5 Prueba de independencia entre la cobertura de callo por explante y la forma de corte

| Tipo de corte |       |              |       |
|---------------|-------|--------------|-------|
| Cobertura     | Disco | Longitudinal | Total |
| Alta          | 13    | 10           | 37    |
| Baja          | 27    | 27           | 40    |
| Total         | 23    | 54           | 77    |

| Chi-cuadrado | Grados de libertad | p-valor |
|--------------|--------------------|---------|
| 0,27         | 1                  | 0,6001  |
| 0,08         | 1                  | 0,7833* |

\* Con corrección de Yates

### ANEXO 6 Prueba de independencia entre la cobertura de brotes por explante y la forma de corte

| Tipo de corte |       |              |       |
|---------------|-------|--------------|-------|
| Cobertura     | Disco | Longitudinal | Total |
| Alta          | 19    | 11           | 38    |
| Baja          | 21    | 27           | 40    |
| Total         | 30    | 48           | 78    |

| Chi-cuadrado | Grados de libertad | p-valor |
|--------------|--------------------|---------|
| 2,83         | 1                  | 0,0923  |
| 2,10         | 1                  | 0,1469* |

\* Con corrección de Yates

**ANEXO 7 Análisis de varianza en relación al porcentaje de explantes con callo, según los factores cultivar y explante.**

$$A_{\text{seno}} \sqrt{(\% \text{Explante}_{\text{con callos}} / 100)}$$

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado medio | F calculado | Valor-P   |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------|-------------|-----------|
| A. Explante         | 1257,63           | 1                  | 1257,63        | 16,59       | 0,0004 ** |
| B. Cultivar         | 15,4325           | 2                  | 7,71626        | 0,1         | 0,9036    |
| C. Repetición       | 1801,77           | 5                  | 360,354        | 4,7         | 0,0037    |
| Interacción         |                   |                    |                |             |           |
| AB                  | 1467,16           | 2                  | 733,581        | 9,68        | 0,0008**  |
| Error               | 1819,53           | 24                 | 75,8137        |             |           |
| Total               | 6360,9            | 34                 |                |             |           |

**ANEXO 8 Análisis de varianza en relación al porcentaje de explantes con brotes a los 7 días en regeneración, según los factores explante y método.**

$$A_{\text{seno}} \sqrt{(\% \text{ explantes}_{\text{con brotes}} / 100)}$$

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado medio | F calculado | Valor-P  |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------|-------------|----------|
| A. Explante         | 14,3122           | 1                  | 14,3122        | 0,30        | 0,6018   |
| B. Método           | 1596,43           | 1                  | 1596,43        | 33,82       | 0,0011** |
| C. Repetición       | 137,986           | 2                  | 68,9931        | 1,46        | 0,3040   |
| Interacción         |                   |                    |                |             |          |
| AB                  | 13,5187           | 1                  | 13,5187        | 0,29        | 0,6118   |
| Error               | 283,206           | 6                  | 47,201         |             |          |
| Total               | 2045,45           | 11                 |                |             |          |

**ANEXO 9    Análisis de varianza en relación al porcentaje de brotes regenerados a los 28 días, según los factores cultivar, explante y método.**

$$A_{\text{seno}} \sqrt{(\% \text{transgenicos} / 100)}$$

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado medio | F calculado | Valor-P  |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------|-------------|----------|
| A Cultivar          | 11264,5           | 2                  | 5632,26        | 59,21       | 0,0000** |
| B Explante          | 278,387           | 1                  | 278,387        | 2,93        | 0,1012   |
| C Método            | 631,639           | 1                  | 631,639        | 6,64        | 0,0175*  |
| D Repetición        | 66,8828           | 2                  | 33,4414        | 0,35        | 0,7075   |
| Interacción         |                   |                    |                |             |          |
| AB                  | 506,939           | 2                  | 253,47         | 2,66        | 0,0920   |
| AC                  | 1390,78           | 2                  | 695,39         | 7,31        | 0,0037** |
| BC                  | 19,1775           | 1                  | 19,1775        | 0,20        | 0,6578   |
| Error               | 2092,7            | 22                 | 95,1225        |             |          |
| Total               | 16774,5           | 33                 |                |             |          |

**ANEXO 10 Análisis de Kruskal-Wallis para contaminación en explantes de hoja y entrenudo.**

| <b>Explante</b> | <b>Tamaño muestra</b> | <b>Promedio</b> |
|-----------------|-----------------------|-----------------|
| Hoja            | 17                    | 21,79           |
| Entrenudo       | 17                    | 13,20           |

Test estadístico = 9,15      6      Valor P=0,0024