

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología - Microbiología

"Co - transformación genética de *Solanum tuberosum* cv. Desireé por introducción y expresión de los genes Citocromo P450 (*CYP79A2*, *CYP83B1*) y el gen γ - *glutamil peptidasa 1* (*GGP1*) para la producción de bencilglucosinolato"

TESIS

Presentada por:

Bach. Karina del Rosario Cancino Maldonado

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA - PERÚ

2014

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA
FACULTAD DE CIENCIAS**

Tesis N°233

**TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO – MICROBIÓLOGO**

El Secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias certifica que con Resolución de Facultad 7944-2014-FACI-UN/JBG, ha designado como jurados para la sustentación de Tesis.

“Co - transformación genética de *Solanum tuberosum* cv. Desireé por introducción y expresión de los genes Citocromo P450 (*CYP79A2*, *CYP83B1*) y el gen γ - *glutamil peptidasa 1* (*GGP1*) para la producción de bencilglucosinolato”

PRESIDENTE: Dr. SEGUNDO MANUEL ALVARADO CONTRERAS

SECRETARIO: Msc. DALADIER MIGUEL CASTILLO COTRINA

MIEMBRO: Msc. ÁNGELA VERÓNICA CHOQUE MIRANDA

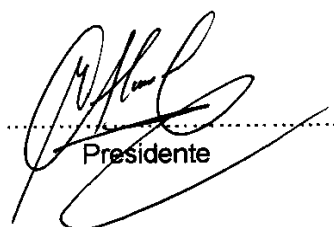
Para examinar y calificar el trabajo de Tesis sustentado en acto público el día 26 de noviembre de 2014.

Presentado por el Bachiller **KARINA DEL ROSARIO CANCINO MALDONADO**, de la Escuela Académico Profesional de Biología - Microbiología.

El jurado calificador, en forma secreta e individual se pronunció sobre el calificativo del trabajo expuesto y procedió a emitir el siguiente resultado:

APROBADO por UNANIMIDAD con 3 votos a favor y promedio de SOBRESALIENTE.

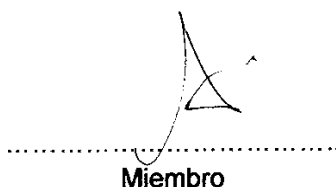
Para ratificar lo detallado firman:



Presidente



Secretario



Miembro

DEDICATORIA

A Dios, mi máximo protector y mejor amigo.

A mi familia, lo más importante y hermoso que tengo; y en especial a mi madre, mi asesora de vida.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su cariño y apoyo incondicional en mi formación personal y profesional, además de mi amiga María C. por su compañía, amistad y apoyo infaltable durante la realización de esta tesis.

Mi agradecimiento a los asistentes (Juan Daniel, Julio, Mariela, Kathy, Milton, Dorita y Sandra), técnicos (Martín, Joel, Betito, Luchito y José), tesistas y practicantes (en ese entonces Laura, Diana, Eli, Romina, Yurico, María D. y Luis), tanto del ABL como de otras Áreas, amigos todos del Centro Internacional de la Papa, en especial a Cristina Rivera, Lupe Román y Jeannette Orbregozo por su tiempo, enseñanzas, apoyo y sincera amistad.

Mi agradecimiento, también, al Dr. Eric Cosio por permitirme ser parte de la PUCP y de la Facultad de Química, gracias a mis compañeros del Laboratorio de Bioanalítica Eliana y Fabián, además de las futuras Licenciadas Químicas Antonella, Brenda, Sandra y Emiliano, que con su energía alegraban todos los días, además quiero agradecer en especial a la Sra. Carmen por sus consejos junto a sus largas horas de plática y a Alex por brindarme su confianza, experiencia y amistad.

A todos los docentes y maestros que a lo largo de mi carrera supieron inspirarme el sentido de la investigación en especial a mi asesor, Prof. Aragón, por los conocimientos brindados y su motivación a seguir aprendiendo.

CONTENIDO

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
CONTENIDO	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE GRÁFICAS	XIII
ÍNDICE DE ANEXOS	XIV
ABREVIACIONES	XV
RESUMEN	XVI
ABSTRACT	XVIII

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.2 PREGUNTA CIENTÍFICA	4
1.3 OBJETIVO GENERAL	4
1.4 OBJETIVO ESPECÍFICOS	5
1.5 HIPÓTESIS	5

II. MARCO TEÓRICO	6
2.1 GENERALIDADES DEL CULTIVO DE PAPA	6
2.2 ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE TEJIDOS	8
2.3 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN PLANTAS	9
2.4 TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
2.4.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
2.4.2 Mecanismo de transferencia del ADN-T mediado por <i>Agrobacterium</i>	15
2.4.3 Transformación genética en papa por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
2.5 PIRAMIDIZACIÓN DE GENES	21
2.6 MARCADORES DE SELECCIÓN	26
2.6.1 Gen <i>bar</i> como marcador de selección	28
2.7 GLUCOSINOLATOS	30
2.7.1 Estructura química	32
2.7.2 Biosíntesis de glucosinolatos	33
2.7.3 Degradación	39
2.7.4 Transporte en plantas	40
2.7.5 Función biológica	41

2.7.6	Regulación de la biosíntesis	43
2.7.7	Importancia	46
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	48
3.1	LUGAR DE EJECUCIÓN	48
3.2	CONCEPTOS OPERATIVOS	48
3.3	MATERIAL BIOLÓGICO	50
3.3.1	Bacteria, vector y construcción genética	51
3.4	MÉTODOS	54
3.4.1	Verificación de los vectores de transformación	54
3.4.2	Propagación del material vegetal	57
3.4.3	Determinación de concentración mínima letal de fosfinotricina	59
3.4.4	Transformación genética	60
3.4.5	Análisis molecular	64
3.4.6	Análisis bioquímico	70
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	88
IV.	RESULTADOS	91
V.	DISCUSIÓN	128

VI. CONCLUSIONES	147
VII. RECOMENDACIONES	148
VIII. PERSPECTIVA	148
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149
X. ANEXOS	166

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Pasos básicos en la transformación de células vegetales por <i>Agrobacterium</i> .	
	Fuente: Zupan <i>et al.</i> , 2000.	19
Figura 2:	Biosíntesis de los glucosinolatos.	
	Fuente: Halkier <i>et al.</i> , 2006.	38
Figura 3:	Plásmido pRbsc:ORF1.3.	
	Fuente: elaboración personal.	53
Figura 4:	Plántula de papa <i>Solanum tuberosum</i> cv. Desireé en caja plástica estéril.	
	Fuente: elaboración personal.	58
Figura 5:	<i>A.tumefaciens</i> con plásmido pRBSc:ORF1.3 en placa Petri con medio LB suplementado con kanamicina.	
	Fuente: elaboración personal.	61
Figura 6:	Cambio de placas cada 15 días a medio de regeneración MSA fresco.	
	Fuente: elaboración personal.	63
Figura 7:	Representación esquemática de iniciadores.	
	Fuente: elaboración personal.	67
Figura 8:	Colector MultiScreen HTS Vaccum Manifold.	
	Fuente: elaboración personal.	72
Figura 9:	Verificación del vector de transformación.	
	Fuente: elaboración personal.	92
Figura 10:	Toxicidad de fosfotricina.	
	Fuente: elaboración personal.	94

Figura 11:	Explantos de D[SUR1/ST/GT]85.2 co-transformados con el plásmido pRBCs:ORF1.3 en medio de regeneración MSA suplementado con 2 ppm de fosfotricina.	
	Fuente: elaboración personal.	95
Figura 12:	Control negativo (4 semanas).	
	Fuente: elaboración personal.	96
Figura 13:	Control positivo (8, 10 y 16 semanas).	97
	Fuente: elaboración personal.	
Figura 14:	Regeneración de explantes.	
	Fuente: elaboración personal.	98
Figura 15:	Regenerante de co- transformación en medio de regeneración MSA (4 semanas).	
	Fuente: elaboración personal.	99
Figura 16:	Calidad de ADN.	
	Fuente: elaboración personal.	101
Figura 17:	Análisis PCR de los regenerantes obtenidos por co-transformación genética con pRBSc:ORF1.3.	
	Fuente: elaboración personal.	102
Figura 18:	Cromatograma representativo de la solución estándar de desulfobencilglucosinolato 5,79 μ M.	
	Fuente: elaboración personal.	107
Figura 19:	Espectro ultravioleta de desulfobencilglucosinolato estándar.	
	Fuente: González, 2008.	105
Figura 20:	Fenotipo de plántulas <i>in vitro</i> positivas para la producción de dBGLs.	
	Fuente: elaboración personal.	109

Figura 21:	Cromatograma representativo del extracto de hojas de <i>S.tuberosum</i> cv. Desireé transformadas con “contruc.3” y “pRbsc:ORF1.3” (Evento 26) comparado con el cromatograma de <i>S.tuberosum</i> cv. Desireé sin transformar (WT).	
	Fuente: elaboración personal.	111
Figura 22:	Fenotipo de plántulas en condiciones de invernadero positivas para la producción de dBGLs.	
	Fuente: elaboración personal.	114
Figura 23:	Cromatograma representativo del ion molecular dedesulfobencilglucosinato estándar con sodio. $[M+Na]^+$ 352 m/z.	
	Fuente: elaboración personal.	116
Figura 24:	Cromatograma de masas por inyección directa de dBGLs estándar $[M+ Na]^+$ 352,1 Da (Arriba) y fragmentación de dBGLs $MS2^+$ 352,1 Da en m/z: 219,1; 185,2; 189,8; 203,1 (abajo).	
	Fuente: elaboración personal.	121
Figura 25:	HPLC-ESI- MS^+ Desulfobencilglucosinato estándar.	
	Fuente: elaboración personal.	122
Figura 26:	Fragmentación de dBGLs en <i>Solanumtuberosum</i> cv. Desireé (Construc.3 + pRBsc:ORF1.3) - GLS 5.	
	Fuente: elaboración personal.	123
Figura 33:	Análisis GC-MS de papa para la detección de	125

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Mezcla de reacción para digestión enzimática - <i>E.coli</i> . Fuente: Ñopo <i>et al.</i> 2003.	56
Tabla 2:	Mezcla de reacción para digestión enzimática - <i>A.tumefaciens</i> . Fuente: Ñopo <i>et al.</i> 2003.	57
Tabla 3:	PCR de gradiente de temperatura. Fuente: Ñopo <i>et al.</i> 2003.	68
Tabla 4:	Mezcla de reacción utilizada para la PCR. Fuente: Ñopo <i>et al.</i> 2003.	69
Tabla 5:	Pesos de muestras para experimento de detección de productos de hidrólisis de glucosinolatos. Fuente: elaboración personal.	87
Tabla 6:	Pesos moleculares de los fragmentos de restricción por digestión enzimática del plásmido pRBSc:ORF1.3. Fuente: elaboración personal.	91
Tabla 7:	Experimentos de transformación y número de regenerantes obtenidos. Fuente: elaboración personal.	100
Tabla 8:	Resumen de resultados de la prueba de cadena de la polimerasa. Fuente: elaboración personal.	103

Tabla 9:	Resultados del análisis por HPLC-UV de plántulas co- transformadas. Fuente: elaboración personal.	108
Tabla 10:	Codificación de plántulas transformadas seleccionadas para ser trasladados a condiciones de invernadero. Fuente: elaboración personal.	113
Tabla 11:	Concentración de dBGLs en <i>S.tuberosum</i> en condiciones de invernadero. Fuente: elaboración personal.	118
Tabla 12:	Numeración de analitos y tiempo de retención. Fuente: elaboración personal.	126
Tabla 13:	Áreas de integración y porcentaje de pureza de analito. Fuente: elaboración personal.	127

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Curva de calibración para la cuantificación de dBGLS por HPLC- UV.	
Fuente: elaboración personal.	105
Gráfica 2: Concentración dBGLS en plántulas transformadas en condiciones <i>in vitro</i> .	
Fuente: elaboración personal.	110
Gráfica 3: Curva de calibración para la cuantificación de dBGLS por LC- ESI-UV.	
Fuente: elaboración personal.	115
Gráfica 4: Concentración dBGLS por peso fresco de plántulas transformadas en condiciones de invernadero.	
Fuente: elaboración personal.	119
Gráfica 5: Concentración dBGLS por peso seco de eventos en condiciones de invernadero.	
Fuente: elaboración personal.	120
Gráfica 6: Identificación de analitos en cromatogramas GC-MS de plántulas transformadas en condiciones de invernadero.	
Fuente: elaboración personal.	128

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 01: Medios de cultivo.	166
Anexo 02. Preparación de soluciones stock de hormonas, vitaminas, herbicida y antibiótico.	168
Anexo 03. Protocolos de extracción.	170
Anexo 04. Solución para extracción de ADN.	175
Anexo 05. Soluciones de tinción, tampones y geles de agarosa.	176
Anexo 06: Purificación de sulfatasa por precipitación con etanol.	178
Anexo 07: Fragmentación de dBGLs.	180
Anexo 08: Cromatogramas GC-MS.	183
Anexo 09: Tablas suplementarias.	185

ABREVIACIONES

1. **ADN-T** : ácido desoxirribonucleico de transferencia
2. **CTAB** : bromuro de cetil-trimetil-amino
3. **CV** : cultivar
4. **CYP79** : familia 79 del citocromo P450
5. **CYP83** : familia 83 del citocromo P450
6. **DEAE** : dietil amino etanol
7. **DVB** : divinilbenceno
8. **GC-MS** : cromatografía de gases acoplada a masas
9. **GGP1** : glutamilpeptidasa 1
10. **HPLC** : cromatografía líquida de alta resolución
11. **LC-ESI-MS** : cromatografía líquida acoplada a masas con ionización electrospray
12. **ORF** : marco de lectura abierto
13. **PDMS** : polidimetilsiloxano
14. **PPT** : fosfotricina
15. **SPME** : fibra de micro extracción en fase sólida

RESUMEN

Los glucosinolatos son metabolitos secundarios derivados de los aminoácidos presentes en plantas crucíferas. Los glucosinolatos y sus productos de hidrólisis están envueltos en defensa de plantas contra patógenos e insectos, además de ser conocidos por su aroma característico, sus propiedades antibacteriales y preventivas contra el cáncer. Debido a este amplio rango de actividades biológicas y a que *Solanum tuberosum* viene siendo uno de los cultivos de mayor importancia mundial es que se desea incorporar glucosinolatos en plantas no crucíferas, como la papa.

Para lograr la inserción y expresión de estos metabolitos, se utilizó la co-transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el gen *bar* como marcador de selección. Los genes introducidos fueron *GGP1* (γ - glutamilpeptidasa 1) y los genes citocromo P450: *CYP79A2* y *CYP83B1*, logrando así completar la inserción de los genes principales involucrados en la biosíntesis de los glucosinolatos alifáticos a partir de fenilalanina en el ADN de *S. tuberosum*. Para detectar la correcta inserción, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Por otro lado, para identificar y determinar la concentración del analito (bencilglucosinolato), se analizaron extractos acuosos a partir de hojas de plántulas transformadas en condiciones *in vitro* así como en condiciones de invernadero, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La confirmación de la presencia de bencilglucosinolato en los extractos acuosos se llevó cabo mediante la fragmentación del analito e identificación de sus masas, utilizando cromatografía líquida con ionización electrospray asociado a masas (LC-ESI-MS). En busca de analitos producto de la hidrólisis de los glucosinolatos se realizó el análisis cromatográfico de gases asociado a masas (GC-MS).

Luego de los análisis moleculares y bioquímicos, se logró obtener plántulas co-transformadas de *S.tuberosum* con producción de bencilglucosinolato.

ABSTRACT

Glucosinolates are secondary metabolites derived from amino acids present in cruciferous plants. Glucosinolates, and their hydrolysis products, are involved in the defense mechanism of plants against pathogens and insects; additionally, they are well known for their characteristic scent, their antibacterial and cancer prevent properties. *Solanum tuberosum* is one of the major crops around the world, but this is not a cruciferous plant. There is a major concern about incorporating glucosinolates to potatoes, since these compounds have a wide range of biological activities.

In order to achieve the insertion and expression of these metabolites, the genetic co-transformation through *Agrobacterium tumefaciens* was employed, employing the *bar* gene as a selection marker. The introduced genes were *GGP1* (γ - glutamyl peptidase 1) and genes from cytochrome P450: *CYP79A2* and *CYP83B1*, to complete the insertion of the main genes involved on the glucosinolates biosynthesis derived from phenylalanine to *S. tuberosum* DNA. To verify the right insertion of the genes, a regular polymerase chain reaction (PCR) was performed.

In addition, to identify and determine the concentration of the analyte (benzylglucosinolate), the analyses of the aqua extracts from the leaves in *in vitro* and green house conditions was performed by Liquid Chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS). Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) was performed in order to identify analytes of glucosinolates hydrolysis.

Products of the biochemical and molecular analyses, the study obtained co-transformed seedlings of *S.tuberosum* with benzylglucosinolate production.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos del mejoramiento genético del cultivo de papa es introducir genes que confieran resistencia a enfermedades y patógenos. Si bien es cierto, la transformación genética con un sólo gen para obtener resistencia es muy conocida, es de interés en los últimos años la adición de varios genes que estén involucrados en una vía metabólica.

Los glucosinolatos son metabolitos secundarios derivados de aminoácidos presentes en las plantas crucíferas como por ejemplo el brócoli y la col.; siendo sus productos de hidrólisis bien conocidos por su aroma característico, sus propiedades antibacteriales y cáncer-preventivas, además de estar involucrados en la defensa de las crucíferas frente a insectos y patógenos, actuando como antimicrobianos y biopesticidas.

El cultivo de papa es uno de los principales cultivos de importancia mundial, el cual es susceptible a diversas enfermedades causadas por bacterias, hongos e insectos. Debido las actividades biológicas de los

glucosinolatos en plantas crucíferas se desea trasladar glucosinolatos a plantas no crucíferas.

Mediante la ingeniería genética se ha procedido a integrar los genes principales de la vía metabólica de los glucosinolatos en el genoma de papa teniendo así la posibilidad de dar protección a la planta durante su cultivo, tomando en cuenta la propiedad biopesticida de los glucosinolatos y sus derivados.

1.1 PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

La denominada Ingeniería Metabólica, estudio de vías metabólicas y su expresión en organismos transformados, ha iniciado una revolución en el mejoramiento genético de plantas. Si bien es cierto la idea de expresar rutas metabólicas es alentadora, ésta se ve limitada por la complejidad de controlar la expresión de todos los genes involucrados en la formación del producto final. (Lessard *et al.*, 2001).

La papa es un cultivo que, en general, es susceptible a la transformación, dada su condición de dicotiledónea, pero no existe un

método universal aplicable al cultivo, transformación y regeneración *in vitro* de todos los cultivares de papa (Ghislain y Golmirzaie, 1998).

Las actividades biológicas que poseen los glucosinolatos y sus derivados están involucrados en la defensa de las crucíferas frente a insectos y patógenos, actuando como antimicrobianos y biopesticidas. Esto sugiere que la transferencia de glucosinolatos en plantas no crucíferas como *Solanum tuberosum* por ingeniería genética puede incrementar la resistencia a plagas y disminuir el uso de pesticidas durante su cultivo, como un paso hacia la agricultura sostenible.

Hasta el momento, mediante transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, se ha introducido en *S.tuberosum* cv. Desireé, tres de los genes involucrados en la vía metabólica de los glucosinolatos: gen *C-S liasa* (*SUR1*), *glucosiltransferasa* (*GT*) y *sulfotransferasa* (*ST*), los cuales participan activamente de las reacciones finales de esta vía (Laboratorio de Biotecnología Aplicada – CIP); por tanto es de interés generar plántulas que posean insertados en su genoma los genes involucrados en las reacciones iniciales de la ruta metabólica, como son: los genes Citocromo P450 (*CYP79A* , *CYP83B1*) y el gen *γ-glutamil peptidasa 1* (*GGP1*), los cuales participan en la producción de glucosinolatos a partir del aminoácido fenilalanina. Se

espera que aquellas plántulas co-transformadas de *S.tuberosum* cv. Desireé con los genes principales de la ruta metabólica de los glucosinolatos posean capacidad de producir bencilglucosinolatos.

1.2 PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Plántulas co-transformadas de *S.tuberosum* cv. Desireé con los genes Citocromo P450 (*CYP79A2*, *CYP83B1*) y el gen γ -glutamil peptidasa1 (*GGP1*) producen bencilglucosinolatos?

1.3 OBJETIVO GENERAL

Generar plántulas de *Solanum tuberosum* cv. Desireé co-transformadas con los genes Citocromo P450 (*CYP79A2*, *CYP83B1*) y el gen *GGP1*, para la producción de bencilglucosinolatos.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar molecularmente la inserción de los genes en plántulas co-transformadas.
2. Determinar la concentración de desulfobencilglucosinolato (dBGL) producido en plántulas co-transformadas.
3. Evaluar cualitativamente los productos de degradación de glucosinolatos.

1.5 HIPÓTESIS

Las plántulas co-transformadas de *S.tuberosum* cv. Desireé con los genes Citocromo P450 (*CYP79A2*, *CYP83B1*) y el gen γ -glutamil peptidasa1 (*GGP1*) producen bencilglucosinolatos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 GENERALIDADES DEL CULTIVO DE PAPA

La papa cultivada (*Solanum tuberosum* L.) (Spooner *et al.*, 2007) es el cuarto cultivo más importante del mundo, después del arroz, el trigo y el maíz (FAOSTAT, 2012). Más de mil millones de personas en el mundo comen papa como alimento básico, lo que conduce a una producción total de la cosecha mundial de más de 300 millones de toneladas. La papa es un cultivo importante para hacer frente al crecimiento demográfico y el aumento de las tasas de hambruna.

Las papas son ricas en energía, nutritivas, fáciles de cultivar en pequeñas parcelas, económicas y listas para cocinar sin procesamiento. Una hectárea de papas puede producir de dos a cuatro veces más cantidad de alimento que los cultivos de cereales. Las papas producen más alimento por unidad de agua que cualquier otro cultivo importante (Centro Internacional de la Papa, 2010).

Las papas se cultivan en 19,2 millones de hectáreas de tierra en el mundo, en 158 países de latitudes entre 65 ° N y 50 ° S y en altitudes

desde el nivel del mar hasta 4000 m (FAOSTAT, 2012). Más de la mitad de la producción mundial de papa se encuentra en Asia, África y América Latina, donde su hidrato de carbono principal (almidón) forma parte de la dieta de cientos de millones de personas. También proporciona cantidades significativas de proteína, con un buen balance de aminoácidos, vitaminas C, B6 y B1, ácido fólico, minerales, potasio, fósforo, calcio, magnesio, hierro y zinc (Storey, 2009).

Existe interés por el mejoramiento de la papa en casi todos los aspectos de su producción. Esto puede ser llevado a cabo a través del cruzamiento tradicional, ingeniería genética y/o prácticas culturales durante su cultivo y en la post cosecha.

La variedad holandesa Désirée tiene su origen en el cruce de (Urgenta x Depesche). Es una variedad holandesa de papa. Sus plantas presentan tallos bastante numerosos, largos y gruesos, hojas pequeñas y rígidas. Los folíolos primarios son pequeños y ovales con nervios bastante profundos; con flores rojo morado claro, abundante floración, inflorescencias robustas y muy coloradas. Los tubérculos son oval alargados de ojos superficiales, piel de color roja y lisa, carne amarilla clara. Brotes color rojo morado claro. Es de maduración semitardía y de

muy buen rendimiento. El follaje desarrolla bastante rápido, cubriendo bien el terreno; resiste bien a la sequía. En cuanto a la calidad culinaria es bastante firme al cocer, de sabor neutro, apta para la preparación de papas fritas. La variedad Desireé es medianamente sensible a la *Phytophthora* de la hoja, poco sensible a la del tubérculo, sensible al virus de enrollado, bastante resistente al virus Y e inmune a la sarna verrugosa (RIVRO, 1989).

2.2 ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE TEJIDOS

Dentro de los principios básicos para el establecimiento del cultivo de tejidos se requieren ciertas etapas como: aislar alguna parte de la planta (frecuentemente tejidos u órganos), eliminar todos los microorganismos contaminantes del material vegetal, colocar el material vegetal en un medio de cultivo apropiado con condiciones ambientales controladas.

El crecimiento y desarrollo de los cultivos *in vitro* está determinado por factores inherentes al material vegetal (genotipo, condiciones fisiológicas de la planta, tipo de tejido), y por las condiciones químicas y físicas del medio ambiente. Entre los factores químicos que influyen son

los nutrientes (macronutrientes, micronutrientes, azúcares) y algunos compuestos orgánicos (vitaminas y reguladores de crecimiento). Los factores físicos como la luz, temperatura, pH y la concentración de O₂ y CO₂, ejercen un papel importante en el desarrollo y la morfogénesis de los cultivos (Ochoa, 1999).

2.3 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN PLANTAS

En 1983 los esfuerzos de muchos investigadores alrededor del mundo culminaron con la producción de las primeras plantas transgénicas (Bevan *et al.*, 1983; Herrera-Estrella *et al.*, 1990).

La transformación genética o transferencia de genes, técnica también conocida como ingeniería genética, permite introducir en plantas genes provenientes no sólo de otras especies vegetales muy alejadas desde el punto de vista evolutivo sino incluso de hongos, virus, bacterias y animales. Asimismo, a través de esta tecnología es posible modificar la expresión de genes presentes en el genoma de la planta. Entre sus aplicaciones de interés agropecuario se encuentran la obtención de plantas con resistencia a estreses bióticos (virus, insectos, hongos y bacterias), a estreses abióticos (salinidad, sequía, etc.), tolerancia a

herbicidas para facilitar el control de malezas y modificación de la calidad nutricional de los cultivos entre otras. La transformación genética también constituye una herramienta útil para estudios básicos que permiten conocer y/o profundizar acerca de la estructura y función de genes específicos, aspecto particularmente relevante en la era genómica.

Para todas las técnicas de transformación desarrolladas hasta el momento es necesario disponer del transgén a introducir (éste consiste en secuencias regulatorias y codificante clonadas en un vector de transformación) y de una metodología eficiente para su transferencia al genoma vegetal. En todos los sistemas de transformación de plantas, solamente una fracción de las células de la planta expresa el ADN foráneo llegando a ser establemente transformada. Estas células sientan las bases para la regeneración de plantas transgénicas. Con las células transformadas se puede llevar a cabo selección negativa usando agentes selectivos que provoquen la muerte o inhiban completamente el crecimiento de las células de la planta sin transformar; en combinación con un marcador de selección expresado en las células transformadas. Alternativamente los métodos de selección positiva, favorecen el crecimiento y regeneración de las células de la planta transformada, mientras las células no transgénicas están carentes de medios para

crecer (Pérez, 2000). La mayoría de los sistemas de selección usados para la transformación de plantas se han basado en el principio de la selección negativa (Bowen, 1993; Schrott, 1995). Comúnmente el uso de agentes selectivos incluye: antibióticos, herbicidas y niveles tóxicos de aminoácidos o sustratos análogos de enzimas (De Block *et al.*, 1987). Finalmente, mediante experimentos de campo y laboratorio se estudia el comportamiento de los individuos transgénicos y su descendencia.

El sistema de transformación genética más sencillo es incorporar un gen con resistencia a un antibiótico o a un herbicida, de forma que, al realizar el cultivo *in vitro* en presencia del agente de selección (antibiótico o herbicida), se garantiza que únicamente sobrevivirán aquellas que hayan sido transformadas (Wenqui *et al.*, 1999).

Uno de los principales cultivos sometido a estas técnicas es la papa, aplicándose a aspectos de producción de semilla libre de patógenos, reproducción, mejoramiento genético clásico, formación de plantas transgénicas, además de manejo y conservación de germoplasma como la criopreservación o almacenamiento.

2.4 TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*

Una de las técnicas biotecnológicas más utilizadas para el mejoramiento genético de la papa es la transformación genética, siendo el sistema de transformación más empleado aquel mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (De Riva *et al.*, 1998; Gelvin, 2003b).

La transformación mediada por *Agrobacterium* posee ventajas sobre otros métodos de introducción de genes, ya que no requiere un trabajo intensivo, equipos sofisticados y es más rentable (Mello, 2008).

Para que el proceso de transferencia e integración del ADN-T ocurra, el tejido vegetal y *Agrobacterium* deben ser compatibles. Además, el ADN debe ser introducido a células que sean susceptibles a *Agrobacterium* y tengan capacidad regenerativa (Finer, 1996 citado en Mello, 2008). El tipo de tejido, la edad, el genotipo y la susceptibilidad a *Agrobacterium* juegan un rol fundamental en la eficiencia de infección bacteriana. Además de las interacciones planta-bacteria, el proceso de transferencia de ADN-T es controlado por genes de virulencia o genes *vir*.

Para que un sistema de transformación genética mediante

A.tumefaciens tenga éxito en una determinada especie cultivada, deben funcionar en el sistema un número de componentes: como los sistemas apropiados de regeneración *in vivo*, la disponibilidad de genes de interés, adecuadas secuencias de promotores que gobiernen esos genes y el hospedero debe ser susceptible a la infección por *A.tumefaciens*. Además se debe contar con métodos de detección para la determinación de la inserción y expresión de los genes (Zambrano, 1994).

Experiencias con arroz, papa y trigo sugieren que un alto contenido de copias del transgén corresponden a niveles de expresión altos, indicando que los transgenes se están expresando eficientemente (Altpeter *et al.*, 2005).

2.4.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Las especies del género *Agrobacterium* son bacterias Gram negativas aeróbicas obligadas que viven en el suelo. Estas son capaces de desarrollar un crecimiento saprofítico o parasítico (Díaz *et al.*, 2005).

El género comprende cuatro especies fitopatogénicas, dos de

ellas ampliamente estudiadas (*A.tumefaciens* y *A.rhizogenes*). Ambas especies son patógenos reconocidos de plantas y son capaces de infectar una amplia variedad de especies de dicotiledóneas integrando establemente parte de su material genético dentro del genoma de su hospedero (Sheng & Citovsky, 1996; Tzfira y Citovsky, 2000; Díaz *et al.*, 2005).

En la naturaleza, *A.tumefaciens* causa tumores, enfermedad que se conoce como “agalla de la corona” y *A.rhizogenes* induce la proliferación de raíces dando lugar a la enfermedad denominada «raíz en cabellera». Sin embargo se han desarrollado cepas de *Agrobacterium* a las cuales se les ha suprimido la capacidad de inducir tumores, siendo posible la incorporación de genes de interés; de esta manera pueden ser viables en la transformación de plantas. La capacidad patogénica de *A.tumefaciens* y *A.rhizogenes* está asociada la presencia de megaplásmidos (150 - 200 kilopares de bases o Kb) llamados Ti (por “tumor-inducing” o inductor de tumores) (Gelvin, 2003a; Díaz *et al.*, 2005). El ADN-T está localizado en el plásmido Ti, que además contiene los genes *vir* que son necesarios para la transferencia e incorporación del fragmento de ADN en el genoma de la planta (Gelvin, 2003a y b).

La inducción de los genes *vir* está sujeta a varios factores como la presencia de compuestos fenólicos, pH del medio y temperatura. Sin señales de compuestos fenólicos que inicien la expresión de los genes *vir*, la transferencia de ADN-T no ocurre. Cuando los tejidos vegetales sufren daño, éstos producen compuestos fenólicos tales como la acetosiringona, molécula de señalización e inductora de los genes *vir* (Sheng y Citovsky, 1996).

Aquella célula portadora del ADN-T es conocida con el nombre de célula transformada o transgénica (Van Wordragen y Dons, 1992).

2.4.2 Mecanismo de transferencia del ADN-T mediado por *Agrobacterium*

Tzfira y Citovsky (2000) describen siete eventos fundamentales para la interacción *A.tumefaciens* – planta (**Figura 1**).

La colonización bacteriana es el primer paso esencial en la inducción de tumor y tiene lugar cuando *A.tumefaciens* ataca la superficie de la planta. Los polisacáridos de la superficie bacteriana

cumplen un rol importante en el proceso de colonización (Bradley *et al.*, 1997 citado por De la Riva, 1998). Los genes cromosomales necesarios para el reconocimiento y la adherencia a células vegetales son *chvA*, *chvB*, *pscA* y *att*.

La identificación de señales producidas por la planta se da por dos sensores proteicos, VirA y VirG, que reaccionan específicamente con la presencia de exudados de plantas heridas y que además promueven la activación transcripcional de los genes *vir*. La proteína de membrana VirA interactúa de forma directa o indirecta con compuestos fenólicos producidos por las plantas como lignina, precursores de flavonoides y acetosiringona (Stachel *et al.*, 1985 y Winans *et al.*, 1994; citados en Valderrama, 2005 y Sheng & Citovsky, 1996). La proteína citoplasmática VirG es fosforilada por VirA y permite la transducción de señales que activan los genes *vir*.

Los genes *vir* constituyen un operón con 6 genes esenciales (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*) y 2 no esenciales (*virF* y *virH*) regulados por una secuencia promotora de 12 pares de bases conservadas a la que se une específicamente la proteína VirG fosforilada. La fosforilación de la proteína VirG es requerida para la activación de los genes *vir* (Jin *et*

al., 1990 citado por Valderrama *et al.*, 2005).

La producción del ADN-T se da por la acción de las proteínas VirD2 y VirD1, que actúan como endonucleasas, uniéndose al plásmido Ti en los bordes y haciendo cortes en la cadena del ADN-T sin sentido (Filichkin y Gelvin, 1993; Scheiffele; Pansegrau y Lanka, 1995; Wang *et al.*, 1987 citados en Valderrama *et al.*, 2005). Cualquier ADN localizado entre los bordes de ADN-T será transferido a la célula vegetal como ADN de cadena simple e integrada dentro del genoma de la planta (De la Riva, 1998).

Después, la proteína VirD2 se une covalentemente al extremo 5' del ADN-T hasta su transferencia a la planta (Howard *et al.*, 1990). El ADN-T es cubierto por proteínas de unión al ADN de cadena sencilla (SSB) que permiten su transporte. Las proteínas VirE2 también se unen al ADN-T y posiblemente cubren la cadena formando junto con VirD2, un complejo de transferencia (Howard y Citovsky, 1990; Zupan y Zambryski, 1997). Estudios más recientes sugieren que el complejo proteínas Vir:ADN-T se forma dentro del citoplasma de la célula hospedera (Deng *et al.*, 1999; Sundberg y Ream, 1999; Zhou y Christie, 1999 citados en Valderrama *et al.*, 2005).

VirB1 permite disolver la membrana de peptidoglicano de la pared bacteriana y puede participar en el contacto célula a célula (Baron *et al.*, 1997; Christie, 1997); VirB3 y VirB4 promueven el ensamblaje del pili de virulencia (Zupan, 1997); VirB6 media la formación de los complejos VirB7 y VirB9 requeridos para la biogénesis del pili T y del canal de secreción (Jakubowski, 2003 citado en Valderrama *et al.*, 2005); VirB10 se ubica transmembranalmente y su función es desconocida, y finalmente VirD4 es requerida para la formación del pili de virulencia (Fullner *et al.*, 1996).

Las proteínas VirD2 y VirE2 son las que median directamente el proceso de importe nuclear del complejo-T hacia la célula vegetal (Citovsky *et al.*, 1994; Herrera - Estrella, 1990). El importe nuclear del complejo T es asistido por proteínas celulares del hospedero como VIP1. Elevados niveles de VIP1 en el hospedero lo hacen más susceptible a la transformación con *Agrobacterium* (Tzfira *et al.*, 2002a). Estudios genéticos y funcionales más recientes han revelado la importancia de las proteínas del hospedero involucradas en la reparación del ADN y el mantenimiento de la integración para el ADN – T (Tzfira, *et al.*, 2004).

El último paso de la transferencia del ADN-T es la integración dentro del cromosoma de la planta, se considera que este proceso se

lleva a cabo por recombinación (Gheysen, *et al.*1991; Lehman, *et al.* 1994; Puchta, *et al.*, 1998 citado en De la Riva, 1998). La proteína VirD2 posee un rol activo en la integración del ADN-T en el cromosoma de la célula vegetal (Argos *et al.*, 1986; Tinland *et al.*, 1995 citados en Valderrama *et al.*, 2005 y De la Riva, 1998).

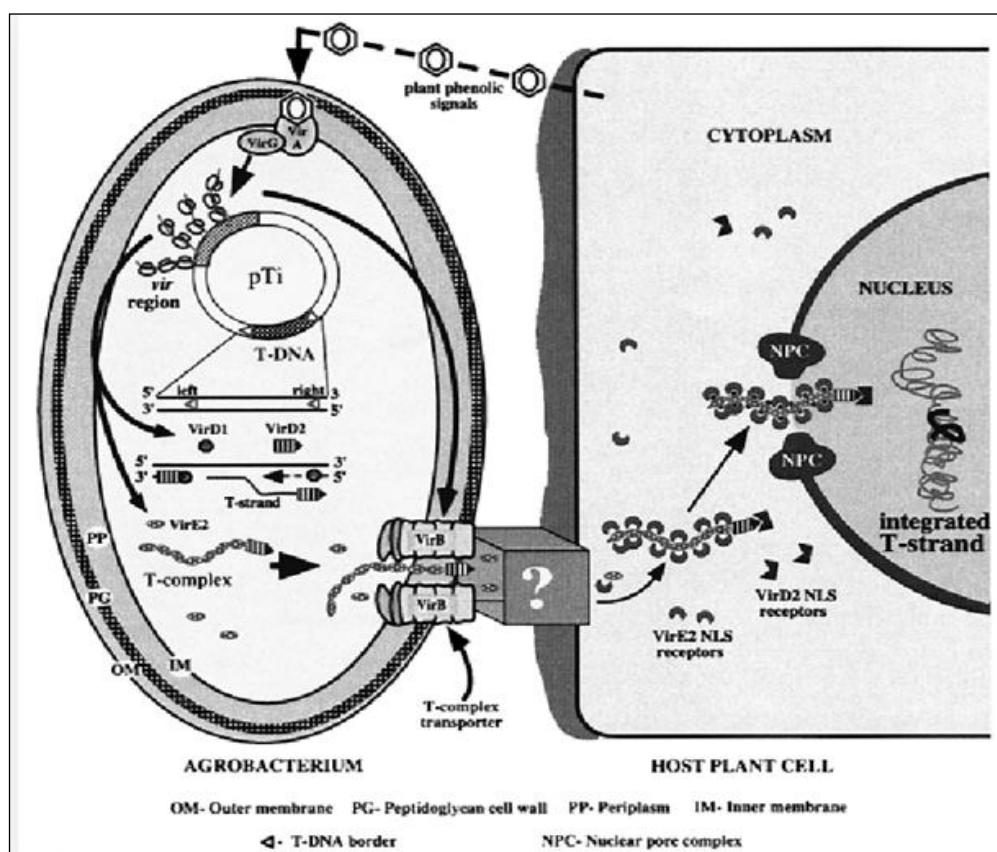


Figura 1: Pasos básicos en la transformación de células vegetales por *Agrobacterium*.

Fuente: Zupan *et al.*, 2000.

2.4.3 Transformación genética en papa por *Agrobacterium tumefaciens*

Una de las técnicas biotecnológicas más utilizadas para el mejoramiento genético de la papa es la transformación genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (De Riva *et al.*, 1998; Gelvin, 2003 a y b), además es aquel que posee potencial para alterar rasgos que también son manipulados en programas de fitomejoramiento (Mello, 2008).

La papa es un cultivo que, en general, es susceptible a la transformación, dada su condición de dicotiledónea y los avances que se han logrado en la transformación de este cultivo. Sin embargo, existen cultivares de papa renuentes a la transformación cuando se utilizan protocolos convencionales y, por lo tanto, se requiere de condiciones específicas para transformarlos.

La introducción de genes foráneos de interés en plantas de papa mediante esta técnica ha tenido logros sustanciales desde la primera generación de papas transgénicas, hace poco más de dos décadas (Ghislain y Golmirzaie, 1998).

La transformación vía *A.tumefaciens* depende del genotipo de papa utilizado (Newel *et al.*, 1991). La eficiencia de la transformación mediada por *A.tumefaciens* y la eficiencia de la regeneración de plántulas de papa son muy variables y dependen de los procedimientos y cultivares utilizados (Newel *et al.*, 1991; Ghislain y Golmirzaie, 1998). No existe un método universal aplicable al cultivo, transformación y regeneración *in vitro* de todos los cultivares de papa. Un procedimiento utilizado para inducir formación de regenerantes a partir de un cultivar puede ser bastante distinto de otro empleado con otro cultivar perteneciente a la misma especie (Walden y Wingender, 1995).

2.5 PIRAMIDIZACIÓN DE GENES

La posibilidad de introducir genes simples al genoma de la planta ha dado como resultado algunas especies con propiedades agronómicamente interesantes. Estos logros han llevado a un interés en la introducción y expresión de más de un gen foráneo en plantas (Ottaviani y Hanisch ten Cate, 1991).

Los primeros cultivos transgénicos que fueron puestos a disposición

de los agricultores, fueron los que contenían una copia de un único gen; como es el caso de la papa con un gen *Bt* para resistencia al escarabajo de Colorado. Sin embargo, las soluciones transgénicas para muchos rasgos complejos de las enfermedades en el futuro requerirán la introducción de varios genes, ya sea para conferir características mejores a los cultivos o para la introducción de varios genes de una vía metabólica (Mifflin, 2000).

Existen muchas estrategias para introducir varios genes. La piramidización de genes puede ser definida como “la introducción estable de más de un gen viable en el genoma vegetal vía transformación”. Este concepto se discute en el marco del número de marcadores de selección que se introducen, ya que esto a menudo determina el tipo de estrategia utilizada.

Según el número de veces en que el tejido es sometido a una transformación genética, tenemos a la co–transformación o retransformación. La co–transformación puede considerarse como resultado de eventos de transformación independientes (De Block, 1993), razón por la cual las moléculas de ADN pueden ser integradas en el mismo locus o en diferentes loci en el mismo cromosoma o en diferentes

cromosomas. Dos o más genes foráneos pueden ser introducidos al genoma de la planta en forma sucesiva o simultánea (Ottaviani y Hanisch ten Cate, 1991). Sin embargo, la co - transformación puede ser utilizada en términos del uso de un plásmido con múltiples ADN-T (Depicker *et al.*, 1985; Komari *et al.*, 1996) o plásmidos separados con diferentes ADN-Ts contenidos en una sola cepa (de Framond *et al.*, 1986) o más cepas *Agrobacterium* (Depicker *et al.*, 1985; McKnight *et al.*, 1987; De Block y Debrouwer, 1991; Komari *et al.*, 1996).

La introducción sucesiva de genes implica la retransformación de una planta ya transformada (transformación sucesiva) o el cruce de dos plantas transformadas independientemente. Ambos métodos son lentos, abarcan mucho tiempo y son más sensibles a la variación somaclonal por el hecho de pasar dos veces a través de la etapa de regeneración. Además la transformación simultánea implica la necesidad de un marcador de selección diferente para cada transformación lo que resulta en una planta transgénica que expresa varios genes marcadores indeseables (De Block, 1990).

Insertar más de un gen simultáneamente en una planta a través de múltiples transformaciones es técnicamente más simple que transformaciones secuenciales. La introducción simultánea de varios

genes puede hacerse insertando varios genes en un solo vector o teniendo los genes en ADN-Ts separados que puedan transformar la misma célula.

Según el número de marcadores de selección utilizados para lograr la piramidización de genes tenemos a la “Super” – transformación, la cual consiste en una primera transformación utilizando solo un gen marcador de selección ligado a dos transgenes viables. Luego, las plántulas transformadas serán sometidas a un proceso de selección donde se evaluará la expresión de los transgenes introducidos así como las características agronómicas que éstos presenten. Si es necesario introducir transgenes adicionales, la plántula transformada seleccionada será sometida a una segunda transformación en la cual se utilizará un gen marcador de selección distinto. El resultado de esta metodología es la inserción de cuatro transgenes y dos genes marcadores de selección. Este es el método que se emplea en el Instituto Escocés de Investigación de Cultivos para la producción de papas transgénicas con rasgos de calidad mejorada (Berger, 2000).

Las ventajas de usar más de un gen marcador de selección son en primera instancia que es una investigación flexible en la cual muchas

combinaciones de genes pueden ser realizadas para determinar cuál es la más efectiva. Esto es de especial relevancia para estudios de investigación básica en los rasgos de ingeniería, tales como resistencia a los hongos, en la que las interacciones sinérgicas son conocidas por ser diferentes para diferentes combinaciones de genes. En segundo lugar, se ha demostrado que al menos tres marcadores seleccionables (*nptII*, *bar*, *hyg*) funcionan bien en papa (Casas, 1997; Rivera, 2003 y González, 2008).

En cuanto a las desventajas tenemos que el producto final de esta metodología cuenta con la presencia de al menos dos genes marcadores de selección. Esto plantea problemas en términos de bioseguridad, así como los derechos de propiedad intelectual, ya que en algunos países, los genes marcadores están protegidos por derechos de propiedad intelectual, por lo tanto, aumentar el número de transgenes aumenta la complejidad de obtener acuerdos de licencia.

Además, el uso de más de un gen de un marcador a menudo resulta en la integración de ADN-T en al menos dos sitios en el cromosoma, que es improbable que estén ligados. Esto presenta un problema para los mejoradores ya que puede considerar usar esta plántula como uno de los

padres de una población en el futuro.

Las posibilidades de una sola copia de cada inserción de ADN-T también se ven reducidas. Por lo tanto, un mayor número de plántulas transformadas deben ser examinadas para obtener la deseada, la que no exhibe “silenciamiento génico”. Este es un fenómeno poco entendido en la que un transgén expresado a partir de un ADN-T puede silenciar la expresión de un mismo gen de ADN-T insertado en otro lugar en el genoma (Depicker y Montagu, 1997).

2.6 MARCADORES DE SELECCIÓN

La expresión de genes marcadores de selección permite la proliferación de las células transformadas a niveles letales de inhibición de un compuesto, en que normalmente las células vegetales no sobreviven.

Los genes marcadores de selección son una parte integral de las estrategias de transformación genética. Genes de resistencia a antibióticos son típicamente genes bacterianos quiméricos que se pueden insertar en la porción de ADN-T del plásmido Ti de *Agrobacterium* (Fraley *et al.*, 1983).

Actualmente existe un amplio número de genes marcadores de selección como por ejemplo genes con resistencia a antibióticos (genes *nptII*, *hpt*, *acc3*, *aadA*), herbicidas (genes *bar* y *pat*) y marcadores de selección metabólicos como el gen *pmi* que codifica para la fosfomanosa isomerasa (Todd y Tague, 2001).

El marcador de selección más usado es el gen *nptII* (Bevan *et al.*, 1983), aislado de *Escherichia coli*, este gen codifica para la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) y confiere resistencia frente a antibióticos aminoglicósidos como la kanamicina, gentamicina y neomicina (Opabode, 2006).

Cuando los antibióticos tales como la kanamicina o higromicina están presentes en los medios de cultivo de tejidos, las células transformadas continúan dividiéndose mientras que las células no transformadas morirán lentamente. El gen *hpt* es un buen marcador seleccionable para usar en el trabajo de transformación de la soja mientras que el uso de *nptII* no ha generado resultados consistentes. El antibiótico higromicina es muy tóxico para las células vegetales y la expresión del gen *hpt* causa efectivamente insensibilidad a la higromicina

en las células transformadas (Larkin, 2001). Zhang *et al.* En 1999, informaron sobre un gen marcador de resistencia a herbicidas para la soja, el gen *bar* (por “bialaphos resistance gene”) el cual fue clonado de *S.hygroscopicus* y codifica la enzima fosfinotricina acetil transferasa (PAT) que inactiva el herbicida fosfinotricina (PPT) (De Block *et al.*, 1987; Mello, 2008).

2.6.1 Gen *bar* como marcador de selección

El bialaphos y la fosfinotricina (PPT) son potentes herbicidas (Thompson, 1987). El Bialaphos es un antibiótico tripéptido producido por *Streptomyces hygroscopicus*. Consiste de L-PPT (también conocido como glufosinato de amonio), un análogo del ácido L-glutámico y dos residuos de L-alanina.

PPT es un potente inhibidor de la glutamina sintetasa (GS). Esta es la única enzima en las plantas que puede detoxificar el amonio liberado por la reducción de nitrato, la degradación de aminoácidos y la fotorespiración. La inhibición de la GS por PPT causa una acumulación rápida de amonio que lleva a la muerte de las células de la planta (Gallardo *et al.*, 2005).

PPT (BASTA), es sintetizado químicamente (Basta® Hoechst AG). Existen formas diferentes de la glutamina sintetasa (ubicadas en citoplasma, cloroplasto y nódulo de las plantas leguminosas). Sin embargo todas las isoenzimas son inhibidas por la fosfinotricina (De Block, 1987; Da Silva, 2004 y Fernández, 2004).

El gen *bar* está involucrado en la biosíntesis de bialaphos y acetila el grupo NH₂ libre de la PPT, por tanto evita la autotoxicidad en el organismo productor (De Block, 1987).

El gen *bar* ha sido usado ampliamente en experimentos de diferentes especies de cultivos (De Block *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1999).

El uso de herbicidas para eliminar malezas que afectan la producción de cultivos, ha llegado a ser parte integral de la agricultura moderna (existe una continua búsqueda de nuevos herbicidas que sean altamente efectivos y seguros para el medio ambiente). Una nueva clase de herbicidas que cubren estas necesidades son aquellos que actúan inhibiendo rutas biosintéticas de aminoácidos específicos

en plantas. Sin embargo, la mayoría de estos herbicidas no distinguen entre malezas y cultivos (De Block, 1987), por esto, el desarrollo de cultivos resistentes a herbicidas es de mucha importancia en la agricultura moderna.

Una preocupación fundamental sobre el uso del gen *bar* es que pueda ser transmitido sexualmente a especies relacionadas a los cultivos, lo que resulta en la creación de “supermalezas” resistentes a herbicidas. Sin embargo, esta preocupación no es tan crítica si el cultivo es de propagación asexual, como es el caso del camote (Jin Choi, 2007).

2.7 GLUCOSINOLATOS

A diferencia de las principales categorías de productos naturales de plantas, los glucosinolatos comprenden un grupo relativamente pequeño pero diverso (Grubb y Abel, 2006).

Los glucosinolatos son metabolitos secundarios ricos en sulfuro, también conocidos como glucósidos de aceite de mostaza, los cuales se encuentran distribuidos en el orden Capparales, que consta de 15

familias. Las familias ampliamente conocidas que contienen glucosinolatos son Brassicaceae, Capparaceae y Caricaceae, además de la planta *Arabidopsis thaliana*, la cual se ha tomado como modelo para realizar pruebas químicas y moleculares. Curiosamente, se ha reportado la presencia de glucosinolatos en el género *Drypetes* de la familia Euphorbiaceae, la cual no se encuentra relacionada con las demás familias que contienen glucosinolatos (Hansen *et al.*, 2001; Grubb y Abel 2006; Halkier y Gershenzon, 2006).

Los glucosinolatos son responsables del sabor picante y el olor característico de plantas de gran importancia en la agricultura como por ejemplo el brócoli y rabanito. Los glucosinolatos no sólo contribuyen con el aroma y sabor característico de las vegetales y condimentos pertenecientes a las crucíferas, sino que además poseen un amplio rango de actividades biológicas; desde su participación como defensa de plantas ante el ataque de patógenos y la homeostasis de auxinas hasta la prevención de cáncer en humanos.

El uso extensivo de *Arabidopsis* como planta modelo ha incrementado el entendimiento de la biosíntesis de los glucosinolatos, a través del mapeo de los genes involucrados y experimentos relacionados

de genómica funcional; es así que se han descubierto hasta el momento 120 glucosinolatos.

En los últimas décadas, la importancia de estos metabolitos secundarios ricos en nitrógeno y sulfuro se ha visto incrementada desde su descubrimiento como potenciales agentes cáncer - preventivo, compuestos cultivo - protector y como agentes de biofumigación en la agricultura (Halkier y Gershenzon, 2006).

2.7.1 Estructura química

La estructura química de los glucosinolatos consiste en un residuo β -D-glucopiranososa unido a un éster de (Z)-N-hidroximinosulfato mediante un átomo de sulfuro y una cadena variable derivada de aminoácidos denominada R.

Los glucosinolatos pueden ser clasificados según su aminoácido precursor y las diferentes modificaciones presentes en el grupo R. Los glucosinolatos derivados de los aminoácidos alanina, leucina, isoleucina, metionina o valina son denominados glucosinolatos alifáticos, aquellos derivados de la fenilalanina y de la tirosina son

llamados glucosinolatos aromáticos y aquellos derivados del triptofano son llamados indol glucosinolatos. (Halkier y Gershenzon, 2006).

Los grupos R de la mayoría de glucosinolatos son ampliamente modificados a partir de los aminoácidos precursores. Los grupos R están sujetos a una amplia variedad de transformaciones incluyendo hidroxilación, o-metilación, desaturación, glicosilación y acilación.

Las plantas acumuladoras de glucosinolatos siempre poseen actividad de la enzima glucohidrolasa tioglucosidasa conocida como mirosinasa, la cual hidroliza la fracción de glucosa del esqueleto principal de los glucosinolatos (Halkier y Gershenzon, 2006).

2.7.2 Biosíntesis de glucosinolatos

Los estudios realizados en la planta modelo *Arabidopsis* han facilitado el estudio de la formación de glucosinolatos.

La formación de los glucosinolatos puede ser dividida en tres fases: la primera relacionada con la elongación de los grupos R a través de la adición de grupos metilo a la estructura compartida por todos los glucosinolatos, la segunda fase comprende la modificación del

aminoácido en sí, donde con o sin modificaciones la estructura del aminoácido es reconfigurada para formar la estructura base de los glucosinolatos. Por último, el glucosinolato formado será modificado por varias transformaciones secundarias (Halkier y Liangcheng, 1997; Halkier y Gershenzon, 2006).

Durante la elongación del aminoácido, éste es desaminado para formar el ácido 2-oxo correspondiente, luego se produce un ciclo de tres pasos en el cual: el ácido 2-oxo se condensa con acetyl Co-A para formar un derivado de 2-malato, el cual luego se isomeriza, vía un cambio 1,2-hidroxilo, a un derivado 3-malato que experimenta una oxidación-descarboxilación para lograr formar un ácido 2-oxo con un grupo metileno más que al inicio o puede seguir con ciclos adicionales. Se conoce que en las plantas pueden ocurrir más de 9 ciclos.

2.7.2.1 Formación de la estructura principal

Los compuestos intermediarios en la biosíntesis de los glucosinolatos incluyen *N*-hidroxi-aminoácidos, aldoximas, compuestos aci-nitro u óxido de nitrilo, *S*-alquiltiohidroximatos, ácidos tiohidroxímicos y desulfoglucosinolatos. Los genes responsables de

todas estas conversiones excepto la S-alquilación han sido identificados a partir del año 2000.

Una vez lograda la elongación del aminoácido se iniciará la formación de la estructura base, a través de la conversión del aminoácido a aldoxima, inducida por enzimas pertenecientes a la familia CYP79 del citocromo P450, la cual es responsable de catalizar esta conversión.

Se ha demostrado que los productos del gen citocromo P450: CYP79A2; CYP79B2 y CYP79B3; CYP79F1 y CYP79F2 catalizan la conversión de fenilalanina, triptofano, metionina (Hull *et al.*, 2000; Mikkelsen *et al.*, 2000) para las aldoximas correspondientes, respectivamente. Sin embargo la función de CYP79C1 y CYP79C2 todavía es desconocida. La familia CYP79s cataliza la producción de casi todos los glucosinolatos en *Arabidopsis* (Halkier y Gershenzon, 2006).

2.7.2.2 Conversión de aldoximas a ácido tiohidroxímico

Al ser obtenida la aldoxima, enzimas de la familia CYP83 del citocromo P450, CYP83A1 y CYP83B1, producen una forma oxidada de oxima, conocido como compuesto aci-nitro, el cual presenta una gran inestabilidad, este reacciona eficientemente con los donadores de azufre (S) y forma el S-alquil tiohidroximato.

Esto sugiere que la conjugación con cisteína, como donador de azufre es probablemente controlada enzimáticamente por una enzima glutation-S-transferasa la cual logrará la conjugación del compuesto con un donador de azufre. De esta forma el S-alquil tiohidroximato es metabolizado por la enzima C-Sliasa que actúa sobre el compuesto produciendo ácido tiohidroxímico (Yan y Chen, 2007).

El producto CYP83B1 posee una mayor afinidad por las aldoximas aromáticas que CYP83A1, particularmente por el indol - 3 acetaldoxima (IAOx). CYP83A1 y CYP83B1 no son redundantes bajo condiciones fisiológicas normales en plantas (Naur *et al.*, 2001).

2.7.2.3 Conversión de ácido tiohidroxímico a glucosinolatos

Se ha identificado que la C-Siasa corresponde a una sola familia de genes la cual está representada por las iniciales *SUR1* en relación al mutante knockout obtenido para el estudio de este gen.

Consecuentemente, la enzima UDP-glucosa-ácido tiohidroximico S-glucosiltransferasa, la cual es expresada por el gen *S-GT* (Grubb *et al.*, 2006), glucosila la estructura del ácido produciendo así un desulfoglucosinolato, el que posteriormente será sulfatado por la acción de la enzima PAPS: desulfoglucosinolato sulfotransferasa codificada por el gen *ST*, obteniéndose así la estructura final del glucosinolato (Halkier y Gershenzon, 2006).

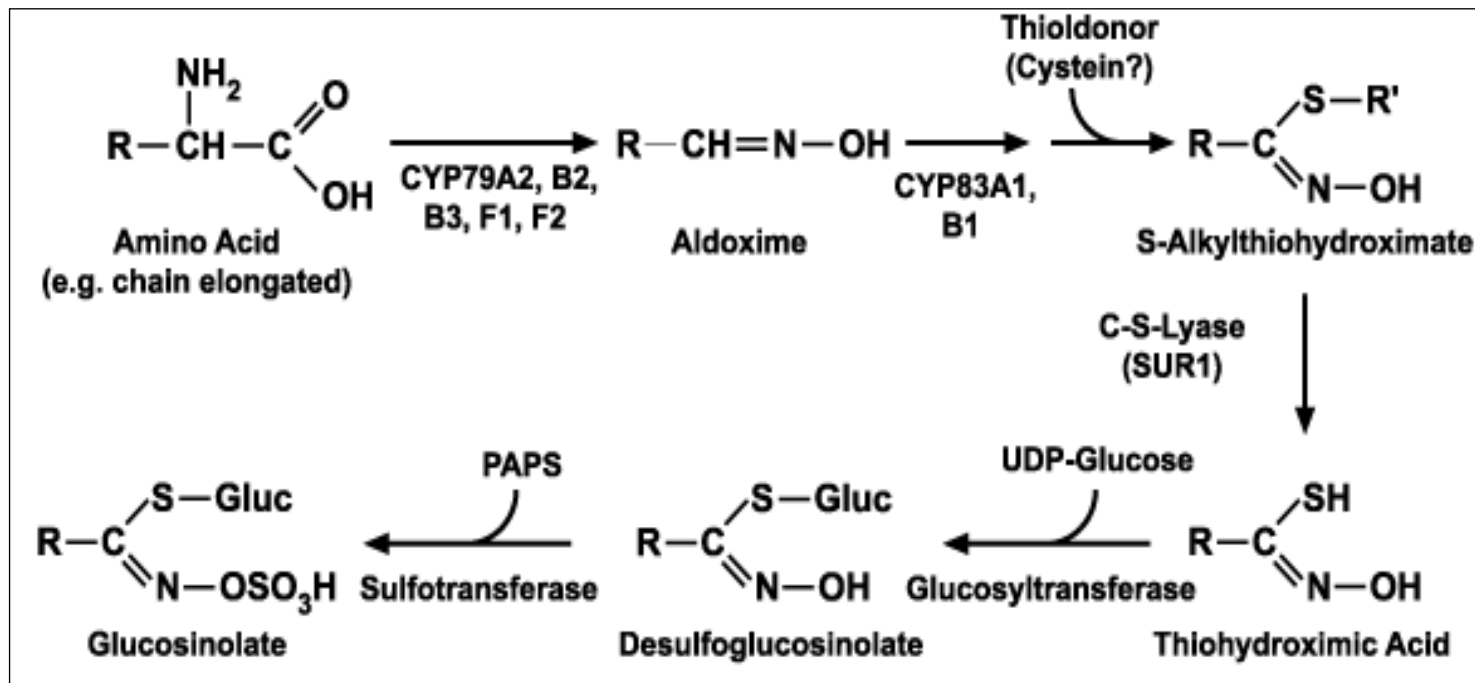


Figura 2: Biosíntesis de los glucosinolatos.
Fuente: Halkier *et al.*, 2006.

2.7.3 Degradación

Los glucosinolatos son degradados cuando se produce daño a la planta, en una variedad de productos de hidrólisis, los cuales son responsables de la actividad biológica. Los glucosinolatos se encuentran en los cloroplastos, mientras que las mirosinasas se encuentran ubicadas en células especializadas conocidas como mirosinas.

El proceso de degradación comienza cuando la enzima mirosinasa, que se encuentra físicamente separada de los glucosinolatos entra en contacto con estos e inicia la hidrólisis de tioglucósidos dejando una glucosa y un aglicón inestable.

Dependiendo de la estructura de la cadena lateral, el aglicón se reordena formando diferentes productos incluyendo isotiocianatos, tionos, nitrilos epinitrilos y tiocianatos, este reordenamiento depende de la estructura del aglicón, el pH y la concentración de iones hierro (Yan y Chen, 2007).

Los isotiocianatos son los productos de hidrólisis de glucosinolatos más comunes en la mayoría de plantas, sin embargo en otras son los nitrilos los que se encuentran en mayor proporción. La formación de nitrilos *in vitro* se muestra favorecida por un pH menor a tres o por la presencia de iones Fe^{2+} .

Los tiocianatos, son formados solo a partir de tres glucosinolatos: bencil-, alil- y 4- metilsulfinilbutil- glucosinolato. Como la formación de nitrilos, la formación de tiocianatos está asociada con factores proteicos específicos. Los isotiocianatos son inestables de pH neutro a ligeramente ácido.

2.7.4 Transporte en plantas

Se cree que los glucosinolatos son almacenados en las vacuolas (Yan y Chen, 2007).

La concentración de glucosinolatos varía según el tejido y fase de desarrollo de la planta y ambos varían en concentración y composición.

En *Arabidopsis*, las hojas jóvenes y los tejidos reproductivos como

las sílicas y semillas contienen elevadas concentraciones de glucosinolatos, sin embargo las sílicas y semillas senescentes contienen concentraciones muy pequeñas. Por otro lado, en las raíces, hojas y tallos encontramos concentraciones intermedias (Brown *et al.*, 2003).

Debido a que los glucosinolatos tienen propiedades fisicoquímicas necesarias para su transporte en el floema, el transporte de los glucosinolatos es comparado con el transporte de los azúcares y aminoácidos. La data mostrada en experimentos con *B.napus* realizados por Ibgal MCM (2003); sugiere la presencia de un simporte H^+ específico, el cual no es afectado con la estructura de la cadena lateral de los glucosinolatos. Sin embargo existen muchas dudas con respecto al transporte de los glucosinolatos. Experimentos en *B.napus* sugiere que éstos son trasportados como desulfoglucosinolatos (Brudenell *et al.*, 1999).

2.7.5 Función biológica

La activación de los glucosinolatos mediante el daño tisular y las propiedades biológicas de sus productos de degradación han sugerido

que la función principal de estos compuestos en las plantas es la defensa de éstas de los herbívoros y patógenos.

Numerosos estudios han demostrado que los glucosinolatos son completamente tóxicos, exhiben toxicidad directa, inhibición del crecimiento, o la disuasión de alimentación a una amplia gama de enemigos de plantas potenciales, incluyendo mamíferos, aves, insectos, moluscos, invertebrados acuáticos, nemátodos, bacterias, y hongos.

Se ha determinado que son los isotiocianatos, los compuestos responsables con mayor frecuencia de tal actividad en los glucosinolatos. Por desgracia, se sabe poco sobre el mecanismo específico por el que los isotiocianatos ejercen su toxicidad, aparte de su propensión general de reaccionar con grupos de proteínas amino y sulfhidrilo *in vitro*. Varios estudios recientes han informado de que las plantas responden al daño de los insectos mediante la acumulación de sistémicamente los niveles más altos de glucosinolatos, que presumiblemente aumenta su resistencia a los ataques posteriores (Halkier y Gershenzon, 2006).

Al igual que con otros compuestos de plantas de defensa, los

mismos glucosinolatos que sirven como venenos generales y elementos de disuasión para muchos herbívoros también atraen a los herbívoros adaptados. Muchos insectos herbívoros han llegado a especializarse en las plantas que contienen glucosinolatos ya que a menudo utilizan estos compuestos como señales para la alimentación o la oviposición. Atracción a distancia puede ser mediada por productos de hidrólisis volátiles, mientras que los glucosinolatos intactos pueden servir como señales de contacto para la alimentación o la estimulación de la oviposición.

Los herbívoros que se especializan en las plantas que contienen glucosinolatos deben tener algún mecanismo de la superación de la toxicidad de su anfitrión. En teoría, podrían excretan rápidamente glucosinolatos de sus cuerpos, metabolizan a derivados no tóxicos, o ser completamente insensible a su acción tóxica (Halkier y Gershenzon, 2006).

2.7.6 Regulación de la biosíntesis

En la familia brassicaceae especies individuales producen entre 30 y 40 diferentes glucosinolatos en donde los glucosinolatos alifáticos y

los derivados de metionina son aquellos que contribuyen con la diversidad.

El nivel y la composición de glucosinolatos en plantas reflejan los factores ambientales y genéticos además de cómo algunos glucosinolatos participan constitutivamente y cómo otros pueden ser inducidos. La inducción de genes específicos de la familia CYP79 se correlaciona con la acumulación de los glucosinolatos correspondientes, indicando que la inducción es regulada a un nivel trascricional (Halkier y Gershenzon, 2006).

La regulación del metabolismo de los glucosinolatos es sensible a varios factores ambientales. Generalmente los productos de degradación sirven como compuestos de defensa contra patógenos y herbívoros generales y como atrayentes de herbívoros específicos (Rask *et al.*, 2000). Muchos productos de hidrólisis de glucosinolatos han demostrado tener cierto grado de toxicidad contra hongos y bacterias. Así también existe una correlación negativa entre el contenido de glucosinolatos presentes en las hojas y el daño causado por insectos, aves y mamíferos.

Las infecciones con patógenos pueden cambiar los perfiles de glucosinolatos (Yan y Chen, 2007). Cuando un herbívoro o patógeno obtiene resistencia a un glucosinolato específico una sola mutación o una cruce entre variedades que contengan distintos tipos de glucosinolatos puede generar un nuevo perfil sin la necesidad de la evolución de una nueva capacidad enzimática esto debido a la gran variedad de glucosinolatos existentes (Kliebenstein, 2004).

El sistema glucosinolato-mirosinasa también se encuentra en el orden Brassica, familia *Tropaeolaceae*, a esta pertenece la mashua (*Tropaeolum tuberosum*) (Kjser *et al.*, 1978; Grau *et al.*, 2003).

En el Perú, específicamente en la región andina, se acostumbra sembrar mashua alrededor de los campos de papas para mantener alejadas las plagas que afectan este cultivo, esta práctica aparentemente basada en un pensamiento mágico - religioso posee un sustento bioquímico, ya que los isotiocianatos liberados desde las plantas de mashua (*Tropaeolum tuberosum*) o maca (*Lepidium meyenii* Walp.), producen un efecto protector sobre las plantas de papa frente a un amplio rango de patógenos como *P.infestans* y el gorgojo de los andes *Premnotrypes spp.* (Geu, 2004 y Esparza, 2010).

2.7.7 Importancia

Los glucosinolatos han sido de interés para la sociedad humana por su presencia en las hortalizas brasicáceas (col, coliflor, brócoli) y condimentos (mostaza, rábano picante, wasabi). El sabor distintivo de estos alimentos se deben principalmente a sus productos de hidrólisis como el isotiocianato, siendo los glucosinolatos indólicos y aquellos con el grupo R alqueno los que especialmente son causantes del sabor amargo.

Los agricultores han tratado de modificar los niveles de glucosinolatos en las hojas de colza para reducir los daños de las plagas de hongos e insectos. En este caso, la estrategia no es tan simple porque los glucosinolatos y sus productos de hidrólisis son repelentes a algunos insectos, pero a menudo sirven como atrayentes para los demás. Sin embargo a diversos cultivos de Brassica se les está encontrando un mayor uso en la "biofumigación", en donde parte del material cosechado se incorpora nuevamente al suelo para suprimir patógenos, nemátodos y malezas. En este caso, son nuevamente los productos de hidrólisis de glucosinolatos los que se suponen son los agentes activos del tratamiento (Halkier y Gershenzon, 2006).

En la última década, algunos glucosinolatos han sido identificados como potentes agentes de cáncer - prevención en una amplia gama de modelos animales, debido a la capacidad de ciertos productos de hidrólisis para inducir enzimas de la fase II de desintoxicación, tales como la quinona reductasa, glutatión-S-transferasa y glucuronosil transferasas. El isotiocianato sulforafano es derivado del 4-metilsulfinilbutil glucosinolato. El sulforafano y otros isotiocianatos pueden prevenir el crecimiento tumoral mediante el bloqueo del ciclo celular y la promoción de la apoptosis. Por otra parte, el sulforafano muestra potencial para el tratamiento de *Helicobacter pylori* causante de la gastritis y el cáncer de estómago (Halkier y Gershenzon, 2006).

III.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Clonamiento Genético y laboratorio de Transformación genética del Centro Internacional de la Papa, el Laboratorio de Bioanalítica y el laboratorio de Análisis Instrumental de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

3.2 CONCEPTOS OPERATIVOS

- **Acetosiringona:** compuesto fenólico liberado por los tejidos vegetales como respuesta a heridas. Induce la transferencia del ADN-T de *A.tumefaciens* (Sheng y Citovsky, 1996).
- **Carbenicilina:** agente bacteriostático frente a *A.tumefaciens* (Ñopo, 2003).
- **Citocromo P450:** las proteínas del citocromo P450 usan un amplio rango de compuestos exógenos y endógenos como sustratos de sus reacciones enzimáticas. Por lo general forman parte de cadenas de transferencia de electrones con multicomponentes, denominadas sistemas contenedoras de P450. (Halkier y Gershenzon, 2006).

- **Co - cultivo:** etapa de transformación en donde la bacteria se une a las células de la planta alrededor de la superficie herida del explante para que ocurra la transferencia del ADN-T (Ñopo, 2003).
- **Extensión foliar máxima:** parámetro indicador de crecimiento (Borrego, 2000).
- **Fosfinotricina:** herbicida cuyo objetivo será seleccionar los explantes transformados (Gallardo *et al.*, 2005).
- **Kanamicina:** antibiótico del grupo de los aminoglucósidos, de amplio espectro (Opabode, 2006).
- **Plantas crucíferas:** plantas angiospermas dicotiledóneas con hojas alternas, cuatro sépalos en dos filas, corola cruciforme, estambres de glándulas verdosas en su base y semillas sin albumen. Por ejemplo: el alhelí, el berro, la col, el nabo y la mostaza (Halkier y Gershenzon, 2006).
- **Regeneración:** proceso por el cual a partir de un callo en un medio de selección se desarrolla una planta (Mello, 2008).
- **Pequeña subunidad de promotor Rubisco (Rbsc):** promotor hoja
- específico proveniente del crisantemo.

3.3 MATERIAL BIOLÓGICO

Los experimentos de co - transformación se realizaron utilizando plántulas de papa *Solanum tuberosum* cv. Desireé previamente transformadas mediante *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido denominado “Contruc.3”, estas plántulas fueron desarrolladas por el Laboratorio de Biotecnología Aplicada (ABL) – CIP.

El plásmido “Contruc.3”, contiene los ADN de tres de los genes involucrados en la vía metabólica de los glucosinolatos que codifican para la C-Sliasa (*SUR1*), glucosiltransferasa (*GT*) y sulfotransferasa (*ST*), unidos a dos secuencias virales “2A” (F2A y T2A), controlado por el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor y su respectivo terminador; además del gen marcador de selección *nptII*, el cual confiere resistencia al antibiótico kanamicina.

De las plántulas transformadas generadas mediante transformación con “Construc.3”, se eligió uno de ellos, Desiree[*HIS: ST: GT: SUR1*]85.2 (evento 85.2), al cual se lo analizó molecular y bioquímicamente.

El análisis molecular se llevó a cabo mediante pruebas de PCR y RTqPCR. Por otro lado, el análisis bioquímico se realizó haciendo uso de experimentos de alimentación; los cuales determinaron un porcentaje de conversión promedio de fenilacetotiohidroximato a bencilglucosinolato de 2,98 %, porcentaje superior en comparación con otras plántulas transformadas analizadas. Los resultados de la caracterización del evento 85.2, hacen del mismo el mejor candidato para ser sometido a co - transformación.

3.3.1 Bacteria, vector y construcción genética

Se empleó cepas bacterianas DH10 β de *Escherichia coli* y EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* procedentes de la colección de bacterias del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del CIP, las cuales se encuentran en criopreservación a -70 °C, ambas conteniendo el vector binario pCAMBIA2300, el cual presenta en su ADN-T, los ADN de los genes iniciales involucrados en la vía metabólica de los glucosinolatos que codifican para enzimas del citocromo P450: N-hidroxilasa (gen *CYP79A2*) y monooxigenasa (gen *CYP83B1*), además de la enzima γ -glutamil peptidasa1 (gen *GGP1*). La construcción fue ensamblada mediante un marco abierto de lectura (ORF). La estructura

integrada, *GGP1/2A/CYP83B1/2A/CYP79A2* se encuentra controlada por la pequeña subunidad del promotor hoja-específico Rubisco (Rbsc) proveniente del crisantemo y su respectivo terminador, así como el gen marcador de selección *bar*, el cual confiere resistencia al herbicida fosfinotricina (PPT), siendo éste dirigido por el promotor 35s del virus del Mosaico de la Coliflor.

El diseño de esta construcción fue diseñada y ensamblada por el Laboratorio de la Real Universidad de Agricultura y Veterinaria (KVL) de Dinamarca y fue denominada por CIP como “pRbsc:ORF1.3”.

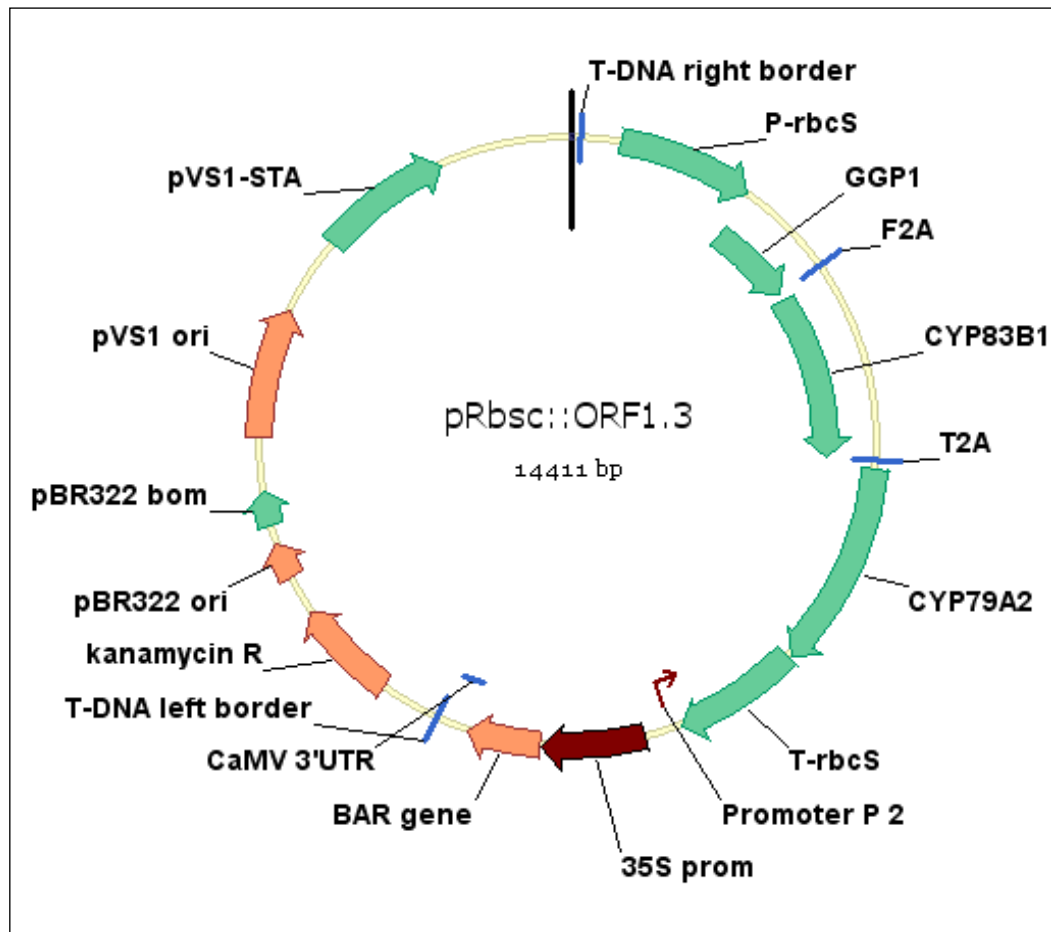


Figura 3: Plásmido pRbsc:ORF1.3. GGP1: γ - glutamilpeptidasa1, CYP79A2 y CYP83B1: genes que codifican para citocromos P450, F2A y T2A: secuencias virales "2A", P-rbcS y T - rbcS : promotor y terminador subunidad pequeña de rubisco, *bar* gene : gen marcador de selección, 35S prom y CaMV 3'UTR: promotor y terminador 35s del virus del mosaico de la coliflor .

Fuente: elaboración personal.

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Verificación del vector de transformación

La verificación del vector de transformación se realizó mediante la extracción y digestión enzimática del plásmido pBbsc:ORF1.3.

3.4.1.1 Extracción del vector binario

Las bacterias, *A.tumefaciens* y *E.coli* , que se encontraban en viales de criopreservación a -70 °C fueron sembradas en placas Petri conteniendo 15 mL de medio LB semisólido (**Anexo 1**) suplementado con 100 mg/L del antibiótico de selección kanamicina (**Anexo 2**). Luego, se procedió a incubar las placas a 28 °C por 48 horas y a 37 °C por 24 horas, para las placas con *A.tumefaciens* y *E. coli*, respectivamente. Una vez observado el crecimiento bacteriano se repicó una colonia en 10 mL de medio LB líquido suplementado con 100 mg/L de kanamicina, en ambos casos. Los cultivos se mantuvieron en agitación a 250 rpm y se incubaron a 28 °C por 48 horas para *A.tumefaciens* y a 37 °C por 24 horas para *E.coli*.

Una vez observado el crecimiento bacteriano en el medio de cultivo, se procedió a la extracción del ADN plasmídico.

Para la extracción del plásmido en ambas bacterias se utilizó el Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega (**Anexo 3**) con la diferencia que, en el caso de *A.tumefaciens* se agregó a la solución de resuspensión la enzima lisosima. Luego de extraído el ADN plasmídico se procedió a determinar su concentración mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa 1 % (**Anexo 5**). Las bandas de ADN plasmídico fueron visualizadas haciendo uso del colorante fluorescente Gel Red (Biotium) (**Anexo 5**).

3.4.1.2 Análisis de restricción del vector binario

Después de conocida la concentración del ADN plasmídico, se procedió a la digestión con enzimas de restricción, con la finalidad de corroborar el patrón de bandas previamente determinado mediante el software Vector NTI. Las enzimas de restricción (Biolabs New England) utilizadas para la digestión enzimática fueron: *NheI* (#R0131S), *XbaI* (#R0145S) y *SpeI* (#R0133S).

La mezcla de reacción para la digestión enzimática fue la siguiente:

Para *E.coli*:

Tabla 1: Mezcla de reacción para digestión enzimática - *E.coli*.

Componentes	Para 1 muestra (μL)
ADN plasmídico	3
Enzima	1
Tampón de reacción 10 X	1,5
Agua DEPC	6,5
Volumen final	12

Fuente: Nopo *et al.*, 2003.

Para *A.tumefaciens*:

Tabla 2: Mezcla de reacción para digestión enzimática - *A.tumefaciens*.

Componentes	Para 1 muestra (µL)
ADN plasmídico	17
Enzima	1
Tampón de reacción 10 X	2
Volumen final	20

Fuente: Nopo *et al.*, 2003.

Las mezclas de reacción fueron incubadas por 3 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a realizar una corrida electroforética en un gel de agarosa 1 %, haciendo uso del colorante fluorescente Gel Red con la finalidad de separar y observar fragmentos de acuerdo a su peso molecular.

3.4.2 Propagación del material vegetal

Plántulas del evento Desiree[*HIS:ST:GT:SUR1*]85.2 fueron propagadas en cajas plásticas estériles (Phytatray™ II de Sigma – Aldrich), las cuales contenían entre 40-50 mL de medio de propagación MSA líquido (**Anexo 1**).

La propagación se realizó utilizando el tercio superior de las plántulas, las cuales fueron despojadas tanto de ápices como hojas y colocadas en un número de seis por caja plástica. Éstas se mantuvieron en agitación a 150 rpm por 20 días y en condiciones controladas de 18 ± 2 °C, a 16 horas de fotoperiodo, 2000 lux de intensidad lumínica, 70 % de humedad relativa.



Figura 4: Plántula de papa *Solanum tuberosum* cv. Desireé en caja plástica estéril.

Fuente: elaboración personal.

3.4.3. Determinación de concentración mínima letal de fosfinotricina

Para la determinación de la concentración mínima letal de fosfinotricina se utilizó como material vegetal, hojas con peciolo y entrenudos de *S.tuberosum* cv. Desireé (planta sin transformar), las cuales fueron colocadas en placas Petri estériles (10 explantes por placa) conteniendo 15 mL de medio de regeneración Willmitzer suplementado (**Anexo 1**) y diferentes concentraciones de fosfinotricina, herbicida y agente de selección: 1, 2, 5, 10 y 50 ppm (**Anexo 2**). Como medio de control se utilizó el medio Willmitzer sin el agente de selección.

Cada quince días los explantes fueron trasladados a un medio fresco de regeneración durante tres meses. El experimento se realizó por triplicado.

3.4.4 Transformación genética

El método de transformación genética utilizado en el presente trabajo fue desarrollado por Medina *et al.*, 2003 y adaptado para el cultivar Desireé (Ñopo *et al.*, 2003).

3.4.4.1 Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo el plásmido pRbsc:ORF1.3 fue sembrada en placas Petri estériles conteniendo 15 mL de medio LB semisólido (**Anexo 1**) suplementado con 100 mg/L de kanamicina. Las placas fueron incubadas a 28 °C por 48 horas.

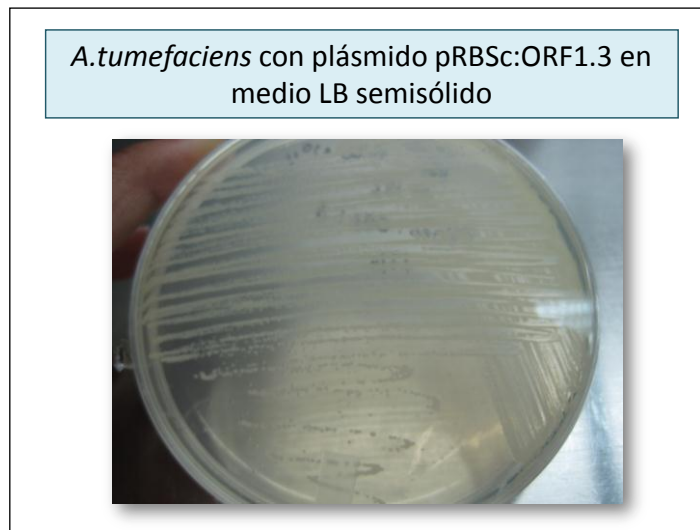


Figura 5: *A.tumefaciens* en placa Petri con medio LB suplementado con kanamicina.

Fuente: elaboración personal.

3.4.4.2 Co – cultivo semisólido

Trascurrido el tiempo de incubación, se procedió a realizar la co-trasformación.

Se tomó una colonia de *A.tumefaciens* con el plásmido pRbSc:ORF1.3 con una cuchilla estéril y se procedió a realizar cortes longitudinales en los explantes de tallos (entrenudos) y en el peciolo de las hojas escindidas de las plántulas. Luego, con ayuda de una pinza estéril se colocaron los explantes infectados con *A.tumefaciens* en placas Petri estériles las cuales contenían 20 mL aproximadamente de

medio MS-Sucrosa semisólido (**Anexo 1**) suplementado con 30 mg/L de acetosiringona (Ñopo *et al.*, 2003). Las placas se mantuvieron a una temperatura de 18 ± 2 °C y 70 % de humedad relativa por 24 horas en oscuridad.

Se realizó un control negativo y un control positivo. Como control negativo se utilizó explantes sin transformar del cultivar Desireé en placas con medio de regeneración con fosfinotricina y como control positivo se utilizó el mismo medio de regeneración (medio Willmitzer), pero sin agente de selección.

3.4.4.3 Regeneración con selección

Transcurrido el tiempo de co-cultivo se procede a la etapa de regeneración; en donde los explantes son colocados en placas Petri estériles conteniendo 20 mL de medio Willmitzer semisólido suplementado (**Anexo 1**), además de 250 mg/L de carbenicilina (utilizada como agente bacteriostático contra *A.tumefaciens*) y 2 mg/L de fosfinotricina, herbicida cuyo objetivo es seleccionar explantes transformados. Cada quince días los explantes fueron trasladados a un medio fresco de regeneración (Ñopo *et al.*, 2003).



Figura 6: Cambio de placas cada 15 días a medio de regeneración MSA fresco.

Fuente: elaboración personal.

Luego de aproximadamente 70 días se observó la presencia de los primeros regenerantes, los brotes fueron cortados y transferidos a tubos de ensayo de 18 x 150 mm, conteniendo 6mL de medio MSA semisólido (**Anexo 1**) suplementado con 2 mg/L de fosfotricina y 250 mg/L de carbenicilina, manteniéndose en condiciones de propagación.

Los regenerantes se mantuvieron en medio MSA semisólido suplementado con carbenicilina y fosfotricina hasta su completo

desarrollo; posteriormente, la fosfotricina fue suspendida y se continuó sólo con el antibiótico de selección, carbenicilina, en la concentración antes indicada.

Cada uno de los regenerantes fue debidamente codificado, indicando el número de regenerante, la construcción utilizada para la transformación y la fecha de propagación.

3.4.5 Análisis molecular

3.4.5.1 Extracción de ADN vegetal

Se extrajo ADN genómico de cada uno de los regenerantes obtenidos según el protocolo del Manual de Laboratorio de Biotecnología Aplicada – CIP (Ñopo *et al.*, 2003).

Se realizó la extracción de ADN genómico a pequeña escala (**Anexo 3**) de los regenerantes obtenidos, utilizando hojas del tercio superior de la planta generadas *in vitro*, las cuales fueron colocadas en microtubos de plástico, conteniendo el buffer de extracción CTAB2X (bromuro de cetil-trimetil-aminio).

Se trituró el material vegetal en el equipo Savant FastPrep 24, utilizando perlas de tungsteno, luego los microtubos se colocaron a baño maría 65 °C por 20 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente por 10 minutos. A continuación se agregó cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

Las muestras fueron centrifugadas para luego trasladar el sobrenadante a otro microtubo en donde posteriormente se agregó isopropanol frío para lograr la precipitación de ADN, transcurrido 30 minutos a -70 °C se volvió a centrifugar, obteniéndose el ADN genómico (pellet); el cual, luego de ser lavado con etanol 70 % se resuspendió en un volumen de 40 µL de agua libre de nucleasas. Finalmente, se agregó 1 µL de ARNasa (10 mg/mL) y se incubó a 37 °C por 3 horas.

Para verificar la calidad del ADN genómico extraído se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa 1 %.

3.4.5.2 Calidad de ADN

Se preparó un gel de agarosa 1 % disuelto en el buffer de corrida TBE 1X (Tris Borato EDTA) (**Anexo 5**), donde se tomó 1 μL de ADN de cada muestra junto con 1 μL de la solución SALB10X - Gel Red (**Anexo 5**) y 8 μL de agua DEPC. Por muestra, se cargó en el gel de agarosa un volumen de 10 μL y éstas fueron comparadas con 10 μL (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) del fago λ cortado con la enzima de restricción *Pst*I (marcador de corrida).

La corrida electroforética se realizó a 75 v por un tiempo de 45 minutos aproximadamente. La visualización del ADN se llevó a cabo utilizando el transluminador UV - Epicchemi Darkbox. Las concentraciones de las muestras fueron estimadas en $\text{ng}/\mu\text{L}$.

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

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ADN.

Se diseñaron cebadores (sentido y antisentido) a partir de las secuencias de los genes de interés (*CYP79A2* y *CYP83B1*), para ello se utilizó el software Vector NTII, obteniéndose dos pares de cebadores, los cuales fueron denominados según el gen que amplifican.

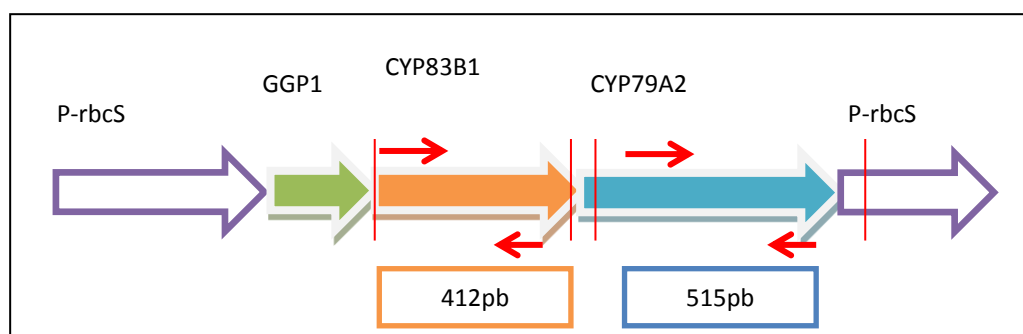


Figura 7: Representación esquemática de cebadores (flechas rojas). GGP1: gen γ -glutamylpeptidasa1, CYP79A2 y CYP83B1: genes que codifican para citocromos P450, P-rbcS y T-rbcS: Promotor y terminador subunidad pequeña de rubisco.

Fuente: elaboración personal.

Se realizó una PCR de gradiente de temperatura en un termociclador Applied Biosystem para encontrar la temperatura de annealing (T_a) adecuada para la visualización del producto de amplificación (amplicón). Para esto se utilizó como muestra 0,5 μ L de plásmido pRbc:ORF1.3 y se desarrolló el siguiente programa de amplificación:

Tabla 3: PCR de gradiente de temperatura

Etapas	Temperatura	Tiempo
1.Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos
2.Desnaturalización	94 °C	30 segundos
3.Alineamiento	50 - 65 °C	30 segundos (Gradiente)
4.Extensión	72 °C Repetir paso 2 y 3 por 35 veces	1 minuto
5.Extensión final	72 °C	7 minutos

Fuente: Nopo *et al.*, 2003.

Una vez terminado el programa se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa 1 % utilizando λ -PstI como marcador.

Luego de determinada la temperatura óptima de amplificación para los dos pares de cebadores, se procedió a realizar las PCR con las muestras de ADN extraídas de los regenerantes. La mezcla de reacción utilizada para la PCR fue la siguiente:

Tabla 4: Mezcla de reacción utilizada para la PCR

Componentes	1 Rx (μL)
Agua	33,1
Buffer PCR 5X	10
dNTPs (5 mM)	0,8
Cebador sentido (50 μ M)	2,5
Cebador antisentido (50 μ M)	2,5
Taq DNA polimerasa 1:4	0,6
ADN	0,5
Total	50

Fuente: Nopo *et al.*, 2003.

3.4.6 Análisis bioquímico

3.4.6.1 Desulfobencilglucosinolatos (dBGLs) en condiciones *in vitro*

a) Toma de muestra

Plántulas transformadas fueron propagadas en dos cajas plásticas estériles conteniendo 50 - 60 mL de medio de propagación MSA semisólido (**Anexo 1**) suplementado con 250 mg/L de carbenicilina y colocados en un número de 24 entrenudos por caja; estos desarrollaron durante 5 semanas en condiciones controladas de cultivo (18 ± 2 °C, 16 horas de fotoperiodo, 200 lux de intensidad lumínica y 70 % de humedad relativa). Transcurrido este periodo de tiempo, se procedió a extraer hojas de los 6 primeros entrenudos (desde el ápice) de las plántulas.

La cantidad de muestra analizada por plántula transformada fue de 200 mg de hojas aproximadamente, con 6 - 12 repeticiones técnicas.

b) Extracción de dBGLs de plántulas en condiciones *in vitro*

La extracción de glucosinolatos se realizó según el protocolo de Hansen *et al.* (2007) con modificaciones González, M. (com. pers.); en donde se utilizó hojas de plántulas *in vitro* de *S.tuberosum* cv. Desireé como planta control (sin transformar) y como control interno el glucosinolato sinigrina (**Anexo 3**).

Para la extracción de glucosinolatos se utilizó el equipo de centrifugación al vacío MultiScreenHTS Vacuum Manifold y placas de filtración de 96 pozos MultiScreen®-HV (MAHVN4550) – Millipore (**Figura 8**).

Colector MultiScreenHTS Vacuum Manifold

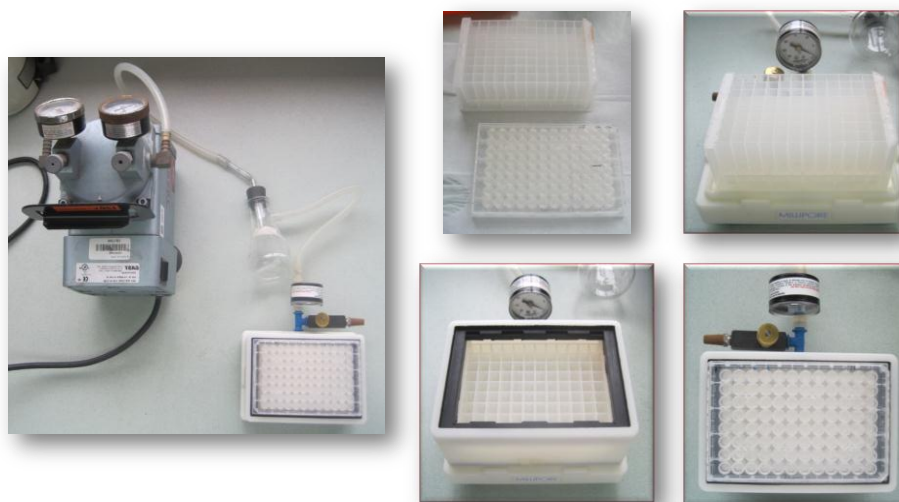


Figura 8: Colector MultiScreen HTS Vacuum Manifold.
Fuente: elaboración personal.

Las muestras de hojas *in vitro* fueron colocadas cuidadosamente en microtubos de 2 mL con 400 μ L de metanol 85 %, el cual contenía una concentración de 0,02 mM de sinigrina.

Se homogenizó el material vegetal por 20 segundos 40 veces/segundo en el equipo FastPrep con una perla de tungsteno; luego de 10 minutos de agitación (150 rpm) a temperatura ambiente se centrifugó a 3341 g durante 10 minutos. El sobrenadante (300 μ L) fue colocado en placas de filtración de 96 pozos, en la cual ha sido

colocado y equilibrado previamente 75 μL del intercambiador aniónico débilmente básico Fractogel-DEAE (dietilaminoetil).

La matriz polimérica (Fractogel-DEAE) fue equilibrada haciendo pasar 100 μL de agua milliQ y dejando reposar 300 μL de agua milliQ por dos horas.

Luego de colocar la muestra (300 μL de extracto metanólico) en la matriz, se agregó 200 μL de metanol 70 % y luego 200 μL agua milliQ. Posteriormente se agregó 0,8 U de sulfatasa purificada (**Anexo 6**) y se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche.

Los desulfobencilglucosinolatos (dBGLs) fueron eluidos en 200 μL de agua milliQ, los cuales fueron liofilizados a sequedad utilizando el equipo SpeedVac Plus (liofilizador al vacío y congelamiento). Las muestras fueron rediluidas en 50 μL de agua milliQ y analizadas por HPLC-UV.

c) Curva de calibración

Se utilizó una solución concentrada de bencilglucosinolato (4,6 mM) (BGLs, Calbiochem), de la cual se preparó una dilución (46 μ M) y con ella se realizó el procedimiento de desulfatación enzimática descrita por Hansen *et al.*, 2007.

Se agregó 300 μ L de la solución de BGLs 46 μ M a un pozo que contenía 75 μ L de Fractogel – DEAE equilibrado, luego se lavó la matriz con 200 μ L de metanol 70 % y de agua milliQ y se agregó 0,8 U de sulfatasa purificada. Los desulfobencilglucosinolatos (dBGLs) fueron eluidos con 200 μ L de agua milliQ, los cuales se liofilizaron por completo al vacío y congelamiento.

Finalmente se agregó 1 mL de agua milliQ y se determinó su concentración utilizando el espectrofotómetro Thermo Spectronic (Genesys 6) a 229 nm.

A partir de esta solución de dBGLs (12 μ M) se realizaron diluciones seriadas de 6, 3, 0,6 y 0,3 μ M; de las cuales 20 μ L

fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV). Las diluciones se hicieron por triplicado.

Para calcular la concentración real de cada una de las diluciones de dBGLs se utilizó el siguiente coeficiente de absorptividad molar: $8870 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 229 nm.

Las áreas de pico de las diferentes concentraciones fueron confrontadas con las concentraciones de las soluciones en el programa estadístico R; en donde se colocó las concentraciones reales de las soluciones estándar en el eje X y en el eje Y se colocó las áreas de pico expresadas en unidades arbitrarias. Finalmente se obtuvo la ecuación de la recta utilizando una regresión lineal simple, siendo representada con una línea de tendencia, donde también se obtiene la variabilidad explicada por la regresión (R^2).

d) Análisis de cromatográfico (HPLC-UV)

El análisis cromatográfico de fase reversa se realizó haciendo uso de un cromatógrafo líquido LaChrom D-7000 Hitachi–Merck, compuesto de una Bomba L-7100, Horno L-7350, Interfase D-7000,

Degasificador de solvente L-7612 acondicionado con una columna RP-18e (Lichrospher RP-18e, 250 x 4,6 mm, Merck). El monitoreo se realizó con un Detector de Diodos L7450-A a 229 nm, bajo las siguientes condiciones:

Temperatura: 30 °C

Solventes: Agua, Acetonitrilo (ACN)

Flujo: 1 mL/min

El programa de elución utilizado fue el siguiente:

- De 2 a 7 % ACN en 5 min
- De 7 a 25 % ACN en 5 min
- De 25 a 80 % ACN en 4 min
- De 80 a 100 % ACN en 1 min
- Lavado a 100 % ACN en 5 min
- Retorno a 2 % ACN en 5 min
- Re- equilibrio a 2 % ACN por 7 min

La identificación de dBGLs en los cromatogramas se llevó a cabo mediante comparación con el tiempo de retención y espectro ultravioleta de desulfobencilglucosinato estándar.

El cálculo de la concentración de dBGLs de cada plántula transformada fue determinado a partir de la integración del pico de interés. Las áreas de pico generadas producto de la integración fueron divididas entre la pendiente de la ecuación de la recta de la curva de calibración de dBGLs, obteniéndose así la concentración de dBGLs (μM) presente en cada muestra analizada.

Luego, para obtener las moles de dBGLs en las muestras, se aplicaron las siguientes conversiones:

$$\text{nmoles de dBGLs} = \frac{\text{conc. dBGLS } (\mu\text{M}) \times \text{vol. Redilución } (50 \mu\text{L}) \times \left(\frac{\text{vol. Extracción } (400 \mu\text{L})}{\text{vol. Análisis } (300 \mu\text{L})} \right)}{1000}$$

Finalmente, la concentración de dBGLs en las muestras se dividió entre el peso fresco (mg) y se expresó en picomoles/miligramo de peso fresco (pmol/mg fresco).

3.4.6.2 Desulfobencilglucosinolatos (dBGLs) en condiciones de invernadero

Luego de analizar por HPLC-UV todas las plántulas transformadas generadas por co – transformación en condiciones *in vitro*, se eligieron aquellas plántulas transformadas con una mayor concentración de dBGLs, estas fueron trasladadas a condiciones de invernadero: temperatura 17 - 22 °C; luz, días medios 12 horas y 12 horas oscuridad y humedad relativa entre 55 - 85 %.

a) Toma de muestra

Las diez plántulas transformadas *in vitro* se colocaron en Jiffy7 durante 4 semanas hasta lograr enraizamiento. Luego fueron trasladadas a macetas.

La toma de muestras se realizó a las quince semanas de crecimiento en maceta (extensión foliar máxima), en donde se colectó hojas con peciolo de toda la planta. Se pesaron muestras entre 250 mg a 500 mg con tres a seis repeticiones técnicas.

b) Extracción de dBGLs de plantas en condiciones de invernadero

La extracción de glucosinolatos se desarrolló según el protocolo descrito por Hansen *et al.* (2007) con modificaciones Esparza, E.

(conversación personal) en donde se utilizará la estación de procesamiento por extracción en fase sólida (SPE) Waters Sep-pak Vacuum Manifold – Millipore, además de microcolumnas y filtros Mobicol “clasic” - MoBiTec.

Las microcolumnas fueron preparadas con 200 mg de matriz Fractogel-DEAE, la cual fue equilibrada con KOH 0,5 N y HCOOH 0,5 N, teniendo lavados de 2 mL con agua milliQ entre cada solución.

La cantidad de material vegetal utilizado por planta fue de 0,5 g aprox., el cual fue colocado en viales de vidrio de 4 mL de capacidad y triturado manualmente con una varilla de vidrio; a éste se agregó 2,5 mL de metanol 70 % con una concentración de 0,02 mM de sinigrina.

Los viales fueron colocados a baño maría a una temperatura de 70 °C y 150 rpm por 15 minutos. Transcurrido el tiempo estos fueron colocados en el concentrador – evaporador centrífugo plus – Eppendorf y centrifugados a 217g durante tres minutos a temperatura ambiente.

El sobrenadante (1 mL) fue agregado a microcolumnas previamente equilibradas, luego se realizó lavados con metanol 70 % y agua milliQ

de 2 mL cada uno, posteriormente se agregó 200 μL de buffer MES pH 5 (**Anexo 5**) a la matriz y sobre éste se añadió 50 μL de la enzima sulfatasa 1,07 U/ μL purificada (**Anexo 6**) dejándose incubar a temperatura ambiente durante toda la noche.

Los desulfobencilglucosinolatos fueron eluidos en un volumen total de 200 μL (100 μL metanol 70% + 100 μL agua milliQ). Las extracciones se realizaron por triplicado.

c) Análisis de cromatográfico (LC-ESI-MS)

El análisis de estas muestras se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido Agilent 1200 compuesto por una Bomba binaria G1312A, Desgasificador de solvente G1379B, Detector de Diodos G1315A, Horno G1316A, Inyector automático estándar G1329A acondicionado con una columna RP-18e (Lichrospher RP-18e, 250 x 4,6 mm, Merck), acoplado a un espectrómetro de masas Esquire6000 Bruker Daltonics de trampa de iones con ionización electrospray, bajo las siguientes condiciones:

Parámetros: cromatógrafo líquido Agilent 1200

- Volumen de inyección 20 μ L
- Temperatura: 30 °C
- Solventes: Agua, Acetonitrilo (ACN)
- Detección: 229 nm
- Flujo: 1 mL/min

Parámetros: espectrómetro de masas Esquire 6000 Bruker Daltonics

- Volumen de inyección 20 μ L
- Presión: 65 psi
- Temperatura: 365 °C
- Flujo de secado de N₂: 12 L/min
- Capilaridad: 4000 V
- Flujo: 1 mL/min

El programa de elución utilizado fue el siguiente:

- De 2 a 5 % ACN en 6 min
- De 6 a 7 % ACN en 2 min

- De 7 a 21 % ACN en 10 min
- De 22 a 29 % ACN en 5 min
- De 30 a 95 % ACN en 2 min
- Lavado a 95 % ACN en 5 min
- Retorno a 2 % ACN en 5 min
- Re- equilibrio a 2 % ACN por 5 min

La identificación de dBGLs en los cromatogramas se llevó a cabo mediante comparación con el tiempo de retención, espectro ultravioleta a 229 nm y detección del ion molecular con sodio $[M+Na]^+$ 352 Da del desulfobencilglucosinolato estándar.

El cálculo de la concentración de dBGLs presentes en cada plántula transformada fue determinado a partir de la integración del pico generado a 229 nm.

Las áreas de pico, producto de la integración, fueron divididas entre la pendiente de la regresión lineal de la curva de calibración de dBGLs realizada para LC-ESI-MS, obteniéndose así la concentración de dBGLs (μM) presente en cada muestra analizada. La curva de calibración para este equipo se realizó de igual manera que la descrita

en la sección 3.3.6.2 parte C. El procedimiento de cálculo de la concentración de dBGLs en picomoles/miligramo fresco y por peso seco, se realizó de igual manera que para condiciones *in vitro*.

3.4.6.3 Fragmentación por inyección directa de dBGLs en espectrómetro de masas Esquire 6000 Bruker Daltonics ESI

Se realizó una dilución 1:5 de una solución dBGLs 40 μM , de donde 50 μL fueron disueltos en un volumen final de 200 μL de metanol (150 μL H_2O masas + 50 μL MeOH).

Se utilizó un flujo 240 $\mu\text{L}/\text{hora}$, 10 psi de presión, 300 $^\circ\text{C}$ de temperatura y flujo de secado de N_2 : 5 L/hora.

Los parámetros de fragmentación utilizados fueron los siguientes:

- Nebulizador : 65 psi
- Dry gas : 12 L/min
- Dry temp: 365 $^\circ\text{C}$
- Capilaridad : 4000 V
- Skimer : 40 V

3.4.6.4 Fragmentación de dBGLs por LC-ESI-MS

Se analizó desulfobencilglucosinolato por LC-ESI-MS, utilizando como solventes, **A**: agua:ácido fórmico 0,1 % y **B**: acetonitrilo:ácido fórmico 0,1 % a un flujo de 1 ml/min. La gradiente de concentraciones del solvente B, fue la siguiente:

- De 2 a 5 % ACN:AF 0,1 % en 6 min
- De 6 a 7 % ACN:AF 0,1 % en 2 min
- De 7 a 21 % ACN:AF 0,1 % en 10 min
- De 22 a 29 % ACN:AF 0,1 % en 5 min
- De 30 a 95 % ACN:AF 0,1 % en 2 min
- Lavado a 95 % ACN:AF 0,1% en 5 min
- Retorno a 2 % ACN:AF 0,1 % en 5 min
- Re- equilibrio a 2 % ACN:AF 0,1 % por 5 min

Se realizó la fragmentación de dBGLs producido por las plántulas transformadas en condiciones de invernadero así como para dBGLs estándar. Los parámetros de fragmentación del equipo fueron los mismos que se utilizaron en la fragmentación por inyección directa.

3.4.6.5 Detección de productos de hidrólisis de glucosinolatos

La evaluación cualitativa de productos de hidrólisis de glucosinolatos (emitidos como producto de daño tisular) como nitrilos, epinitrilos, tiones, tiocianatos e isotiocianatos, se realizó utilizando un cromatógrafo de gases HP5890 Serie II equipado con una columna HP5-MS de 30 metros de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 mm de fase estacionaria, acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo con ionización por electrones HP5972A.

Los parámetros utilizados fueron los siguientes:

- Temperatura de inyector: 250 °C
- Temperatura de detector: 290 °C
- Flujo: 3 mL/seg
- Split: 5:1

Programa de temperatura:

- Temp. Inicial : 60 °C, isotérmico 5 min.

- Gradiente : 60 a 280 °C, 20°C/min.
- Temp. Final : 280 °C, isotérmico 3 min.

a) Toma de muestra

En primera instancia, para evaluar volátiles emitidos por las plántulas de *S.tuberosum* cv. Desireé, se colectaron hojas en su máxima extensión foliar (0,25 – 0,5 g de peso), como se muestra en la

Tabla 5.

Tabla 5: Pesos de muestras para experimento de detección de productos de hidrólisis de glucosinolatos.

Muestra: <i>S.tuberosum</i> cv. Desireé sin transformar	Peso (g)
Control	0,59
STD	0,58
STD + THIO	0,59

Fuente: elaboración personal.

El material vegetal se trituró con una varilla de vidrio manualmente dentro de un vial de 4 mL de capacidad, donde se expuso en la parte aérea del vial una fibra de micro extracción en fase sólida (SPME) DVB/Carboxen™/PDMS StableFlex™ (fibra SPME triple) por 20

minutos, mientras la temperatura se mantenía elevada y constante (38-40 °C).

Este experimento se realizó utilizando a *S.tuberosum* cv. Desireé con 100 µL de agua como control negativo (CONTROL), *S.tuberosum* cv. Desireé con 100 µL de bencilglucosinolato 4,25 Mm (STD) y 90 µL de bencilglucosinolato 4,25 mM junto con 0,206 U de enzima tioglucosidasa (EC3.2.3.1) como control positivo (STD+THIO). Cosio, E. (conversación personal). Luego, se realizó la detección de productos de hidrólisis de los glucosinolatos en plántulas transformadas de igual manera que la muestra CONTROL. La evaluación se realizó a tres repeticiones técnicas.

b) Análisis de cromatogramas

La identificación de los compuestos se realizó utilizando el sistema de identificación y deconvolución automática de los espectros de masas AMDIS32 versión 2.63, el cual extrae los espectros de los compuestos individuales en un archivo GC/MS e identifica los compuestos comparándolos con una librería de referencia. La librería utilizada fue NIST02.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.5.1 Eficiencia de regeneración y eficiencia de transformación

Para hallar la eficiencia de regeneración y la eficiencia de transformación se utilizó la prueba estadística del Ji-cuadrado. Las frecuencias fueron obtenidas dividiendo el número de regenerantes entre el número total de explantes inoculados expresándolo en porcentajes.

Eficiencia de regeneración (ER)

$$ER = \frac{\text{número de explantes con regenerantes}}{\text{número de explantes totales}} \times 100$$

Eficiencia de transformación (ET)

$$ET = \frac{\text{número de explantes transformados}}{\text{número de explantes totales}} \times 100$$

3.5.2 Sentencias para análisis de varianza para curvas de calibración en programa R

```
nom=colnames(dat)
fmla <- as.formula(paste(nom[2],"~ -1 + ",nom[1]))
mod=lm(fmla,data=dat)
anova(mod) ## analisis de varianza
summary(mod) ## resumen de los estimados
print(data.frame(dat,Fit=predict(mod))) ## los ajustes

new <- data.frame(x = seq(min(dat[,1]), max(dat[,1]),
0.5));colnames(new)=nom[1]
pred.w.clim <- predict(mod, new, interval="prediction")
matplot(new[,1],pred.w.clim,lty=c(1,3,3), type="l",
ylab=paste("predicted",nom[2]),xlab=nom[1])
points(dat[,1],dat[,2],pch=19)
```

3.5.3 Sentencias para boxplot y barras de error en programa R

```
dat=read.table("I:/dat.txt",T) ## extraction de la data
nombres=colnames(dat)
```

Boxplot

```
f1=as.formula(paste(nombres[2],"~",nombres[1]))

xlab1="Genotype/line"
ylab1="Concentration of dBGLS (pMol/mg)"
boxplot(f1,data=dat,xlab=xlab1,ylab=ylab1,col="lightblue") ## graficos
de cajas
```

Barras de error

```
error.bar <- function(x, y, upper, lower=upper, length=0.1,...){
  if(length(x) != length(y) | length(y) !=length(lower) | length(lower) !=
length(upper))
  stop("vectors must be same length")
  arrows(x,y+upper, x, y-lower, angle=90, code=3, length=length, ...)
}

y.means <- by(dat[,2],dat[,1],mean) ## es como un tabla dinamica --
> variable/grupo/operacion
y.sd <- by(dat[,2],dat[,1],sd) ## desviacion estandar
n <- by(dat[,2],dat[,1],length) ## tamaño del sub grupo (cuantos
datos)
barx <- barplot(y.means,col="lightblue",ylim=c(0,1.25), axis.lty=1,
xlab=xlab1, ylab=ylab1) ## grafico de barras
error.bar(barx,y.means, qnorm(0.975)*y.sd/sqrt(n)) ## barras de error
```

IV. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PLÁNTULAS CO-TRANSFORMADAS

4.1.1 VERIFICACIÓN DEL VECTOR DE TRANSFORMACIÓN

El plásmido pRBsc:ORF1.3 fue evaluado por digestión enzimática. Se utilizaron las enzimas de restricción *XbaI*, *SpeI* y *NheI*, demostrándose así el buen estado de éste para su utilización en los experimentos de transformación genética.

Al realizar la digestión enzimática del plásmido pRBSc:ORF1.3 desde *E.coli* así como *A.tumefaciens*; se logró evidenciar en un gel de agarosa, el mismo tamaño (peso molecular) y número de bandas determinado previamente en el programa Vector NTI.

El tamaño de los fragmentos de ADN esperados se pueden observar en la **Tabla 6**.

Tabla 6: Pesos moleculares de los fragmentos de restricción por digestión enzimática del plásmido pRBSc:ORF1.3.

Enzimas	Peso Molecular de fragmentos de restricción (pb)
<i>NheI</i>	8929 - 5475
<i>SpeI</i>	10447 - 3957
<i>XbaI</i>	12803 - 1601

Fuente: elaboración personal.

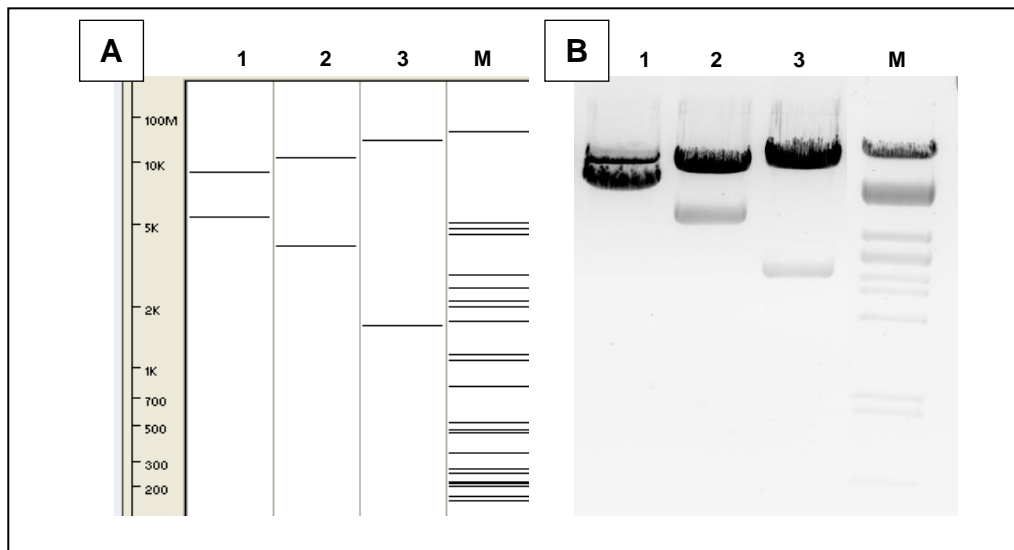


Figura 9: Verificación del vector de transformación. **A:** Patrón de bandas utilizando Vector NTI. **B:** Corrida electroforética en gel de agarosa de los fragmentos de restricción obtenidos con enzimas de restricción. **(1)** Plásmido digerido con *NheI*, **(2)** Plásmido digerido con *SpeI*, **(3)** Plásmido digerido con *XbaI* y **(M)** Marcador de peso molecular. **Fuente:** elaboración personal.

4.1.2 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA LETAL DE FOSFINOTRICINA (Soto *et al.*, 2007 con modificaciones Rivera, C.)

La evaluación de este experimento se realizó por dos meses, en donde progresivamente se observó la degeneración de los explantes (color amarillento, pérdida de turgencia) y posterior muerte del tejido vegetal. Estas características fueron observadas en todos los explantes expuestos concentraciones de fosfinotricina desde 2 ppm hasta 50 ppm.

Por otro lado, en placas con una concentración menor a 2 ppm, se observó la formación y desarrollo de callo en los explantes; características similares a las observadas en las placas con medio control (sin fosfinotricina).

En base a aquellos explantes con callo es que se determinó que 2 ppm es la concentración mínima letal de fosfinotricina en medio Willmitzer a la cual se logra la selección del material transformado.

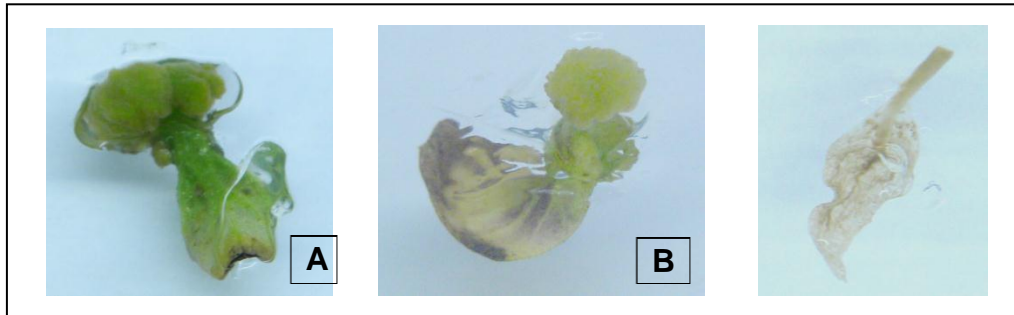


Figura 10: Toxicidad de fosfinitricina. Desarrollo de callos a partir de hojas con peciolo y entrenudos en medio Willmitzer **(A)** control, **(B)** 1 ppm PPT y **(C)** concentraciones mayores a 1ppm PPT.

Fuente: elaboración personal.

4.1.3 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Luego del cultivo semi-sólido, los explantes extraídos de Desiree[*HIS:ST:GT:SUR1*]85.2 fueron colocados en medio de regeneración Willmitzer con 2 ppm de fosfinitricina (PPT) (**Figura 11**).

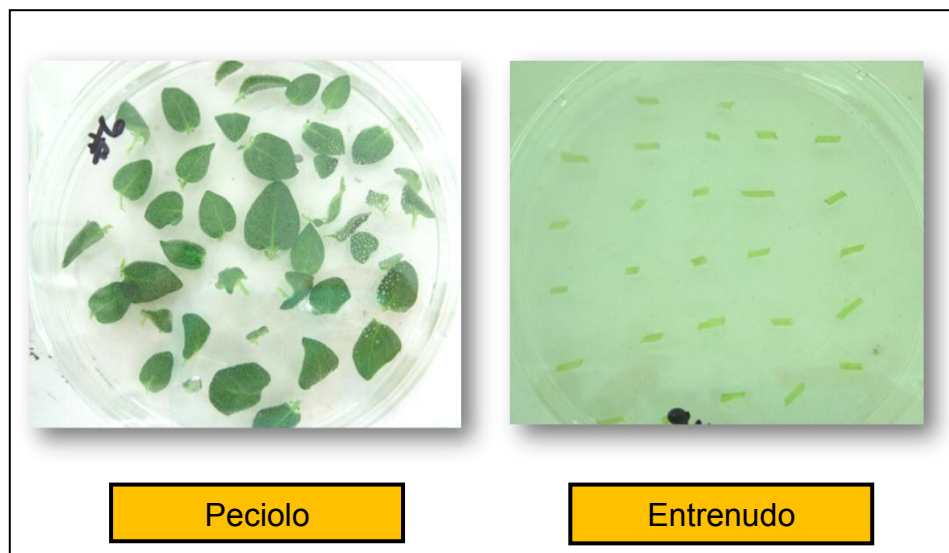


Figura 11: Explantes de D[SUR1/ST/GT]85.2 co-transformados con el plásmido pRBCs:ORF1.3 en medio de regeneración MSA suplementado con 2 ppm de fosfotricina (2 días post transformación).
Fuente: elaboración personal.

A dos semanas en medio de regeneración se pudo observar la formación de callos muy pequeños en las heridas y además cambio de coloración de los explantes (de verde a amarillo).

Luego de cuatro semanas se observó necrosis del tejido vegetal en todos los explantes (hojas con peciolo y entrenudos) pertenecientes al control negativo (**Figura 13**). Por otro lado, en el control positivo (**Figura 12**), los explantes presentaron coloración verde intenso con presencia de callo e inicio de la formación de regenerantes en las

heridas. Sin embargo el desarrollo de callos en explantes transformados se observaba retrasado (callos muy pequeños).

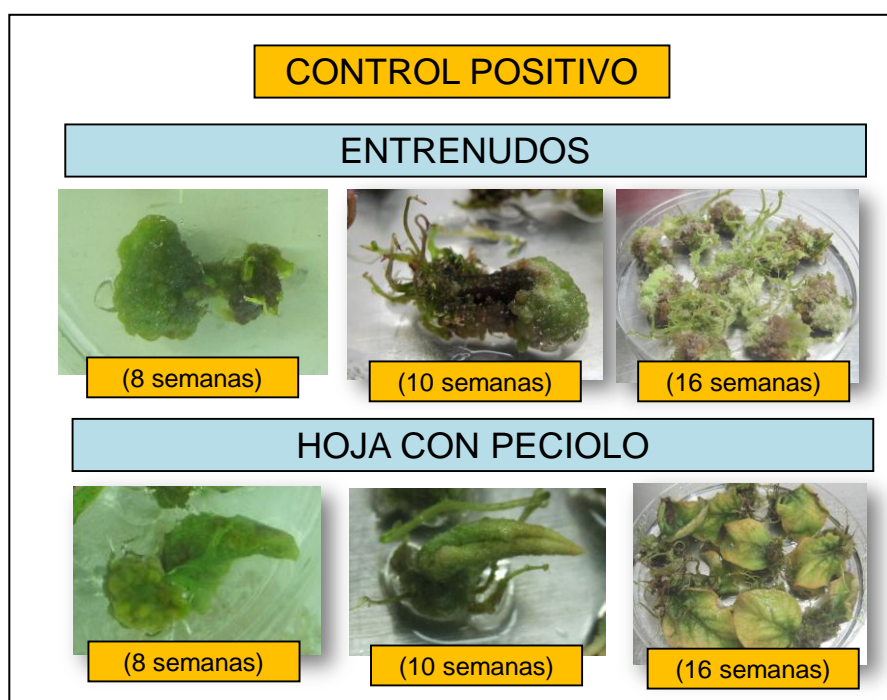


Figura 12: Control positivo (8, 10 y 6 semanas).
Fuente: elaboración personal.

Luego de 8 semanas de post-transformación genética los explantes (entrenudos y hojas con peciolo) mostraron callos en las heridas de aproximadamente 4 mm. Hojas con peciolo transformadas se mostraron amarillentas y quebradizas (**Figura 12**).



Figura 13: Control negativo (4 semanas).
(Fuente: elaboración personal).

A las 10 semanas en medio de regeneración, hojas con peciolo iniciaron el proceso de necrosis; por tal motivo se procedió a cortar el tejido necrosado y conservar sólo el peciolo con callo. Entrenudos transformados presentaron yemas y pequeños regenerantes de color verde oscuro en las heridas, mientras que el tejido no transformado se oxidó y necrosó, siendo descartados de los experimentos.

La **Figura 14**, muestra el desarrollo de callos y regenerantes a partir de entrenudos transformados con el plásmido pRBsc:ORF1.3 luego de 8 semanas y 12 semanas.



Figura 14: Regeneración de explantes
Fuente: elaboración personal.

No fue hasta las 16 semanas de regeneración en que los regenerantes alcanzaron 1 cm de longitud aproximadamente; en ese momento fueron trasladados a medio de propagación MSA semisólido en tubo (**Figura 15**).



Figura 15: Regenerante de co- transformación en medio de regeneración MSA (4 semanas) **A:** Plántula sin transformar **B:** Plántula co-transformada con pRBSc:ORF1.3.

Fuente: elaboración personal.

Luego de 5 experimentos de co - transformación genética, donde se transformaron 5671 explantes, se obtuvieron 57 regenerantes (**Tabla 7**), donde 52 de ellos regeneraron de las heridas realizadas en entrenudos y 5 de heridas realizadas en los peciolo; por tanto la eficiencia de regeneración de los experimentos fue de 1,01 %, donde un 91,2 % provinieron de entrenudos y un 8,8 % de peciolo.

Tabla 7: Experimentos de transformación y número de regenerantes obtenidos.

	Experimentos de transformación		Regenerantes	
	Entrenudos	H-P	Entrenudos	H-P
Exp. 1	724	156	20	1
Exp.2	795	265	5	3
Exp.3	954	460	10	0
Exp.4	1050	105	16	0
Exp.5	554	608	1	1
SubTotal	4077	1594	52	5
TOTAL	5671		57	

Fuente: elaboración personal.

4.1.4 DETERMINACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DEL TRANSGÉN

Se extrajo ADN genómico de 56 regenerantes. Un regenerante perteneciente al experimento dos (Evento 70) no fue incluido por problemas de contaminación. Se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa 1 %, donde se visualizó la calidad del ADN. La corrida no presentó ADN degradado (**Figura 16**).



Figura 16: Calidad de ADN. 1-17: muestras de ADN genómico M: marcador de peso molecular.

Fuente: elaboración personal.

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa se realizó utilizando los cebadores desarrollados a partir de las secuencias de los genes *CYP79A2* y *CYP83B1*, obteniéndose un tamaño de amplicón de 515 pb y 412 pb, respectivamente.

Se determinó las temperaturas de amplificación para dos pares de cebadores: CYP79A2 (61°C) y CYP83B1 (58 °C) mediante una PCR de gradiente de temperatura utilizando el vector de transformación como muestra.

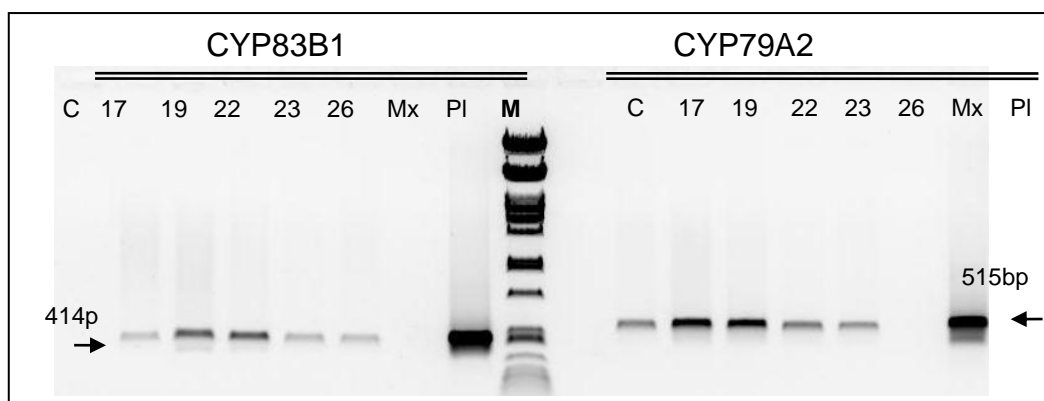


Figura 17: Análisis PCR de los regenerantes obtenidos por co - transformación genética con pRBSc:ORF1.3. Los cebadores CYP83B1 y el CYP79A2 amplifican fragmentos de 414pby 515pb.**C:** control negativo, **Mx:** solución de mezcla, **PI:** plásmido y **carriles 2-6:** regenerantes positivos por PCR.

Fuente: elaboración personal.

Utilizando 50 ng de ADN de los 56 regenerantes se realizó la PCR con los dos pares de cebadores, lográndose obtener amplificación en 55 regenerantes y no en uno de ellos (Evento 58 perteneciente al experimento tres). La figura 17 muestra cuatro regenerantes positivos para la amplificación de ambos pares de cebadores. En el **Tabla 8** se

muestra el resumen de resultados de la prueba de cadena de la polimerasa.

Tabla 8: Resumen de resultados de la prueba de cadena de la polimerasa.

	PCR			
	CYP79A2		CYP83B1	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Exp. 1	20	0	20	0
Exp.2	8	0	8	0
Exp.3	9	1	9	1
Exp.4	16	0	16	0
Exp.5	2	0	2	0
SubTotal	55	1	55	1
TOTAL	56		56	

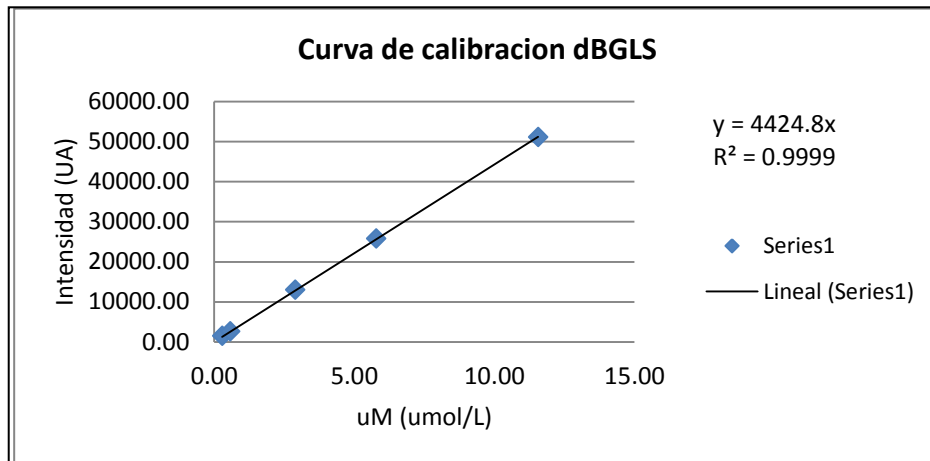
Fuente: elaboración personal.

4.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DESULFOBENCILGLUCOSINOLATOS (dBGLs) EN CONDICIONES *in vitro*

4.2.1 CURVA DE CALIBRACIÓN

Diluciones seriadas de desulfobencilglucosinolato (dBGL) fueron analizadas por HPLC-UV, mostrando un tiempo de retención (R_t) de 12,6 minutos (**Figura 18**).

Realizando las conversiones descritas en la sección “Métodos” se determinó la ecuación de la recta obteniéndose una pendiente de 4424,8 y un índice de correlación de la regresión lineal (R^2) de 0,9999 (**Gráfica 1**). La data se encuentra en **Anexo 9**.



Gráfica 1: Curva de calibración para la cuantificación de dBGLS por HPLC-UV. El valor del índice de correlación lineal (R^2) fue de 0,9999. **Fuente:** elaboración personal.

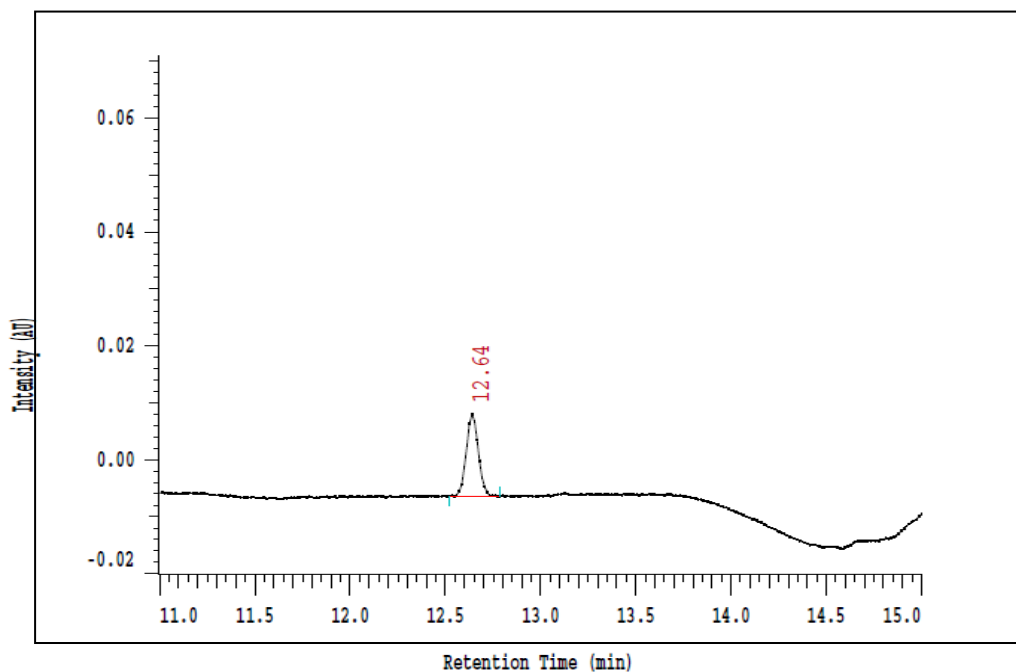


Figura 18: Cromatograma representativo de la solución estándar de desulfobencilglucosinolato 5,79 μM . La respuesta del detector se expresa en unidades arbitrarias. **Fuente:** elaboración personal.

4.2.2 EXTRACCIÓN DE BENCILGLUCOSINOLATO

De las 55 plántulas transformadas que dieron positivo para la prueba de reacción en cadena de la polimerasa, 50 de ellas se destinaron para análisis por HPLC-UV. Cinco plántulas no se analizaron a consecuencia de la reducida cantidad de material vegetal desarrollada por éstas (alteración de fenotipo). Las plántulas que no fueron analizadas fueron: evento 68 y evento 54 (experimento de transformación 4), evento 64 (exp. transf. 2), evento 67 (exp.transf 3) y evento 65 (exp.transf. 5).

La identificación de dBGLs en los cromatogramas se llevó a cabo mediante comparación con el tiempo de retención (12,57 min) y el espectro ultravioleta de dBGLs estándar.

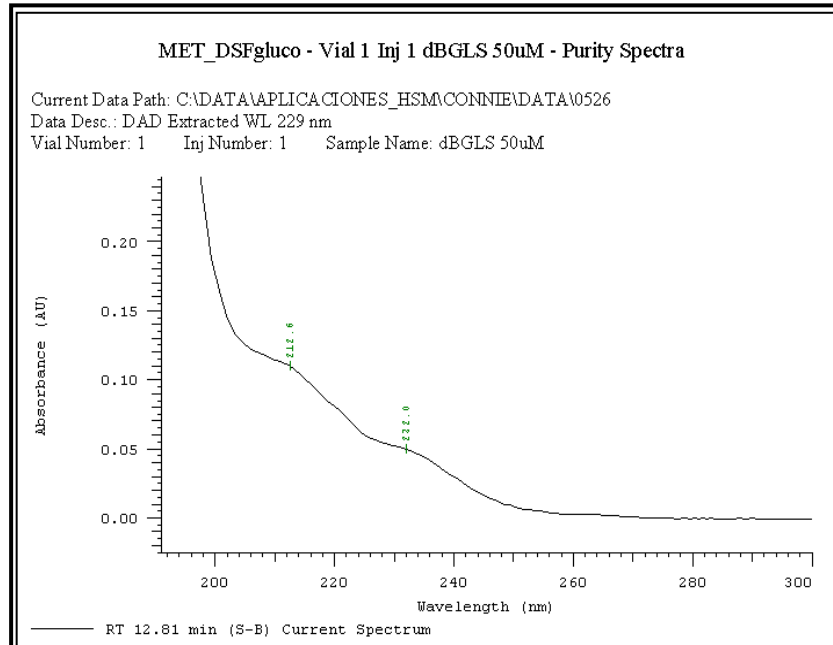


Figura 19: Espectro ultravioleta de desulfobencilglucosinato estándar.

Fuente: González, 2008.

El cálculo de la concentración de dBGLs presentes en cada plántula transformada fue determinado a partir de la integración del pico de interés. Las áreas de pico generadas producto de la integración fueron divididas entre la pendiente de la ecuación de la recta del gráfico de la curva de calibración de dBGLs, obteniéndose así la concentración (μM) de dBGLs presente en cada muestra y luego analizadas según la fórmula mencionada en la sección “Métodos”. Finalmente, la concentración de dBGLs se expresó en picomoles/miligramo de peso fresco (pmol/mg fresco). De las 50 plántulas transformadas, 21 dieron

positivo para la producción de dBGLs y en 29 de ellas no se detectó (Anexo 9).

Tabla 9: Resultados del análisis por HPLC-UV de las plántulas co-transformados.

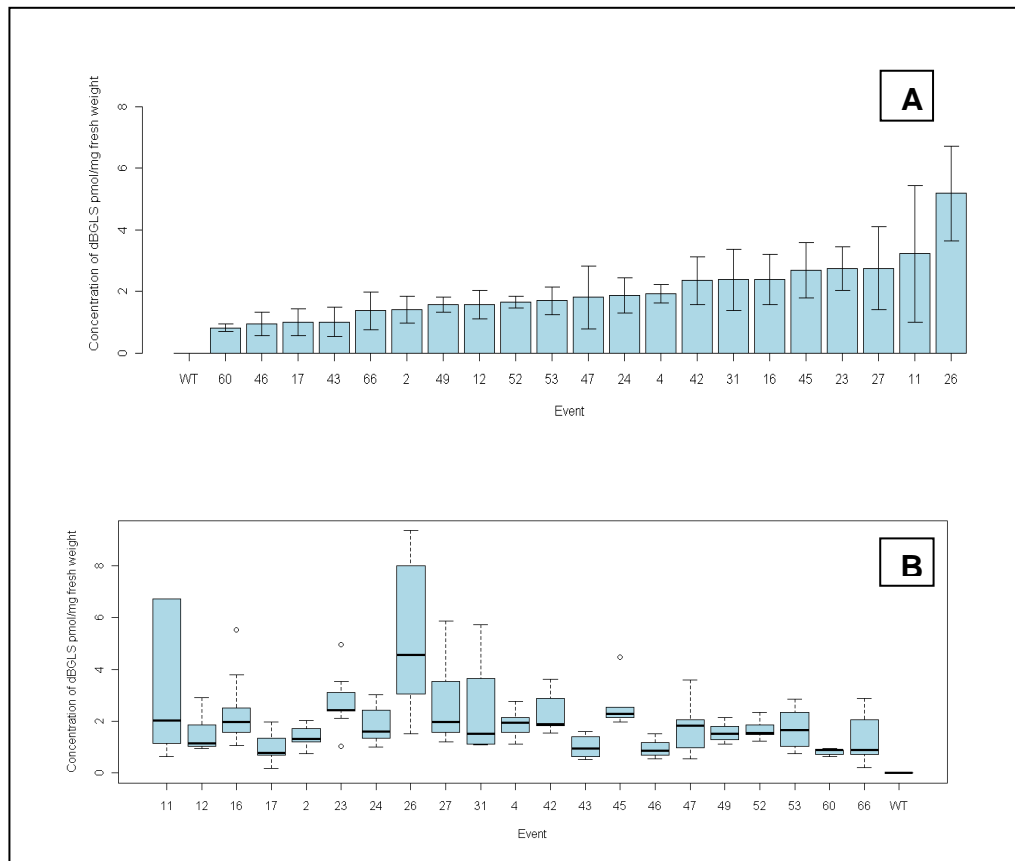
	Positivos	Negativos
Experimento 1	8	12
Experimento 2	2	5
Experimento 3	3	5
Experimento 4	7	7
Experimento 5	1	0
SEMI TOTAL	21	29
TOTAL	50	

Fuente: elaboración personal.



Figura 20: Fenotipo de plántulas *in vitro* positivas para la producción de dBGLs. A: Desiree (planta sin transformar) B, C y D: Plántulas co- transformadas con pRBS:ORF1.3 (30 días). Fuente: elaboración personal.

La cantidad de dBGLs en picomoles por miligramo de hojas *in vitro* se encuentran en un rango promedio entre 5,18 pmol/mg máximo y 0,81 pmol/mg mínimo (**Gráfica 2**). La data se encuentra detallada en **Anexo 9**.



Gráfica 2: Concentración dBGLS en plántulas transformadas en condiciones *in vitro*. **A:** gráfica de barras que muestra el contenido de desulfobencilglucosinato (dBGLS) de hojas *in vitro* de plántulas de *S.tuberosum* transformadas con Construc.3 y pRbsc:ORF1.3. La desviación estándar es representada con barras de error (n=6-12). **B:** la gráfica box-plot muestra la dispersión y mediana del contenido de dBGLS de hojas *in vitro* de plántulas de *S.tuberosum* transformadas con Construc. 3 y pRbsc:ORF1.3. Los puntos representan datos extremos.

Fuente: elaboración personal.

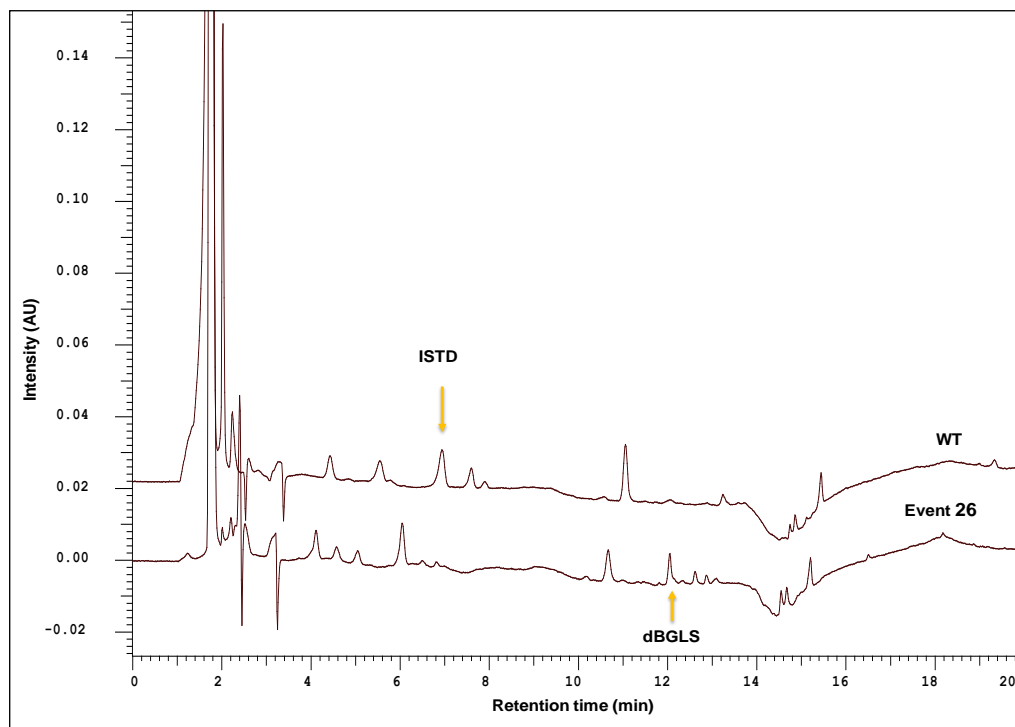


Figura 21: Cromatograma representativo del extracto de hojas de *S.tuberosum* cv. Desireé transformadas con “conruc.3” y “pRbsc:ORF1.3” (Event 26) comparado con el cromatograma de *S.tuberosum* cv. Desireé sin transformar (**WT**), donde se muestra el pico del estándar interno sinigrina (**ISTD**) y el de desulfobencilglucosinolato (**dBGLS**).

Fuente: elaboración personal.

4.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DESULFOBENCILGLUCOSINOLATOS (dBGLs) EN CONDICIONES DE INVERNADERO

Después de analizar por HPLC-UV plántulas generadas por transformación genética en condiciones *in vitro*, se eligió diez de ellas para ser trasladadas a condiciones de invernadero. La selección se basó en la cantidad de dBGLs, eligiendo a las que presentaban mayor concentración en condiciones *in vitro*. Además se trasladaron plántulas de *Solanum tuberosum* sin transformar y plántulas de Evento 85.2, como controles. Las plántulas fueron trasladadas a condiciones de invernadero: temperatura: 17 - 22 °C, luz días medios 12 horas luz – 12 horas oscuridad y humedad relativa entre 55 - 85 %.

La nueva codificación de las plántulas seleccionadas se presenta en **Tabla 10**. El análisis de dBGLs de las muestras trasladadas a invernadero se realizó por LC- ESI- MS.

Tabla 10: Codificación de las plántulas seleccionadas para ser trasladados a condiciones de invernadero

Nuevo Código	Evento	Promedio <i>in vitro</i> (pmol/mg)	Mediana
GLS 1	26	5,18	4,57
GLS 2	11	3,22	2,04
GLS 3	27	2,75	1,98
GLS 4	23	2,75	2,42
GLS 5	16	2,39	1,98
GLS 6	31	2,16	1,53
GLS 7	4	1,91	1,93
GLS 8	24	1,88	1,60
GLS 9	53	1,69	1,67
GLS 10	52	1,65	1,55

Fuente: elaboración personal.

4.3.1 TOMA DE MUESTRA

De las 10 plántulas seleccionadas, tres de ellas no lograron desarrollarse adecuadamente en condiciones de invernadero. Las plántulas GLS 2, GLS 3 y GLS 7 no fueron analizadas.

Se tomaron hojas a las 15 semanas de crecimiento en maceta tanto de la parte superior como inferior de la planta y se realizó la extracción de dBGLs como se describe en la sección “Métodos”.

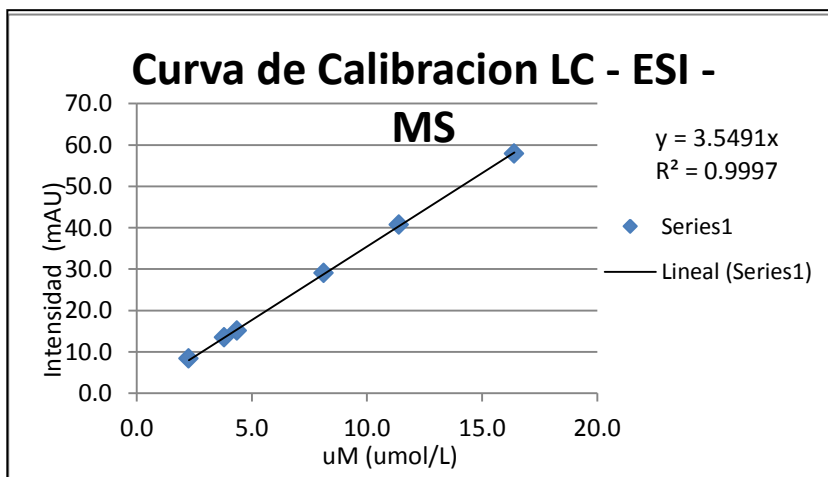


Figura 22: Fenotipo de plántulas en condiciones de invernadero positivas para la producción de dBGLs. A: Hojas de Desireé (planta sin transformar) B: Hojas de Evento 23 (GLS 4) y C: de izq. a der. Plántula Contruc.3, Evento 23 y Desireé (planta sin transformar) (2 meses).

Fuente: elaboración personal.

4.3.2 CURVA DE CALIBRACIÓN

Utilizando el equipo LC-ESI-MS, se procedió con el análisis de las muestras pertenecientes a la curvas de calibración por LC-UV. El dBGL mostró un tiempo de retención (R_t) de 17 minutos. Se obtuvo la ecuación de la recta usando una regresión lineal simple y utilizando las conversiones descritas en la sección “Métodos” (**Anexo 9**). Se determinó la ecuación de la recta obteniéndose una pendiente de 3,55 y un índice de correlación de la regresión lineal (R^2) de 0,9997 (**Gráfica 3**).



Gráfica 3: Curva de calibración para la cuantificación de dBGLS por LC- ESI-UV . El valor del índice de correlación lineal (R^2) fue de 0,9997.

Fuente: elaboración personal.

4.3.3 ANÁLISIS DE CROMATOGRÁFICO (LC-ESI-MS)

La identificación de dBGLs en los cromatogramas se llevó a cabo mediante comparación con el tiempo de retención, espectro ultravioleta y detección del ion molecular con sodio $[M+Na]^+$ 352 m/z del desulfobencilglucosinolato estándar.

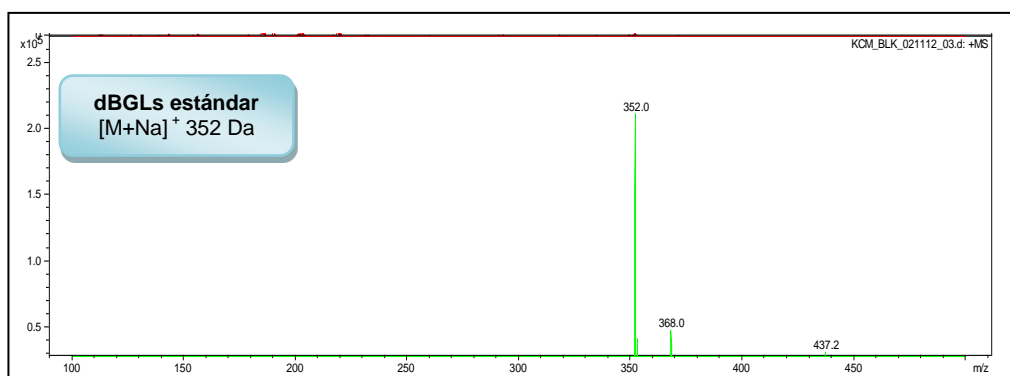


Figura 23: Cromatograma representativo del ion molecular de desulfobencilglucosinolato estándar con sodio. $[M+Na]^+$ 352 m/z. **Fuente:** elaboración personal.

El cálculo de la concentración de dBGLs presentes en cada plántula transformada fue determinado a partir de la integración del pico en LC-UV.

El procedimiento de cálculo de la concentración de dBGLs en picomoles/miligramo fresco y en picomoles/miligramo seco, se realizó de igual manera que para condiciones *in vitro*. El peso seco se obtuvo

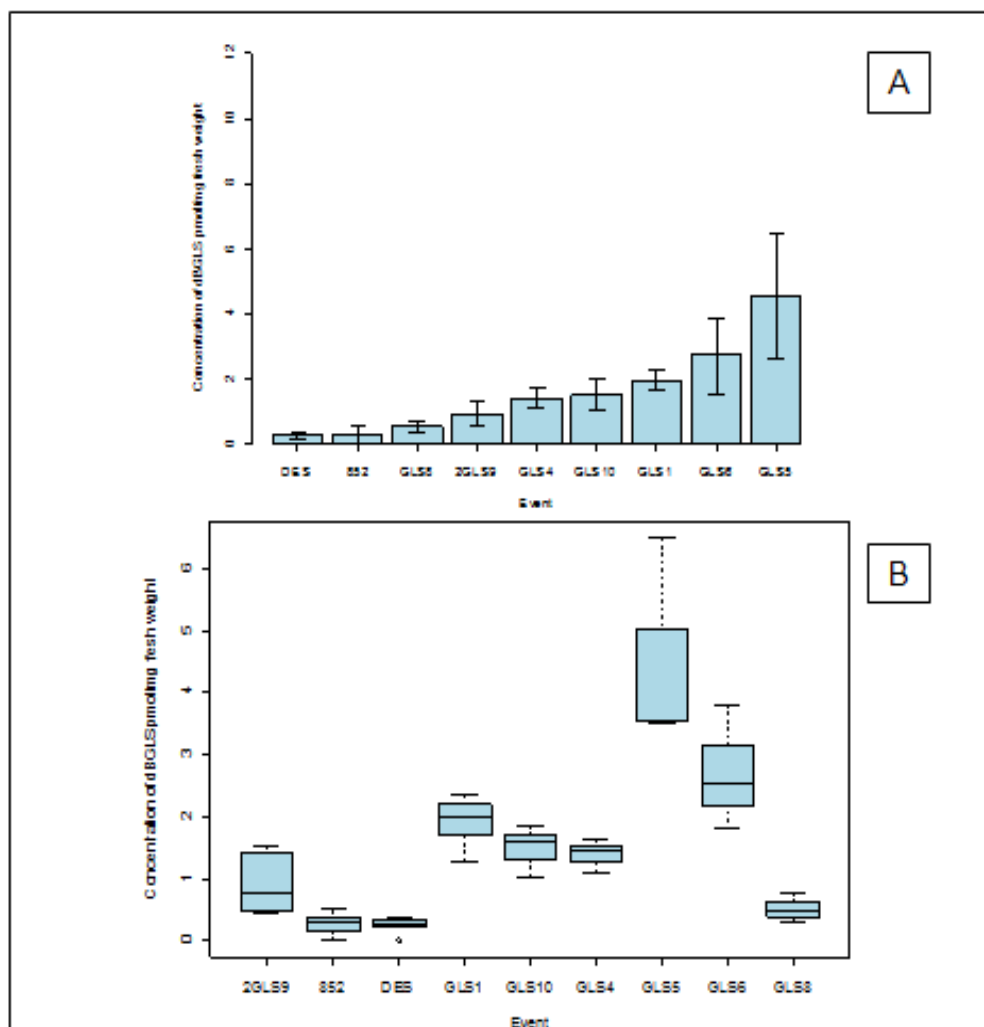
de pesadas por triplicado del material vegetal desecado a temperaturas elevadas (**Anexo 9**).

La concentración mínima en pmol de dBGLS por miligramo de material fresco se encontró en la plántula co-transformada GLS8 (0,5 pmol/mg) mientras que la mayor concentración (4,5 pmol/mg) se encontró en plántula GLS 5, como se muestra en la **Tabla 11, Gráfica 4 y Gráfica 5**.

Tabla 11: Concentración de dBGLs en *S.tuberosum* en condiciones de invernadero

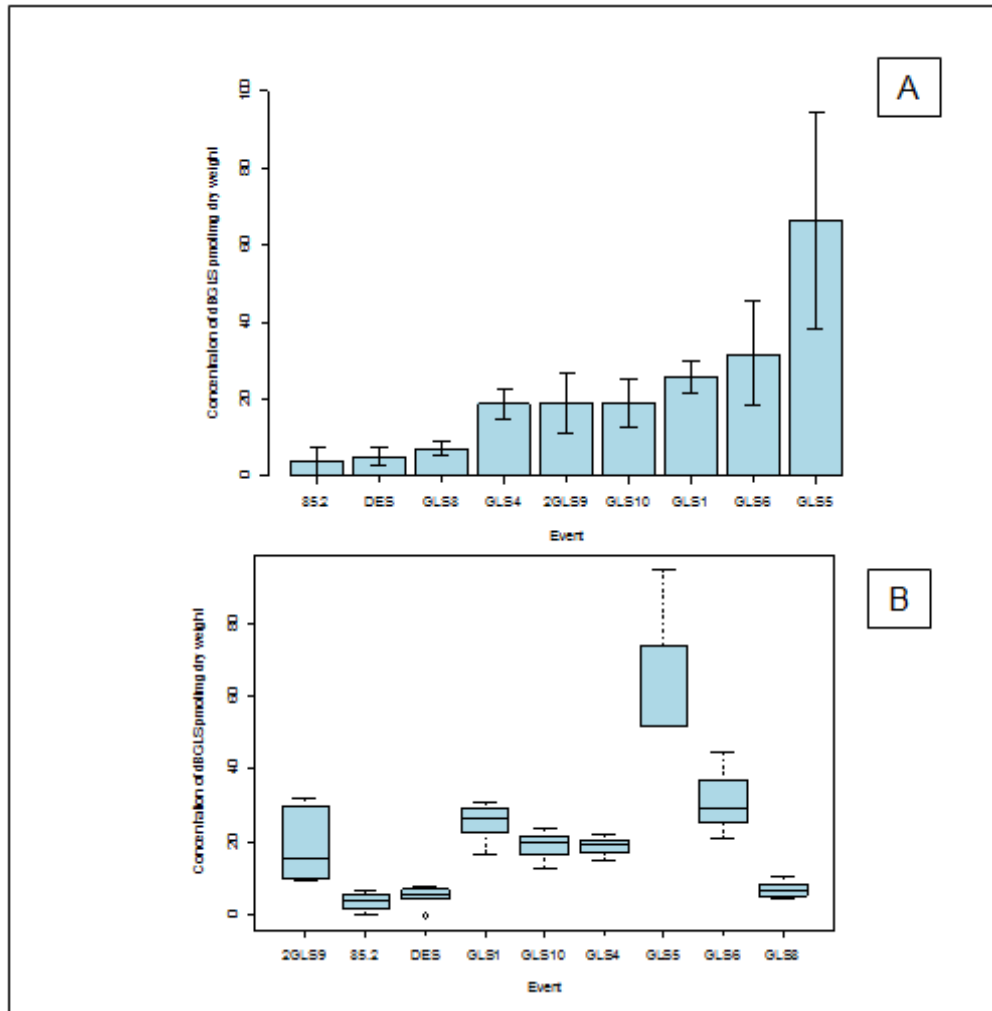
Evento	pmol de dBGLs/mg fresco	pmol de dBGLs/mg seco
DES	0,252	5,14
85.2	0,263	3,67
GLS 1	1,930	25,56
GLS 4	1,395	18,78
GLS 5	4,529	66,21
GLS 6	2,712	31,76
GLS 8	0,515	7,11
GLS 9	0,908	18,84
GLS 10	1,498	18,86

Fuente: elaboración personal.



Gráfica 4: Concentración dBGLS por peso fresco de plántulas transformadas en condiciones de invernadero. A: gráfica de barras que muestra el contenido de desulfobencilglucosinolato (dBGLS) por peso fresco de plántulas de *S. tuberosum* transformadas con Construc.3 y pRbsc:ORF1.3. La desviación estándar es representada con barras de error (n=3-6). **B:** la gráfica box-plot muestra la dispersión y mediana del contenido de dBGLS por peso fresco de hojas de *S. tuberosum* transformadas con Construc. 3 y pRbsc:ORF1.3. Los puntos representan datos extremos.

Fuente: elaboración personal.



Gráfica 5: Concentración dBGLS por peso seco de plántulas transformadas en condiciones de invernadero. A: gráfica de barras que muestra el contenido de desulfobencilglucosinolato (dBGLS) por peso seco de plántulas de *S.tuberosum* transformadas con Construc.3 y pRbsc:ORF1.3. La desviación estándar es representada con barras de error (n=3-6). **B:** la gráfica box-plot muestra la dispersión y mediana del contenido de dBGLS por peso seco de hojas de *S.tuberosum* transformadas con Construc.3 y pRbsc:ORF1.3. Los puntos representan datos extremos.

Fuente: elaboración personal.

4.3.4 FRAGMENTACIÓN POR INYECCIÓN DIRECTA DE DESULFOBENCILGLUCOSINOLATO (dBGL)

Luego de tomar una alícuota de dBGLs estándar se procedió a la detección de masas por inyección directa. Las masas producto de la fragmentación del ion 352,1 Da esperadas en m/z son: 218,8; 184,8; 189,8; 202,8 (Moldrup, 2011).

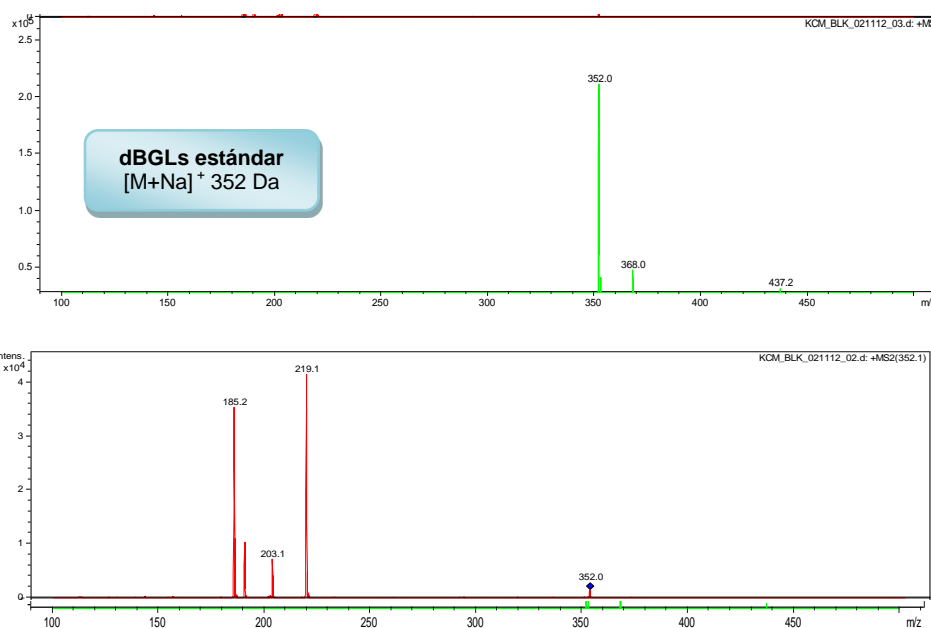


Figura 24: Cromatograma de masas por inyección directa de dBGLs estándar [M+ Na]⁺ 352,1 Da (Arriba) y fragmentación de dBGLs MS⁺ 352,1 Da en m/z: 219,1; 185,2; 189,8; 203,1 (abajo). Fuente: elaboración personal.

Como se puede observar en la **Figura 24** las masas encontradas en MS⁺ coinciden con las reportadas por Moldrup, 2011.

4.3.5 FRAGMENTACIÓN POR LC-ESI-MS DE dBGLS EN CONDICIONES DE INVERNADERO

Para confirmar la identificación de dBGLs en plántulas en condiciones de invernadero se realizó la fragmentación de analito de cada una de las muestras. En primera instancia, se analizó por HPLC/ESI/MS⁺ desulfobencilglucosinato estándar.

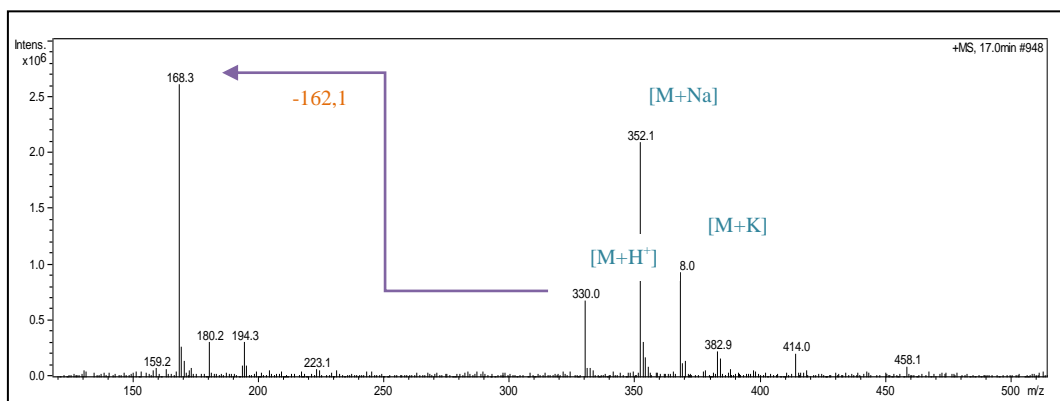


Figura 25: HPLC/ESI /MS⁺ Desulfobencilglucosinato estándar.
Fuente: elaboración personal.

En la **Figura 25** se observa la presencia del ion molecular 329 con H⁺ (330 m/z), con Na (352,1 m/z) y con K (368 m/z). Cabe resaltar la presencia de 168,3 m/z; esta masa proviene de la pérdida de 162,1 m/z del ion molecular 330 m/z correspondiente al grupo glucosil característico de los glucosinatos.

Debido a que producto de una corrida sin parámetros de fragmentación se observa la pérdida del grupo glucosil, se postula que esta fragmentación espontánea de desulfobencilglucosinato (330 m/z) es producto del flujo utilizado en el análisis HPLC/ESI /MS⁺ (1 ml/min).

Al igual que con desulfobencilglucosinato estándar, se procedió con las muestras provenientes de invernadero. Las masas encontradas fueron las mismas que las que se reportan en Matthaus *et al.* 2000 y Moldrup *et al.* 2011. En la **Figura 26** se observa la fragmentación del analito de la plántula con mayor concentración de dBGLs (GLS 5). En **Anexo 7**, se observa la fragmentación de dBGLs en las plántulas transformadas.

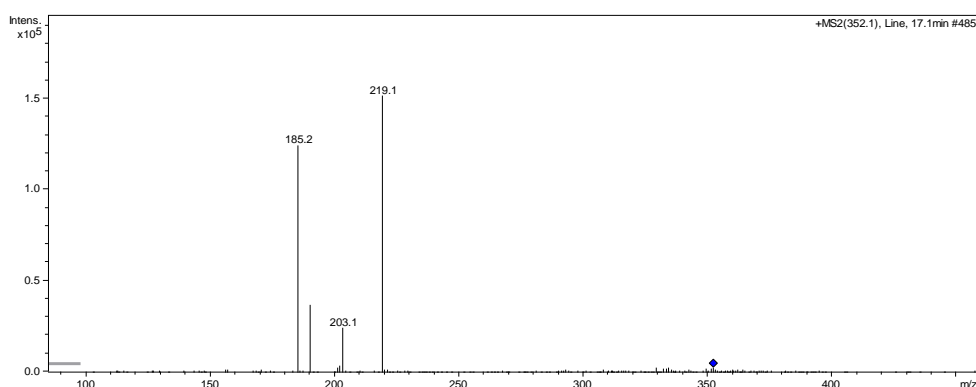


Figura 26: Fragmentación de dBGLs en *Solanum tuberosum* cv. Desireé (Construc.3 + pRBsc:ORF1.3) – GLS 5.

Fuente: elaboración personal.

4.4 DETECCIÓN DE PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE GLUCOSINOLATOS

Previamente se analizó en un cromatograma los analitos estándares con una concentración conocida, donde se pudo identificar los tiempos de retención de cada uno de ellos.

Para la detección de una tioglucosidasa endógena en *S.tuberosum*, se utilizó GC-MS. Se tomaron muestras de hojas *S.tuberosum* cv. Desireé sin transformar en condiciones de invernadero a las cuales se le sometieron a diferentes tratamientos, a STD se le agregó dBGLs estándar; a STD+THIO, dBGLs estándar y tioglucosidasa y la muestra "Control", se le agregó agua MilliQ.

Los cromatogramas obtenidos fueron analizados con los software Chemstation y Automated mass spectral deconvolution and identification system, AMDIS 2.69, utilizando como referencia la base de datos NIST 2008. Como se puede apreciar en la **Figura 33**, plántulas de *Solanum tuberosum* poseen analitos volátiles típicos de su género en mayor proporción, como hexenal y cariofileno, los cuales se encuentran listados según su tiempo de retención en la **Tabla 12** y **Anexo 8**.

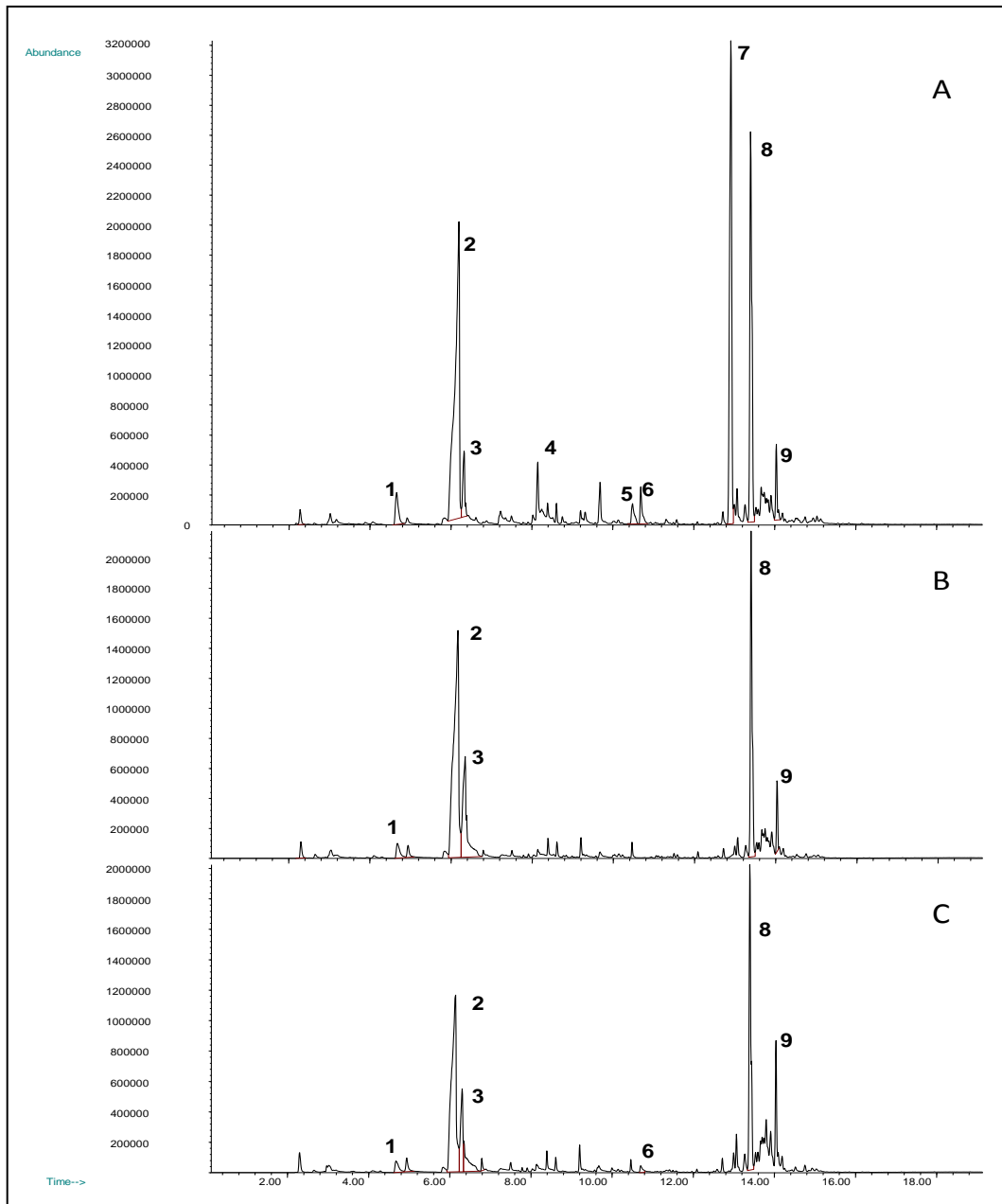


Figura 33: Análisis GC-MS de papa para la detección de tioglucosidasa endógena, donde: **(A)** estándar y tioglucosidasa (STD + THIO), **(B)** control, **(C)** estándar (STD) y **Picos 1-9:** analitos identificados descritos en la **Tabla 12 y Tabla 13.**

Fuente: elaboración personal.

Tabla 12: Numeración de analitos y tiempo de retención.

Numeración°	Nombre	Tiempo de retención (min)		
		A	B	C
1	3-hexenal	4,66	4,67	4,68
2	2-hexenal	6,19	6,14	6,17
3	2- hexen-1-ol	6,32	6,30	6,35
4	Bencilaldehído	8,33	-	-
5	Bencilisocianato	10,49	-	-
6	Bencilnitrilo	10,69	-	10,70
7	Bencilisotiocianato	12,91	-	-
8	Cariofileno	13,40	13,40	13,39
9	δ – cadineno	14,04	14,04	14,04

Fuente: elaboración personal.

Los analitos producto de la hidrólisis de glucosinolatos como bencilaldehído, bencilisocianato, bencilisotiocianato y bencilnitrilo sólo fueron encontrados en el tratamiento STD+THIO; sin embargo, estos no fueron encontrados en el tratamiento STD, pudiendo inferir que *Solanum tuberosum* no presenta tioglucosidasa endógena. La concentración de bencilnitrilo en el tratamiento STD es despreciable según las concentraciones de sustrato en la reacción y el porcentaje de pureza

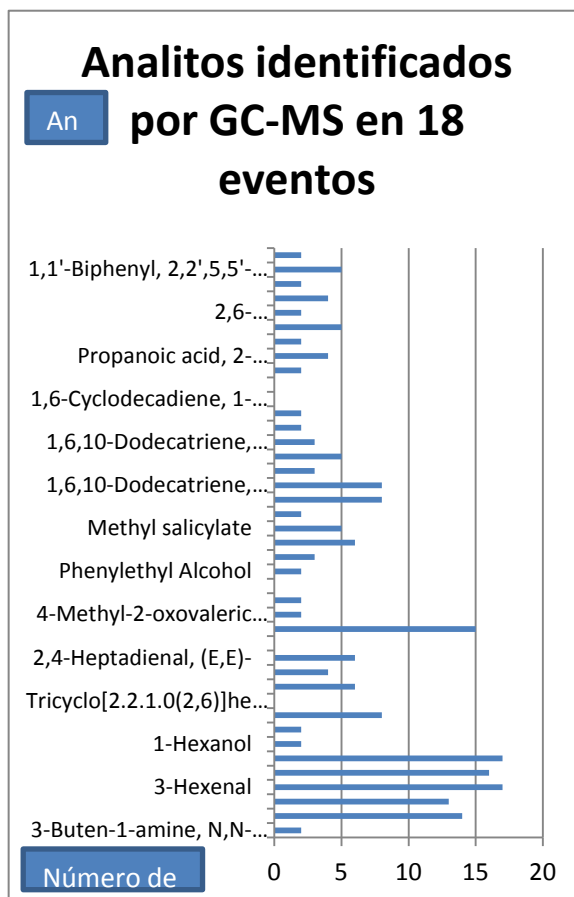
(**Tabla 13**). Los tiempos de retención de los analitos coinciden con los previamente determinados con los analitos estándares.

Tabla 13: Áreas de integración y porcentaje de pureza de analitos.

TR std (min)	TR muestras (min)	Analito	Área de integración y porcentaje de pureza		
			Control	STD	STD + THIO
8,32	8,33	Bencilaldehído	-	-	-
	10,49	Bencilisocianato	-	-	910 714 83%
10,74	10,69	Bencilnitrilo	-	384 809 88%	1 504 129 94%
12,93	12,91	Bencil isotiocianato	-	-	20 691 085 94%

Fuente: elaboración personal.

Este análisis se realizó en plántulas transformadas en condiciones de invernadero. No se detectó productos de la hidrólisis de glucosinolatos como nitrilos, epinitrilos, tiones, tiocianatos e isotiocianatos en las plántulas. Sin embargo se pudieron identificar analitos propios de la especie, como se muestra en la **Gráfica 6**.



Gráfica 6: Identificación de analitos en cromatogramas GC-MS de plántulas transformadas en condiciones de invernadero.
Fuente: elaboración personal.

V. DISCUSIÓN

La posibilidad de introducir genes simples al genoma de una planta ha dado como resultado algunas especies con propiedades agronómicamente interesantes. Estos logros han llevado a un interés en la introducción y expresión de más de un gen foráneo en plantas (Casas, 1997). Las soluciones transgénicas para muchos rasgos complejos de las

enfermedades vegetales en el futuro requerirán la introducción de varios genes, ya sea para conferir características mejores a los cultivos o para la introducción de varios genes de una vía metabólica (Mifflin, 2000).

Se ha entendido mucho sobre la biosíntesis de los glucosinolatos (GLs) debido al secuenciamiento del genoma de *Arabidopsis thaliana*, planta crucífera. La síntesis de glucosinolatos involucra dos genes de citocromo P450 anclados en el retículo endoplasmático (CYP79 y CYP83) y tres enzimas solubles C-Siiasa, una glucosiltransferasa y una sulfotransferasa (Geu, 2008).

Existen muchas estrategias para introducir varios genes, una de ellas es la piramidización de genes, la cual puede ser definida como “la introducción estable de más de un gen viable en el genoma vegetal vía transformación” (Mifflin, 2000).

En base a este concepto es que se realizó la co- transformación de plántulas *S.tuberosum* cv. Desireé, previamente transformadas con los genes C-Siiasa (*SUR1*), glucosiltransferasa (*GT*) y sulfotransferasa (*ST*), involucrados en las reacciones finales de la biosíntesis de los glucosinolatos (plantas desarrolladas por CIP). En esta transformación genética se utilizó el marcador de selección de resistencia a kanamicina.

De todas las plántulas transformadas se eligió a uno de ellos debido a sus características bioquímicas y moleculares. La plántula elegida para ser sometida a una segunda transformación genética fue Desiree[*HIS: ST: GT: SUR1*]85.2 (evento 85.2), a la cual se le adicionaron los genes citocromo P450: *CYP79A2*, *CYP83B1* y el gen γ – *glutamil peptidasa 1* (*GGP1*) utilizando como marcador de selección gen *bar* y así completar la introducción de los genes principales involucrados en la biosíntesis de glucosinolatos (GLs) a partir de fenilalanina en plántulas de papa.

El hecho de introducir una vía metabólica que involucra al menos cinco pasos enzimáticos a una planta heteróloga es considerado como un desafío. Si el promotor es usado repetidamente en la transformación genética de plantas mediante ingeniería metabólica en donde están involucrados más de un gen podría conducir al silenciamiento del transgén (Morant *et al.*, 2007). Un método para conseguir la co-expresión de diferentes transgenes es mediante el sistema de co-expresión 2A, el cual permite la producción de muchas proteínas desde un solo promotor (De Felipe, 2006). El sistema de coexpresión 2A también fue utilizado por Geu, 2008, en donde fusionó múltiples secuencias de proteínas intercaladas con secuencias de co-expresión 2A, dentro de un solo ORF.

Además se comprobó que las secuencias 2A no interfieren en la expresión de los transgenes. Esta estrategia en el diseño del vector también fue utilizada en la presente tesis.

La transformación mediada por *Agrobacterium* posee ventajas sobre otros métodos de introducción de genes, ya que no requiere un trabajo intensivo, equipos sofisticados y es más rentable. Los factores que afectan la eficiencia de transformación por infección bacteriana son el tipo de tejido, la edad, el genotipo y la susceptibilidad a *Agrobacterium* (Finer, 1996), tomando en cuenta estos factores es que se utilizaron plántulas del cultivar Desireé en proceso de morfogénesis (30 días) para la transformación genética y así obtener una mayor eficiencia de regeneración.

La mayoría de los protocolos para la transformación de papa publicados utilizan un sistema de dos pasos: uno para la inducción de callos y otro para la formación de brotes. Este sistema ha resultado eficiente a partir de segmentos de tallos (Beaujean *et al.*, 1998) y de hojas (Banerjee *et al.*, 2006) en diferentes variedades de papa, a pesar de emplearse diferentes combinaciones hormonales en algunos casos. Sin embargo en procesos de transformación de la variedades de papa *Andina*

resultó ineficiente y solo lograron una mejor eficiencia de regeneración con kanamicina (28 y 34 %) al utilizar un solo medio de cultivo con enriquecido con zeatina y ácido indol acético (AIA) (Trujillo *et al.*, 2001).

Dependiendo del tipo de variedad y/o cultivar de papa las fitohormonas pueden variar, así tenemos que para papa *Andina* se utilizó ácido naftanen acético (ANA) y 6-benzilaminopurin (BAP) para la formación de callos y ANA y ZR (ribósido de zeatina) para la formación de brotes (Trujillo *et al.*, 2001); mientras que para el cultivar Desireé se empleó sólo ácido giberélico (AG₃) para la formación de brotes (Soto *et al.*, 2007), obteniendo mayores niveles de regeneración que los encontrado por Trujillo. En la presente tesis se empleó una concentración constante de tres hormonas, ANA, AG₃ y ZR, durante todo el proceso de regeneración en un solo medio de cultivo y se obtuvo menores porcentajes de eficiencia de transformación que en Soto *et al.*, 2007.

Uno de los factores importantes en el establecimiento de un sistema de transformación genética, es contar con un agente eficaz de selección del tejido transgénico, para así seleccionar aquellas células que presenten los genes foráneos. En este sentido, la selección de tejidos y plantas transgénicas mediante el gen *bar* es una buena alternativa.

El gen *bar* confiere resistencia al herbicida fosfinotricina o glufosinato de amonio y ha sido utilizado como gen marcador de selección para la transformación genética de plantas. En otras especies se observa que el nivel de inhibición de la fosfinotricina así como su concentración en el medio de regeneración, varía de acuerdo al genotipo y al explante de la especie estudiada. Así, en tres géneros de orquídeas (*Brassia*, *Catleya* y *Dorita enopsis*) con el gen *bar*, se encontró que 3 mg/L del herbicida BASTA (un nombre comercial de la fosfinotricina), es el nivel óptimo para seleccionar las plantas genéticamente transformadas, indicándose que a dicha concentración, las secciones de hoja no transformadas se tornaron entre marrones y negras en pocas semanas. Sin embargo, el nivel de tolerancia es mayor en plantas como *Picea abies*, donde la concentración óptima de selección es 100 mg/L del herbicida BASTA, bajo cuyo efecto las plantas no transgénicas se tornan amarillas (Knapp, 2000 y Brukhin, 2000, citados en Fernández *et al.* 2004).

En secciones foliares en *Coffea arabica* se encontró que el herbicida fosfinotricina (PPT), inhibió totalmente la morfogénesis de callo y de tejido foliar se necrotizó fuertemente a partir de 1 mg/L. A concentraciones de 10 mg/L del herbicida, el crecimiento de callo fue inhibido totalmente, y

adicionalmente se presentó una marcada necrosis. Además, se mencionó que el herbicida a una concentración de 0,5 mg/L inhibió parcialmente el crecimiento de las secciones foliares y el callo (Fernández *et al.*, 2004). Mediante transformación por *A.tumefaciens* en meristemas de camote, utilizando al gen *bar* como marcador de selección, se determinó que la concentración mínima letal fue entre 2,5 mg/L y 5 mg/L de PPT (Jin *et al.*, 2007).

Un experimento en donde se transformó segmentos de tallos de papa del cultivar Desireé utilizando el gen *bar* como marcador de selección, obtuvo resultados eficientes de transformación aplicando una concentración mínima letal de 2 mg/L de PPT en el proceso de regeneración (Soto, 2007). Estos resultados coinciden con lo observado en el experimento de determinación de la concentración mínima letal de fosfotricina en entrenudos y tejido foliar, en donde se observó que concentraciones mayores de 2 mg/L del herbicida los explantes tanto callos como hojas, presentaron los mismos signos de degeneración del tejido.

El herbicida fosfotricina a 3 mg/L es el mejor agente de selección, debido a que inhibe la formación de callo en secciones foliares (de plantas

crecidas *in vivo* como *in vitro*) generando menos necrosis (Van Boxtel, 1997). En los experimentos realizados en esta tesis se pudo observar la no formación de callo producto de la inhibición de la fosfinotricina, sin embargo se observó abundante necrosis en los explantes no transformados luego de 4 semanas en medio de regeneración. Además de la necrosis, durante el proceso de degeneración de tejido, se incrementó la contaminación de los callos por *A.tumefaciens*. Por tanto, fue preciso retirar del medio de regeneración, aquellos callos en proceso de necrosis inmediatamente luego de observar las colonias junto a estos y evitar así contaminación por contacto.

La eficiencia de la transformación mediada por *A.tumefaciens* y la eficiencia de la regeneración de plántulas de papa son muy variables ya que dependen de los procedimientos y cultivares utilizados. Cuando se utilizó el gen *npt* como marcador de selección para transformar el cultivar Desireé se determinó una eficiencia de regeneración promedio de 75,3 % aprox. y una eficiencia de transformación promedio de 41,85 % (Casas, 1997), una eficiencia de regeneración del 28 % y sólo una eficiencia de transformación de 5,97 % (González, 2008) debido al gran número de escapes. Sin embargo, posteriores experimentos de transformación con el cultivar Desireé utilizando el gen *npt*, presentan usualmente una eficiencia

de transformación de 3 % (Rivera, conversación personal). En experimentos de transformación por *A.tumefaciens* y una selección por PPT, se obtiene una eficiencia de transformación del 68 % (a partir de 100 brotes) (Soto *et al.*, 2007).

Luego de cinco experimentos de co - transformación genética, donde se transformaron 5671 explantes, se obtuvieron 57 regenerantes, donde 52 de ellos se generaron de las heridas realizadas en entrenudos y 5 de heridas realizadas en los peciolo; por tanto la eficiencia de regeneración de los experimentos fue de 1,01 %, donde un 91,2 % provinieron de entrenudos y un 8,8 % de peciolo. Se obtuvo una mayor eficiencia de transformación a comparación de una anteriormente realizada en el mismo cultivar y utilizando entrenudos como explantes (Soto *et al.*, 2007). La baja eficiencia de regeneración puede deberse a la efectiva toxicidad del herbicida BASTA. El efecto del herbicida fue detectado en el control negativo a las cuatro semanas en donde todos los explantes perdieron pigmentación y murieron.

Por otro lado, la eficiencia de transformación presentada fue elevada (96,49 %) a comparación de otros experimentos de transformación de papa utilizando el gen *ntp* de resistencia a kanamicina, como marcador de selección (Casas, 1997; González, 2008 y Rivera, 2003). Esta eficiencia

de transformación elevada se distingue de la encontrada cuando transforma meristemas apicales de *Ipomoea batatas*, camote, utilizando el mismo método de transformación y el mismo gen marcador de selección (Jin, 2007). La eficiencia de transformación fue de 2,8 %. La regeneración no depende de la concentración de bacterias y ni del tiempo de co-cultivo, sino del medio del cultivo (Casas, 1997).

La alta eficiencia de transformación y baja eficiencia de regeneración, puede deberse a la alta capacidad de selección del herbicida PPT. PPT, es un potente inhibidor de la glutamina sintetasa (GS). Por tanto, en el proceso de regeneración (dos semanas) se pudo observar formación de callos pequeños en las heridas además de cambio de coloración de los explantes (de verde a verde amarillento) características antes descritas (Casas, 1997). Luego de cuatro semanas se observó necrosis del tejido vegetal en todos explantes (hojas con peciolo y entrenudos) pertenecientes al control negativo; por otro lado en el control positivo éstos presentaban un color verde intenso con presencia de callo e inicio de la formación de regenerantes en las heridas. Sin embargo los explantes transformados aún continuaban con callos pequeños. En entrenudos transformados, no es hasta las ocho semanas en que los explantes muestran callos en las heridas de aproximadamente

4 mm, mientras que las hojas con peciolo transformadas se mostraron amarillentas y quebradizas (Casas, 1997). No es hasta las 16 semanas en que se culmina la regeneración.

Lo observado en el proceso de regeneración se debe a que GS, es la única enzima en las plantas que puede detoxificar el amonio liberado por la reducción de nitrato, la degradación de aminoácidos y la fotorespiración. La inhibición de la GS por PPT causa una acumulación rápida de amonio que lleva a la muerte de las células de la planta (De Block *et al.*, 1987; Fernández *et al.*, 2004).

Existen formas diferentes de la glutamina sintetasa (ubicadas en citoplasma, cloroplasto y nódulo de las plantas leguminosas). Sin embargo el hecho de obtener regenerantes desarrollados en un medio con PPT implica que el gen *bar*, que codifica fosfinotricin acetil transferasa (PAT) ofrezca resistencia a PPT, inactiva al herbicida acetilando el grupo NH₂ libre de la PPT, por tanto evita la autotoxicidad en el organismo productor (De Block *et al.*, 1987), permitiendo así la regeneración del tejido vegetal (Zhang *et al.*, 1999).

Los transgenes al ser integrados dentro del genoma de la planta no debe interrumpir o modificar los genes presentes en el sitio de inserción ni

la estabilidad del mismo (Ghislain, 2000). Sin embargo, el fenotipo de las plántulas transformadas con los genes de la vía metabólica de los glucosinolatos a partir de fenilalanina muestran el fenotipo *in vitro* y en condiciones de invernadero alterado. Este fenotipo consiste en la deformación de hojas, tallo y raíces. Las hojas se hicieron más gruesas, pequeñas y sin bordes definidos, la distancia entre los nudos se ve acortada y se observa una disminución en la formación de raíces.

El crecimiento y la productividad en papa, es el resultado de dos grandes determinantes: el genotipo de la planta y su ambiente circundante. Con el fin de realizar la extracción de dBGLs de plántulas de papa en su máxima extensión foliar en condiciones de invernadero, es que se analizaron parámetros de crecimiento de acuerdo con la metodología propuesta por Radford (1967) y Hunt (1981), en donde determina que la tasa máxima de crecimiento foliar (TCR) y la tasa de crecimiento relativo foliar (TCRF) en variedades de papa se alcanza a los tres meses. Tomando en cuenta los resultados de Borrego, 2000 es que se realiza la toma de muestra de plántulas productoras de dBGLs en condiciones de invernadero (Borrego, 2000).

La papa cultivada (*Solanum tuberosum* L.) es el cuarto cultivo más importante del mundo (FAOSTAT, 2012). Sin embargo, el cultivo de papa se ve afectado tanto por hongos (*Phytophthora infestans*); así como nematodos (*Meloidogyne spp*) (Hijmans, 2003 y Onkendi, 2012). Por otro lado, los glucosinolatos son degradados por las mirosinasas en una variedad de productos de hidrólisis, los cuales son responsables de la actividad biológica, cuando se produce daño a la planta. Los isotiocianatos son los productos de hidrólisis de glucosinolatos más comunes en la mayoría de plantas, sin embargo en otras son los nitrilos los que se encuentran en mayor proporción. Estos productos con actividad biológica, no fueron encontrados en *S.tuberosum* sin transformar así como en las plántulas en condiciones de invernadero. Sin embargo fueron detectados compuestos volátiles alifáticos característicos de las plantas de papa como 3-hexanol, 3hexen-1-ol, 2-hexenal y el alfa cariofileno en mayor proporción, los cuales también fueron encontrados y descritos como pertenecientes al género *Solanum* (Karlsson, 2009). En menor proporción se encontró los sesquiterpenos: α -cubebeno, copaeno y β -cubebeno.

La evaluación de bencilglucosinolato en plántulas de papa transformadas con los genes de biosíntesis de los glucosinolatos se

relaciona con la correcta inserción y cuantificación de la expresión de los genes. Experiencias con arroz, papa y trigo sugieren que un alto contenido de copias del transgén corresponden a niveles de expresión altos, indicando que los transgenes se están expresando eficientemente (Altpeter *et al.*, 2005). Sin embargo, el número de copias en las plántulas transformadas no fue determinado.

Cabe destacar que los tiempos de retención utilizando el equipo HPLC LaChrom D-7000 Hitachi–Merck, fue de 12,6 minutos, mientras que haciendo uso del HPLC Agilent 1200, fue 17 minutos. La diferencia en los tiempos de retención se debió a los programas de elución. La identificación del patrón de espectro UV del dBGL se llevó a cabo visualizando dos curvaturas a 212,6 nm y 222 nm. En la presente tesis se utilizó como control interno sinigrina (Hansen, 1995 y Moldrup, 2011). La sinigrina es un glucosinolato alifático al igual que el bencilglucosinolato, siendo su tiempo de retención 6,5 minutos. Para el cálculo de las concentraciones de dBGLs se utilizó el factor de recuperación generado por la diferencia entre el área de una concentración conocida del estándar analizado independiente y el área del mismo cuando es agregado a la muestra durante la extracción.

El ion molecular de dBGLs es 329 con H⁺ (330 m/z), con Na (352,1 m/z) y con K (368 m/z) (Matthaus *et al.*, 2000 y Moldrup *et al.*, 2011). Las masas MS encontradas en la presente tesis coinciden con las reportadas, como se pudo observar en la **Figura 24**.

La presencia de 168,3 m/z proviene de la pérdida de 162,1 m/z del ion molecular 330 m/z. La masa 162,1 m/z corresponde al grupo glucosil característico de los glucosinolatos (Matthaus *et al.*, 2000). Debido a que producto de una corrida sin parámetros de fragmentación se observa la pérdida del grupo glucosil, se postula que esta fragmentación espontánea de desulfobencilglucosinolato (330 m/z) es producto del flujo utilizado en el análisis HPLC/ESI /MS⁺ (1 ml/min).

De las cincuenta plántulas transformadas analizadas, veintiuno fueron capaces de producir de dBGLs y veintinueve de ellas no. La cantidad de picomoles de dBGLs producidas en hojas *in vitro* se encuentran en un rango promedio entre 0,81 y 5,18 pmol/mg; cantidad que no fue la esperada.

La transformación de *Nicotiana tabacum* utilizando genes de la biosíntesis de los glucosinolatos a excepción del gen de la enzima GGP1, generó una concentración de 0,1 ± 0,02 nmol/mg de peso fresco

(concentración superior las encontradas en la presente tesis). Luego de determinada la función potencializadora de la enzima GGP1, la cual estaría relacionada con el aumento de la concentración de BGLs en hojas de tabaco en condiciones de invernadero es que se agrega dicho gen al vector utilizado en la co – transformación de tabaco (Geu, 2008) así como en el presente estudio.

Posteriores experimentos en *Nicotiana tabacum* incluyendo este gen obtuvieron concentraciones de dBGLs mayores ($0,57 \pm 0,08$ nmol/mg por peso fresco) corroborando la acción potencializadora de GGP1 (Geu, 2009). Sin embargo esta acción potencializadora de síntesis de BGLs no se observó en plántulas transformadas en el presente estudio.

La diferencia entre los resultados puede deberse además por la metodología empleada. En experimentos con *N.tabacum* (Geu, 2008 y 2009) se utilizó la infiltración mientras que en la presente tesis se utilizó la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Mientras que plántulas transformadas de *S.tuberosum* presentan la inserción de dos vectores con dos promotores distintos (35S y rBsc); en *N.tabacum* se utilizó dos vectores con un sólo promotor, 35S (Geu, 2009).

Teniendo en cuenta los resultados de Geu, se realiza la transformación genética de *Nicotiana tabacum* incluyendo los seis genes involucrados en la biosíntesis de los glucosinolatos en un solo vector mediante agroinfiltración, obteniendo $1,58 \pm 0,16$ nmol/mg de peso fresco (Moldrup, 2011), resultados superiores a los reportados en la presente tesis y por Geu en el 2009.

Plántulas en condiciones *in vitro* está sujetas a estrés, por tanto se espera que en condiciones de invernadero se incremente la expresión de los transgenes. Esta premisa no fue evidenciada en los resultados del análisis LC-ESI-MS de las plántulas transformadas en condiciones de invernadero, donde se esperaba que la plántula GLS 1 obtenga mayores concentraciones de dBGLs que en condiciones *in vitro* (5,18 pmol/mg de peso fresco) sin embargo la concentración en condiciones invernadero fue menor (1,9 pmol/mg de peso fresco). Por otro lado, la plántula GLS 5, que en condiciones *in vitro* obtuvo una concentración de 2,39 pmol/mg de peso fresco, obtuvo en condiciones de invernadero una mayor concentración (4,5 pmol/ mg de peso fresco). No se logró determinar una relación entre la concentración de dBGLs entre las condiciones *in vitro* e invernadero. Sin embargo, las diferentes concentraciones presentadas en ambas condiciones puede deberse a que la regulación del metabolismo

de los glucosinolatos es sensible a varios factores ambientales. Los factores abióticos que afectan el metabolismo de glucosinolatos pueden ser la nutrición mineral, temperatura (Velasco *et al.*, 2007.), luz (Engelen-Eigles *et al.*, 2006), agua (Champoliver y Merrien, 1996), CO₂ (Schonhof *et al.*, 2007) y metales pesados.

Los factores de temperatura, luz, agua y CO₂ fueron controlados en ambas condiciones de desarrollo, sin embargo la presencia de nutrición mineral no fue evaluada en condiciones de invernadero pudiendo ser este uno de los factores que estarían implicados en el no aumento de la concentración de dBGLs.

Debido a que las infecciones con patógenos pueden cambiar los perfiles de glucosinolatos (Yan y Chen, 2007) es que se recomienda realizar experimentos de infección de plántulas con mayores concentraciones de dBGLs. Experimentos demostraron que cuando plantas de brócoli fueron sometidas a un bajo contenido de azufre o nitrógeno, los glucosinolatos disminuyen. Si existe carencia de azufre, la transcripción de muchos genes de la biosíntesis de glucosinolatos, así como los niveles de glucosinolatos se reducirán (Hirai *et al.*, 2004). La capacidad de respuesta del sistema de glucosinolatos-mirosinasa a una variedad de factores bióticos y abióticos lo hace útil para hacer frente

a muchas preguntas importantes sobre la evolución, la ecología y la señalización del metabolismo secundario de las plantas (Yan y Chen, 2007).

VI. CONCLUSIONES

1. Se generaron 21 plántulas de *S.tuberosum* co-transformadas con los genes *CYP79A2*, *CYP83B1*, *GGP1* y capacidad de producción de bencilglucosinolato.
2. Los genes que codifican para las enzimas *CYP79A2* y *CYP83B1* del citocromo P450 y para γ - glutamilpeptidasa1 (*GGP1*) implicados en la vía metabólica de los glucosinolatos derivados de fenilalanina, fueron incorporados en el ADN genómico de 56 plántulas co-transformadas, obteniéndose una eficiencia de regeneración de 1,01 % y una eficiencia de transformación de 96,49 %.
3. La concentración de dBGLS en las plántulas co-transformadas generadas *in vitro* se encuentran en el rango de 0,81 pmol/mg y 5,18 pmol/mg de peso fresco; mientras que en condiciones de invernadero la concentración de dBGLs se encuentra entre 0,5 y 4,5 pmol/mg de peso fresco, siendo el evento con mayor concentración GLS 5.
4. Las plántulas co - transformadas analizadas no presentan enzimas de tipo mirosinasa capaces de degradar los glucosinolatos.

VII. RECOMENDACIONES

1. Para poder obtener una buena cantidad de regenerantes utilizando el herbicida fosfinotricina es necesario transformar un gran número de explantes.
2. Si el material a transformar se encuentra contaminado no será posible la obtención de regenerantes positivos, la mayoría de estos serán escapes.

VIII. PERSPECTIVAS

1. Realizar el análisis metabolómico de las plántulas co-transformadas en condiciones de invernadero.
2. Realizar bioensayos con patógenos como Gorgojo de los Andes (*Premnotrypes spp.*) y con el agente del Tizón tardío, *Phytophthora infestans*.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altpeter, F., Baisakh, N., Beachy, R., Bock, R., Capell, T., Christou, P., Daniell, H., et al. (2005). Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding*, 15, 305-327.
- Banerjee, A., Prat, S., Hannapel, A. (2006). Efficient production of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L. ssp *andigena*) plant via *Agrobacterium* mediated transformation. *Plant Science*, 170, 1732-8.
- Baron, C., et al. (1997). VirB1, a component of the T-complex transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens* is processed to a C-terminal secreted product, VirB1. *Journal of Bacteriology*, 179, 1203-1210.
- Bayer. *Crop Science*. Technical information Glusifonate-ammonium (2005), 38.
- Beaujean, A., Sangwan, R., Lecardonnel, A., Sangwan – Norreel, B. (1998). *Agrobacterium* mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced intermodal explants: An efficient protocol of transformation. *Journal of experimental Botany*, 49 (326), 1589-95.

- Berger, D. (2000). Proceedings of the International Workshop on Transgenic potatoes for the benefit of resource-poor farmers in developing countries: Strategies for transgene pyramiding. 67-75.
- Bevan, M., Flavell, R., Chilton, M. (1983). A chimeric antibiotic resistance gene as selectable marker for plant cell transformation. *Nature*, 304, 184-186.
- Borrego, F., Fernández, J., López, A., Parga, V., Murillo, M., Carvajal, A. (2000). Análisis de crecimiento en siete variedades de papa (*Solanum tuberosum* L). *Agronomía Masoamericana*, 11(1), 145-149.
- Bowen, B. (1993). Markers for plant gene transfer. En: Kung SD y Wu R (Eds). *Transgenic Plants*, 1, 89-123.
- Brown, P., Tokuhsa, J., Reichelt, M., Gershenzon, J. (2003). Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 62, 471–481.
- Brudenell, A., Griffiths, J., Rossiter, D., Baker. (1999). The phloem mobility of glucosinolates. *Journal of Experimental Botany*, 50(335), 745–756.
- Casas, J. (1997). Cotransformación de *Solanum tuberosum* cv. Desiree con dos cepas distintas de *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis para

optar el grado de Biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima -Perú, pp.115.

- Champoliver, L., Merrien A. (1996). Effects of water stress applied at diverent growth stages to *Brassica napus* L. var. *oleifera* on yield, yield components and seed quality. *Europian Journal of Agriculture*, 5, 153-160.
- Christie, P. (1997). *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 179, 3085-3094.
- Citovsky, V., Warnick, D., Zambryski, P. (1994). Nuclear import of *Agrobacterium* VirE2 protein with single stranded DNA: implications for the T-DNA transfer process. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 3210-3214.
- De Block, M. (1987). Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *The EMBO Journal*, 6(9), 2513-2518.
- De Block, M. (1990). Factors Influencing the Tissue Culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Hybrid Aspen and Poplar Clones. *Plant Physiology*, 93(3), 1110-1116.

- De Block, M. (1993). The cell biology of plant transformation. Current state problems, prospect and the implications for the plant breeding. *Euphytica*, 71, 1-14.
- De Felipe, P., Lukega, H., Gani, D., Halpin, C., Ryan, M. (2006). E unun pluribus: multiple proteins from a self – processing poliprotein. *Trends Biotechnology*, 24, 68-75.
- De Framond AJ, Back EW, Chilton WS, Kayes L, Chilton M-D (1986). Two unlinked T-DNAs can transform the same tobacco plant cell and segregate in the F1 generation. *Mol Gen Genet* 202:125–131.
- De La Riva, G., González, J., Vásquez, R., Ayra, C. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 118-132.
- Depicker A, Herman L, Jacobs A, Schell J, Van Montague M (1985) Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to the *Agrobacterium*/plant cell interaction. *Mol Gen Genet* 201:477–484
- DePicker, A., Montagu, M. (1997). Post-transcriptional gene silencing in plants. *Cell Biology*, 9, 373-382.
- Díaz, M., Zappacosta, D., Franzone, P., Ríos, R. (2005). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Transformación genética. Ediciones INTA, Argentina (cap. 3, pp. 109-123).

- Engelen-Eigles, G., Holden, G., Cohen, J., Gardner, G. (2006). The effect of temperature, photoperiod, and light quality on gluconasturtiin concentration in watercress (*Nasturtium oycinale* R. Br.). *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 54, 328-334.
- Esparza, E. (2010). Metodología para el análisis rápido de metabolitos secundarios bioactivos de maca (*Lepidium meyenii* Walpers) Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias e Ingeniería especialidad Química .PUCP. Lima .Perú.
- Fernández, R., Menéndez, A. (2004). Efecto del herbicida glufosinato de amonio en diferentes explantes de *Coffea arabica* cv. *Catimor*. *Acta Científica Venezolana*, 55, 211-217.
- Finer, J., Cheng, T., Verma, D. (1996). Soybean Transformation: Technologies and Progress. In: Verma, D., Shoemaker, R. (Ed.) Soybean biotechnology. *Biotechnology in Agriculture*, 14, 249-263.
- Fraley, R., Rogers, S., Horsh, R., Sanders, P., Flinck, J., Adams, S., Bittner, M., et al. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Science*, 80, 4803-4810.
- Fullner, K., Lara, J., Nester, E. (1996). Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science*, 173, 1107-1109.
- Gallardo, J., Gómez, R., Tejeda, M., Posada, L., Herrera, I., Reyes, M., García, L., Freire, M. (2005). Dosis letal mínima del herbicida BASTA®

en plantas in vitro del híbrido de papaya IBP 42-99. *Biotechnología Vegetal*, 5(1), 51-53.

- Gelvin, S. (2003-a). *Agrobacterium* – mediated plant transformation: the biology behind the “Gene - Jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16-37.
- Gelvin, S. (2003-b). Improving plant genetic engineering by manipulating the host. *Trends in Biotechnology*, 21, 95-98.
- Geu-Flores, F. (2004). Purificación y caracterización de la enzima mirosinasa a partir de tubérculos de maca (*Lepidium meyenii* Walp.) Tesis para optar el título de licenciado en Química. *Pontificia Universidad Católica del Perú*.
- Geu-Flores, F., Morten, N., Majse, N., Morten, E., Carl, E., Mohammed, S., Barbara, A. (2009). Glucosinolate engineering identifies a γ -glutamyl peptidase. *Nature Chemical Biology*, 5, 8.
- Geu-Flores, F., Olsen, C., Halkier, B. (2008). Towards engineering glucosinolates into non-cruciferous plants. *Planta*, 229, 261-270.
- Ghislain, M. (2000). Traits and genes: Benefits and risks. Proceedings of the International Workshop on Transgenic potatoes for the benefit of resource-poor farmers in developing countries. Edición International Potato Center (CIP); Department for International Development (DFID). Manchester, United Kingdom, 87- 93.

- Ghislain, M., Golmirzaie, A. (1998). Genetic engineering for potato improvement. In: Khurana, P., Chandra R., Upadhy M. (eds.), *Comprehensive Potato Biotechnology*, MPH Publishing House India, pp 115-162.
- González, M. (2008). Tesis de Maestría: Transformación genética de *Solanum tuberosum* cv. Desireé por la introducción y expresión de los genes de la C-Slyasa, glucosiltransferasa y sulfotransferasa, y la producción indirecta de glucosinolatos. *Universidad Nacional Agraria La Molina*.
- Grau, A., Ortega, R., Nieto, C., Hermann, M. (2003). Mashua *Tropaeolum tuberosum*. *IPCGRI*, 23.
- Grubb, C., Abel, S. (2006). Glucosinolate metabolism and its control. *Trends Plant Science*, 11(2), 89-100.
- Halkier, B., Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 303-333.
- Halkier, B., Liangcheng, D. (1997). The biosynthesis of glucosinolates. *Trends in Plant Science*, 2, 425-431.
- Hansen, C., Du, L., Naur, P., Olen, C., Axelsen, K., et al. (2001). CYP83B1 is the oxime- metabolizing enzyme in the glucosinolate pathway in Arabidopsis. *Biology*, 276, 24790-96.

- Hansen, M., Moller, P., Sorensen, H. (1995). Glucosinolates in Broccoli Stored under Controlled Atmosphere. *Horticulture Science*, 120(6), 1069-1074.
- Herrera-Estrella, L., De Block, M., Van Montagu, M., Schell, J. (1983). Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid derived vector. *Nature*, 303, 209-211.
- Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., Wang, J. (1990). A bacterial peptide actin o as a plant nuclear targeting signal: the aminoterminal portion of *Agrobacterium virD2* protein directs a-glucoronidase fusion protein into tobacco nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87, 9534-9537.
- Hijmans, R. (2003). The effect of climate change on global potato production. *American Journal of Potatoes*, 80, 271-280.
- Hirai, M., Klein, M., Fujikawa, Y., Yano, M., Goodenowe, D., *et al.* (2005). Elucidation of gene and metabolite – to – gene networks in Arabidopsis by integration of metabolomics and transcriptomics. *Biology*, 280, (25590-95).
- Hirai, M., Yano, M., Goodenowe, D., Kanaya, S., Kimura, T., Awazuhara, M., Arita, M., Fujiwara, T., Saito, K. (2004). Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global

responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101, 10205-10210.

- Hooykass, P., Schilperoot, R. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*, 19, 15-38.
- Howard, E., Citovsky, V. (1990). The emerging structure of the *Agrobacterium* T-DNA transfer complex. *Bioassays*, 12, 103-108.
- Hull, A., Vij, R., Celenza, J. (2000). Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97(5), 2379-84.
- International Potato Center. Potato. Obtenida el 05 de Abril del 2010, <http://cipotato.org/potato>.
- Iqbal, M., Mollers, C. (2003). Uptake and distribution of sinigrin in microspore derived embryos in *Brassica napus* L. *Plant Physiology*, 160, 961-66.
- Jin, H., Chandrasekhar, T., Lee, H., Kim, K. (2007). Production of herbicide-resistant transgenic sweet potato plants through *Agrobacterium tumefaciens* method. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 91, 235-242.
- Karlsson, M., Birgersson, O., Cotes, A., Bosa, F., Bengtsson, M., y Witzgall P. (2009). Plant Odor Analysis of Potato: Response of

Guatemalan Moth to Above- and Belowground Potato Volatiles. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5903–5909.

- Kjser, A.; Ogaard, Maeda, Y. (1978). Seed volatiles within the family Tropaeolaceae. *Phytochemistry* 17 (8): 1285- 1297.
- Kliebenstein, D.J. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. *Plant Cell and Environment* 27(6):675-684.
- Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N., Kumashiro, T. (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J* 10:165–174
- Larkin, K.M. (2001). Optimization of soybean transformation using SAAT and GFP. Wooster: OARDC/OSU. pp. 126. (Thesis - Master).
- Lessard, Philip A.; Kulaveerasingam, H.; York G.M.; Strong, A. y Sinskey, A.J. (2001). Manipulating Gene Expression for the Metabolic Engineering of Plants. *Metabolic Engineering* 4,67–79
- Matthaus, B.;Luftmann H.(2000) Glucosinolates in members of the family Brassicaceae: Separation and Identification by LC/EXI-MS-MS. *Agric. Food Chem* (48), 2234-2239

- McKnight, T.D.; Lillis, M.T., Simpson, R.B. (1987) Segregation of genes transferred to one plant cell from two separate *Agrobacterium* strains. *Plant Mol Biol* (8), 439–445.
- Medina, F.; Wright, R.; Funk, V.; Sentz, D.; *et al.* (2003) A nontoxic lectin for antigen delivery of plant-based mucosal vaccines. *Vaccine* 21(9), 997-1005.
- Mello - Farias, P.; Soares, A. (2008). Advances in *Agrobacterium* mediated plant transformation with emphasis on soybean. *Science Agriculture V.* 65(1), 95-106.
- Mifflin, B. (2000).Crop Biotechnology. Where Now? *Plant Physiology*, Vol. 123, 17–27.
- Mikkelsen M.D.; Hansen Ch.; Wittstock U.; Halkier B. (2000). Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J Biol Chem*, 275(43), 33712-7.
- Møldrup, E.; Geu-Flores F.; Olsen, C.; Halkier, B. (2011). Modulation of sulfur metabolism enables efficient glucosinolate engineering. *BMC Biotechnology* , 11:12
- Morant, A.; Jorgensen, B.; Dam, W.; Olsen, C.; Moller, B; Bak, S. (2007). Lessons learned from metabolic engineering of cyanogenic glucosides. *Metabolomics* 2, 383-398.

- Newel, C.; Rozman, R.; Hinchee, E.C.; Lawsow, C.; Sanders, P.; Tumer, N.E.; Horsch, R.B.; Fraley, R.T. (1991). *Agrobacterium* mediated transformation of *Solanum tuberosum* L. cv. "Russet Burbank". *Plant Cell Reports* 10, 30-34.
- Newell, C.A. (2000). Plant transformation technology. Developments and applications. *Mol Biotechnol* 16, 53–65.
- Ñopo, L.; Ghislain, M. (2003). Applied Biotechnology Laboratory Protocols: *Agrobacterium* – mediated Transgenic Plants: Production, Selection, *Testing* 1-57.
- Ochoa, C. (1999). Las papas de Sudamérica: Perú. Editorial Allen Press, EE.UU. 1036.
- Okendi, E. (2012). Molecular characterization of root knot nematodes (*Meloidogyne spp.*) parasitizing potatoes (*Solanum tuberosum*) in South Africa. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae en Microbiología. Universidad de Pretoria. África.
- Opabode, J. (2006). *Agrobacterium*- mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 1 (1), 12-20.
- Ottaviani, M.P.; Hänisch Ten Cate C.H. (1991). Cotransformation and differential expression of introduced genes into potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. *Bintje*. *Theor Appl Genet*.81(6), 761-8.

- Pérez, Jb (2000). Development and application of *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation to increase fungus resistance in banana (*Musa* spp.). Ph. D. Thesis, K. U. Leuven, Belgium.
- Rask, L.; Andreasson, E.; Ekbom, B.; Eriksson S.; Pontoppidan B., Y Meijer J. (2000). Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol Biol* 42, 93–113.
- Rivera, C. (2003) Transformación genética de *Solanum tuberosum* L. variedades Amarilis- INIA y Desireé con genes codificantes para proteínas antifúngicas. Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología. Universidad Ricardo Palma. Lima – Perú.
- RIVRO. (Instituto nacional de investigación de variedades de plantas cultivadas). (1989). Catálogo Holandés de variedades de patata. Wageningen. pp.83.
- Schonhof I.; Klaring H.; Krumbein A.; Schreiner M. (2007). Interaction between atmospheric CO₂ and glucosinolates in broccoli. *J Chem Ecol* 33, 105–114.
- Schrott, M. (1995). Selectable maker and reporter genes. En:Potryjus I y Spangenberg G (Eds). *Gene Transfer to Plants*, 325-336.
- Sheng, J.; Citovsky, V. (1996). *Agrobacterium*-plant cell interaction: Have virulence proteins - will travel. *Plant Cell*. 8, 1699–1710.

- Siemens, D., Mitchell-Olds, T. (1998). Evolution of pest-induced defenses in *Brassica* plants: tests of theory. *Ecol* 79,632–646-
- Soto, N.; Enríquez, A.; Ferreira, A.; Corrada M.; Fuentes A.; Tiel K. Y Pujol M. (2007). Transformación eficiente de segmentos de tallos de papa variedad Désirée utilizando fosfinotricina como marcador de selección. *Biotechnología Aplicada*; 24,132-138.
- Spooner D.; Núñez J.; Trujillo G.; Herrera M.; Guzmán F.; Ghislain M. (2007). Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(49), 19398-19403.
- Storey, M. (2009). The harvested crop. en Singh J., Kaur L, eds. *Advances in potato chemistry and technology* USA. 441-470.
- Thompson, C.J.; Moval, R.; Tizard R.; Cramer R.; Davies J.E.; Lauwereys M. y Botterman J. (1987). Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygrosopicus*. *The EMBO Journal* 6(9), 2519-2523.
- Todd, R.; Tague, B. (2001). Phosphomannose isomerase: a reversible selectable marker for *Arabidopsis thaliana* germ-line transformation. *Plant Molecular Biology Reporter* 19,307-309.

- Trujillo, C.; Rodríguez- Arango, E.; Jaramillo, S.; Hoyos, R.; Orduz, S. y Arango, R. (2001). One step transformation of two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena*). *Plant Cell Reports* 20,637-41.
- Tzfira, T. y Citovsky, V. (2000). From host recognition to T-DNA integration: the function n of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology* 1(4), 202-212.
- Tzfira, T.; Jianxiong L.; Benoit, L.; Citovsky, V. (2004). *Agrobacterium* T-ADN integration: molecules and models. *Trends in Genetics* 20(8),375-384.
- Tzfira, T.; Vaidya, M., Citovsky, V. (2002) (a) Increasing plant susceptibility to *Agrobacterium* infection by overexpression of the *Arabidopsis* VIP1 gene. *Proc Natl Acad Sci*; 99, 10435–10440.
- United Nations Food and Agriculture Organization (FAOSTAT) Agricultural Data. Agricultural production, crops, primary. Obtenida el 26 de Abril del 2013, <http://faostat3.fao.org/home/index.html>.
- Valderrama, A.; Arango, R. (2005). Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: “Ingeniería genética natural aplicada”. *Rev.Fac.Nal.Agr.*58(1),2569-2585.

- Van Boxtel, V. J.; Eskes, A. y Berthouly, M. (1997). Glufosinate as an efficient inhibitor of callus proliferation in coffee tissue. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant*33, 6-12.
- Van Wordragen, M.; Dons, H. (1992). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of recalcitrant crops. *Plant Molecular Biology Reporter* 10 (1), 12-36.
- Velasco, P.; Cartea, M.E., González, C.; Vilar, M., Ordas, A. (2007). Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea acephala* group) *J. Agric. Food Chem.*55,955–962.
- Walden, R.; Wingender. (1995). Gene transfer and plant regeneration. *Trends in Biotechnology* 13(9), 324–331.
- Wenqui, C.; Gonsalves, C.; Tennant, T.; Fermin, G.; Souza, M Jr; Sarindu, N; Jan, F. ; Zhu, H.; Gonsalves, D. (1999). A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 35, 61 – 69.
- Yan, Xiufeng; Chen, Sixue. (2007). Regulation of plant glucosinolate metabolism. *Planta* 226, 1343–1352.
- Zambrano, V. (1994). Uso de *Agrobacterium rhizogenes* para introducir genes sintéticos que confieren resistencia a enfermedades bacterianas en papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis para optar el grado de Magister

en Scientiae. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima- Perú. pp. 10.

- Zhang, Z.; Xing A.; Staswick P. & Clemente T.E. (1999). The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56, 37–46.
- Zupan, J. y Zambryski, P. (1997).The *Agrobacterium* DNA transfer complex. *Critical Review Plant Science* 16, 279-295.
- Zupan, J.; Muth, T.; Draper, O. And Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* 23 (1) 11-28.

X. ANEXOS

Anexo 1: Medios de Cultivo

A. Medios de cultivo bacteriano

- Medio LB (Luria-Broth)

Compuesto	Cantidad por 1 Litro (g)
Extracto de Levadura	5
Triptona	10
Cloruro de sodio	10
Agar*	15

Ajustar a pH 7 y autoclavar. (*) Solo para medio semi-sólido.

Fuente: Nopo *et al.*, 2003.

B. Medios de Cultivo de tejidos vegetales

- Medio MSA (Propagación)

Compuesto	Cantidad por 1 Litro
Sales Murashige & Skoog	4,3 g
Solución base MSA	5,0 mL
Sucrosa	25,0 g
Phytigel	3,0 g

Fuente: Nopo *et al.*, 2003.

- Solución Base MSA

Compuesto	Cantidad por 1 Litro(g)
Ácido Giberélico	0,020
Glicina-HCl	0,600
Acido Nicotínico	0,150
Piridoxina	0,150
Tiamina-HCl	0,012

Ajustar a pH 5,6 y esterilizar por filtración.

Fuente: Nopo *et al.*, 2003.

C. Medios utilizados en el Protocolo de Transformación

- Medio MS-Sucrosa (Co-cultivo)

Compuesto	Cantidad por 1 Litro (g)
Sales Murashige & Skoog	4,6
Sucrosa	25,0
Phytigel	3,0

Ajustar el pH 5,6 y autoclavar.

Fuente: Nopo *et al.*, 2003.

- Medio Willmitzer (Regeneración)

Compuesto	Cantidad por 1 Litro
Sales Murashige & Skoog	4,6 g
Sucrosa	25,0 g
Phytigel	3,0 g
Ácido Giberélico (1000 mg/L)*	0,020 mL
Ácido Naftaleno acético (1000 mg/L)*	0,020 mL
Ribósido de Zeatina (1000 mg/L)*	2,0 mL
Carbenicilina (200 000 mg/L)*	1,250 mL

Ajustar a pH 5,6 y autoclavar. * Las vitaminas, hormonas y antibióticos se agregan luego de autoclavar.

Fuente: Nopo *et al.*, 2003.

Anexo 2. Preparación de soluciones stock: hormonas, vitaminas, herbicida y antibiótico. Ñopo *et al.*, 2003.

- **Acido naftalenacético (ANA; 1000 mg/L)**

Disolver 10 mg en 2 gotas de KOH 1 N. Agregar agua destilada hasta completar a volumen final de 10 mL. Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C.

- **Ácido giberélico (AG₃; 1000 mg/L)**

Disolver 10 mg en 2 gotas de etanol 100 %. Agregar agua destilada hasta completar un volumen de 10 mL. Esterilizar por filtración y almacenar a -20 °C.

- **Ribósido de zeatina (Zea; 1000 mg/L)**

Disolver 10 mg en 2 gotas de KOH 1 N. Agregar agua destilada para un volumen final de 10 mL. Esterilizar por filtración y almacenar a -20 °C.

- **Carbenicilina (200 000 mg/L)**

Disolver 1 g en 5 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración. Almacenar a -20 °C.

- **Vitaminas GAP (1000X)**

Compuesto	Cantidad por 1 Litro
Acido nicotínico	500 mg
Piridoxina	500 mg
Glicina	2 g

Esterilizar por filtración, almacenar a -20 °C.

Fuente: Ñopo *et al.*, 2003.

- **Fosfinotricina (PPT; 1000 mg/L)**

Disolver 10 mg en 10 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración y almacenar a -20 °C.

- **Kanamicina (Km; 100 000 mg/L)**

Disolver 1 g en 10 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración. Almacenar a -20 °C.

Anexo 3. Protocolos de extracción

A. Extracción de ADN plasmídico de *E.coli* y *A.tumefaciens* con el KIT Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System

1. Inocular una colonia de *A. tumefaciens* (conteniendo el plásmido de interés) en 1 - 10 mL de medio LB líquido el cual debe contener el antibiótico de selección adecuado. Incubar durante 2 días a 28 °C y 250 rpm de agitación.
2. Obtener el pellet de 1 - 10 mL de medio del cultivo bacteriano en tubos de 2 mL centrifugando por 5 minutos a 13 000 rpm y descartando el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet en 250 µL de Cell Resuspensión Solution (Adicionar lisosima en el caso de *A. tumefaciens*).
4. Agregar 250 µL al de Cell lysis Solution y mezclar por inversión 4 veces.
5. Agregar 10 µL de Alkaline Protease Solution, mezclar por inversión 4 veces. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Agregar 350 µL de Neutralization Solution, mezclar por inversión 4 veces y centrifugar 10 minutos a 13 000 rpm a temperatura ambiente.

7. Decantar el lisado dentro de la columna.
8. Centrifugar 1 minuto a temperatura ambiente. Descartar el flowthrough y reinsertar la columna en el tubo.
9. Agregar 750 μL de Wash Solution y centrifugar un minuto. Descartar el sobrenadante y reinsertar la columna en el tubo.
10. Repetir el paso 9, utilizando 250 μL de Wash Solution. Centrifugar 2 minutos.
11. Trasladar la columna a un tubo estéril de 1,5 mL.
12. Agregar 100 μL de Nuclease - free Water en la columna. Centrifugar 1 minuto a temperatura ambiente.
13. Descartar la columna y conservar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B. Extracción de ADN vegetal a pequeña escala

1. Colocar 2 hojas de plántulas crecidas *in vitro* (aproximadamente 25 mg) en un microtubos de 2 mL y colocar una esfera de tungsteno esterilizada. Tip: La mejor calidad de ADN es obtenida del tercio superior de la planta.
2. Agregar 250 μL de tampón de extracción (CTAB2X) y 2 μL de 2-mercaptoetanol.

3. Colocar los tubos tapados en el equipo de trituración (Savant FastPrep), asegurar los tubos y moler por 20 segundos a 4 m/s.
4. Incubar las muestras a 65 °C por 20 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente por 20 minutos.
5. Agregar 900 µL de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y mezclar suavemente con vortex.
6. Centrifugar a 14 000 rpm por 5 minutos.
7. Cuidadosamente trasladar la fase acuosa a un microtubo de 1,5 mL.
8. Añadir 0.6 volúmenes de isopropanol a -20°C. Mezclar suavemente por inversión.
9. Dejar precipitar el ADN a -20 °C por 1 hora o -70 °C por 20 min.
10. Centrifugar a 14 000 rpm por 5 minutos.
11. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet por 5 minutos colocando los tubos invertidos sobre un papel toalla.
12. Lavar el ADN con 1 mL de etanol al 70 % y resuspender suavemente.
13. Centrifugar a 14 000 rpm por 5 minutos.
14. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet colocando los tubos invertidos sobre un papel toalla.
15. Disolver el pellet en 30 µL de agua libre de nucleasas o tampón TE.
16. Conservar el ADN a -20 °C.

D. Extracción de glucosinolatos. Gonzáles, 2008.

Día 1

-Preparación de placas de 96 pozos con filtros con matriz DEAE:

Agregar 75 μL matriz DEAE (Dietilaminoetil), la cual permitirá atrapar los glucosinolatos, en placas de 96 pozos con filtros (MAHVN 4550, Millipore) y agregar 100 μL de H_2O miliQ y encender la bomba de vacío, luego colocar 300 μL de agua miliQ y dejar reposar por 2 horas, una vez cumplido el tiempo encender la bomba de vacío para eliminar el agua.

-Extracción de Glucosinolatos de líneas transgénicas de papa

1. Cortar aproximadamente 200 mg de hojas de plantas propagadas en magentas. Tomar el peso exacto del material vegetal (este peso será relacionado luego con la producción de BGLS en pmoles/mg de muestra).
2. Colocar las muestras en tubos de eppendorf de 2 mL, además de una esfera de tungsteno, agregar 400 μL de metanol al 85 % [el metanol debe contener un internal standard ej. sinigrin 0,020 mM

metanol debe contener un internal standard ej. sinigrin 0,020mM (concentración final en el metanol) para resultados más consistentes] a cada una de las muestras y tapar los tubos.

3. Moler las muestras 20 segundos 40 veces/segundo en el equipo FastPrep.
4. Colocar en agitación a 150rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar por 10 minutos a 3341xg
6. Colectar 150µL del sobrenadante y colocarlo en las placas de 96 pozos con filtros en la cual se ha colocado previamente la matriz DEAE, encender la bomba de vacío por 2 a 4 segundos. Repetir este paso una vez más.
7. Luego agregar 100µL de metanol al 70% y encender la bomba de vacío, repetir este paso una vez más.
8. Agregar 100µL de agua miliQ y encender la bomba de vacío, repetir este paso una vez más (no dejar que la matrix DEAE se seque).
9. Colocar papel toalla debajo de la placa para retirar el exceso de agua (no dejar que la matrix DEAE se seque).
10. Agregar de 30µL de sulfatasa purificada, sellar los pozos con adhesivo y dejar por toda la noche a temperatura ambiente.

Día 2

11. Colocar la placa de tubos colectores (MAHVN4550, Milipore) debajo de la placa de 96 pozos con filtros y agregar 100 μ L de agua miliQ y encender la bomba de vacío. Repetir este paso una vez más.
12. Traspasar las muestras a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.
13. Enfriar las muestras en nitrógeno líquido y colocarlas en el equipo SpeedVac Plus hasta eliminar el agua (de 2 a 3 horas aproximadamente).
14. Resuspender en 50 μ L de agua miliQ.
15. Conservar las muestras de desulfoglucosinolatos a -20 °C.

Anexo 4. Solución para extracción de ADN.

- **Tampón de extracción (CTAB 2x)**

Compuesto	Cantidad por 1Litro
Tris-HCl	100,00 mL
EDTA	50,00 mL
NaCl	81,82 g
CTAB(*)	20,00 g
PVP	10,00 g

gar en caliente. Autoclavar.

Fuente: Nopo *et al.*, 2003.

(*)Agre

Anexo 5. Soluciones de tinción, geles de agarosa y tampones

- **SALB10X**

Compuesto	Cantidad
Azul de Bromo fenol	0,15 g
Xilencianol	0,15 g
Naranja G	0,20 g
Sucrosa	60,00 g
TBE 10X	5,00 mL

Diluir en 10 mL de agua miliQ y una vez diluidos los componentes, llevar a un volumen final de 100 mL.

Fuente: Ñopo *et al.*, 2003.

- **Gel Red**

Utilizar en una dilución 1:4 (utilizar agua DEPC para la dilución).

- **Solución 10X-GelRed**

Compuesto	Para 50 rx
Gel Red 1:4	6,5 μ L
SALB1X	100 μ L

Fuente: Ñopo *et al.*, 2003.

- **Geles de agarosa 1%**

Compuesto	Volumen del gel		
	40 mL	100 mL	250 mL
TBE 1X	40 mL	100 mL	250 mL
Agarosa	0,4 g	1 g	2,5 g

Fuente: Ñopo *et al.*, 2003.

- **TBE10X**

Compuesto	Cantidad por 1Litro
Tris base	180,00 g
EDTA 0,5 M, pH 8,0	40,00 mL
Ácido bórico	55,00 g

Ajustar a pH 8,3 y autoclavar.

Fuente: Nopo *et al.*, 2003.

- **Buffer acetato de sodio 20 mM pH 5,0 (100 mL)**

Compuesto	Cantidad 100mL
Na-acetato o	0,16 g
Na-acetato 3H ₂ O	0,272 g
Agua miliQ	75 mL

Ajustar a pH 5.0 con ácido acético.

Llevar el volumen hasta 100 mL.

Fuente: Nopo *et al.*, 2003.

- **Buffer MES 0,02 M**

Compuesto	Cantidad 100mL
MES	1,952 g
Agua miliQ	500 mL

Ajustar a pH 5,2.

Fuente: elaboración personal.

Anexo 6: Purificación de sulfatasa por precipitación con etanol

1. Pesar 70 mg de sulfatasa (Sulfatase de *Helix pomatia* Type H1, Sigma 9626) en un tubo falcon de 15 mL y añadir 3 mL H₂O de agua miliQ. Tratar de minimizar la formación de espuma.
2. Añadir 3 mL de EtOH absoluto y mezclar.
3. Centrifugar a 4000 g a temperatura ambiente por 20 minutos.
4. Decantar el sobrenadante en un segundo tubo falcon de 15 mL y descartar el precipitado.
5. Añadir 9 mL de EtOH absoluto al sobrenadante, mezclar y centrifugar a 4000 g, a temperatura ambiente por 15 min. Esta vez, descartar el sobrenadante y mantener el precipitado.
6. Disolver el precipitado en 5 mL del buffer acetato de sodio 20 mM, pH 5.
7. Diluir la solución de sulfatasa 1:50 con el buffer acetato de sodio 20 mM pH 5 y dividir en alícuotas de 1 mL. Conservar a -20 °C.

Para el caso de la evaluación en invernadero:

1. Pesar 0,5 g de sulfatasa y añadir 15 mL de agua y 15 mL de etanol.

2. Centrifugar a 3000 g por 20 min temperatura ambiente, descartar el precipitado y se colecta el sobrenadante (25 mL aprox.).
3. Añadir 45 mL de etanol frío, centrifugar en las mismas condiciones, descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 9 mL de agua.

Anexo 7: FRAGMENTACIÓN DE dBGLs

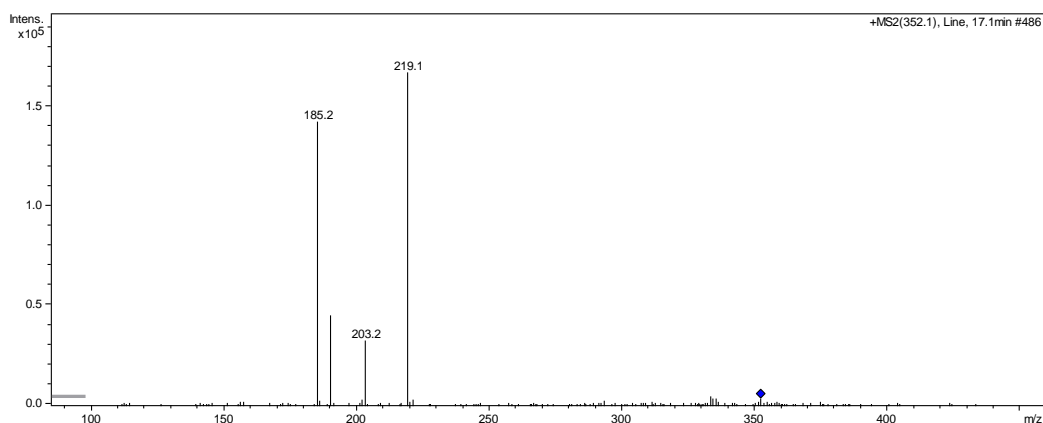


Figura 27: Fragmentación de dBGLs en LC-ESI-MS de *Solanum tuberosum* cv. Desiree (Construc.3+ pRBsc:ORF1.3) - GLS 1, donde se observa la fragmentación de $[M+Na]^+$ 352,1 Da en m/z : 219,1; 185,2; 189,8; 203,1.

Fuente: elaboración personal.

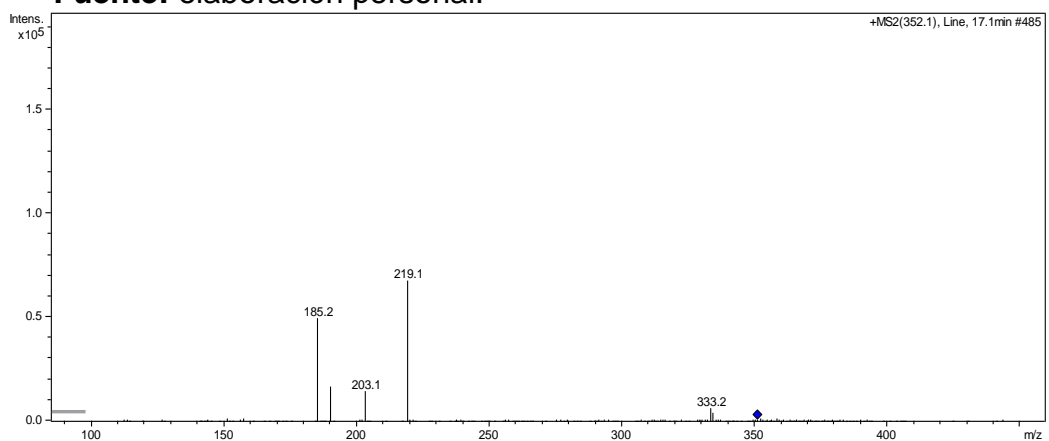


Figura 28: Fragmentación de dBGLs en LC-ESI-MS de *Solanum tuberosum* cv. Desiree (Construc.3+ pRBsc:ORF1.3) – GLS 4 ; donde se observa la fragmentación de $[M+Na]^+$ 352,1 Da en m/z : 219,1; 185,2; 189,8; 203,1.

Fuente: elaboración personal.

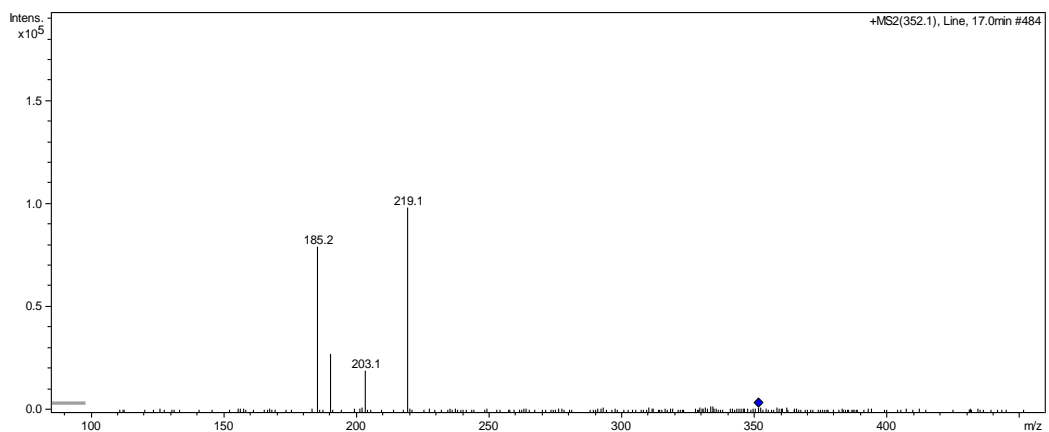


Figura 29: Fragmentación de dBGLs en LC-ESI-MS de *Solanum tuberosum* cv. Desireé (Construc.3+ pRBsc:ORF1.3) - GLS 6 ; donde se observa la fragmentación de $[M+Na]^+$ 352,1 Da en m/z : 219,1; 185,2; 189,8; 203,1.

Fuente: elaboración personal.

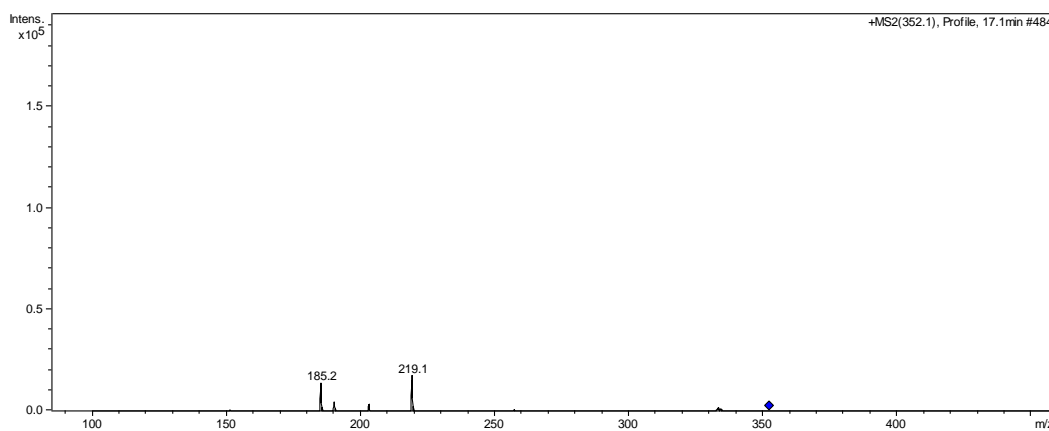


Figura 30: Fragmentación de dBGLs en LC-ESI-MS de *Solanum tuberosum* cv. Desireé (Construc.3+ pRBsc:ORF1.3) - GLS 8; donde se observa la fragmentación de $[M+Na]^+$ 352,1 Da en m/z : 219,1; 185,2; 189,8; 203,1.

Fuente: elaboración personal.

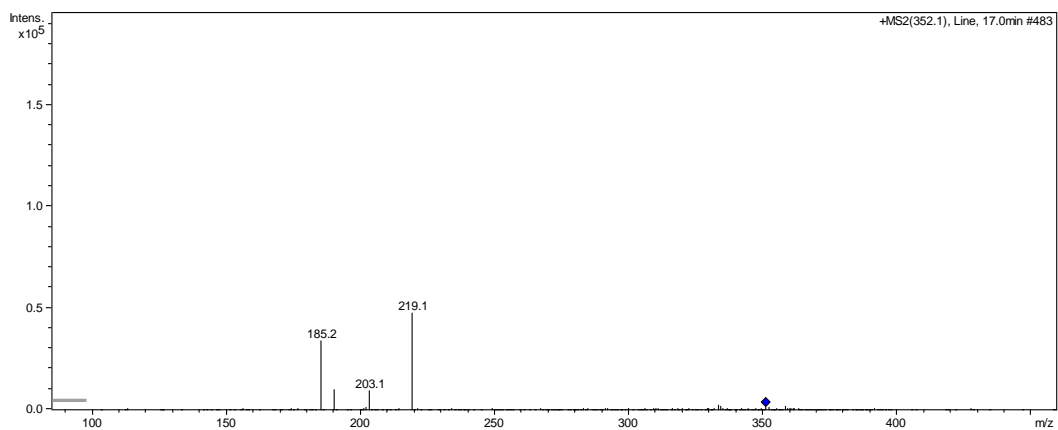


Figura 31: Fragmentación de dBGLs en LC-ESI-MS de *Solanum tuberosum* cv. Desireé (Construc.3+ pRBsc:ORF1.3) - GLS 9 ; donde se observa la fragmentación de $[M+Na]^+$ 352,1 Da en m/z : 219,1; 185,2; 189,8; 203,1.

Fuente: elaboración personal.

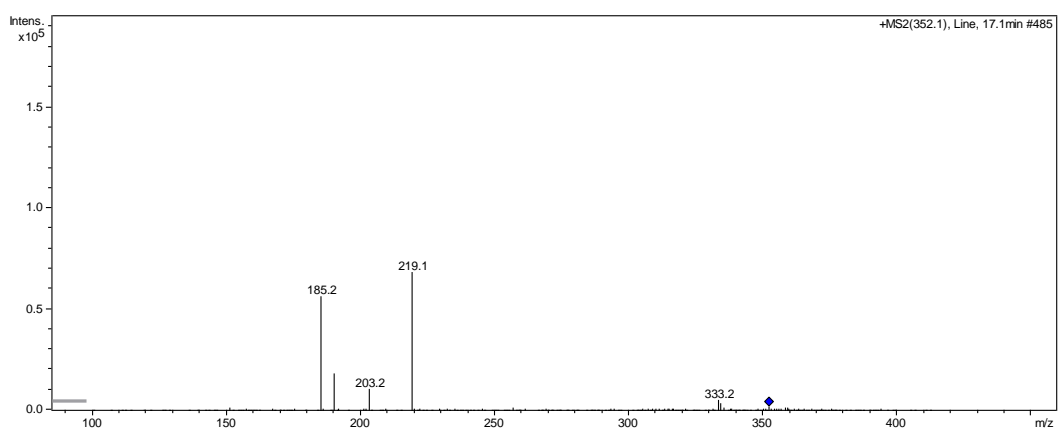


Figura 32: Fragmentación de dBGLs en LC-ESI-MS de *Solanum tuberosum* cv. Desireé (Construc.3+ pRBsc:ORF1.3) - GLS 10; donde se observa la fragmentación de $[M+Na]^+$ 352,1 Da en m/z : 219,1; 185,2 ; 189,8; 203,1.

Fuente: elaboración personal.

Anexo 8: Cromatogramas GC-MS

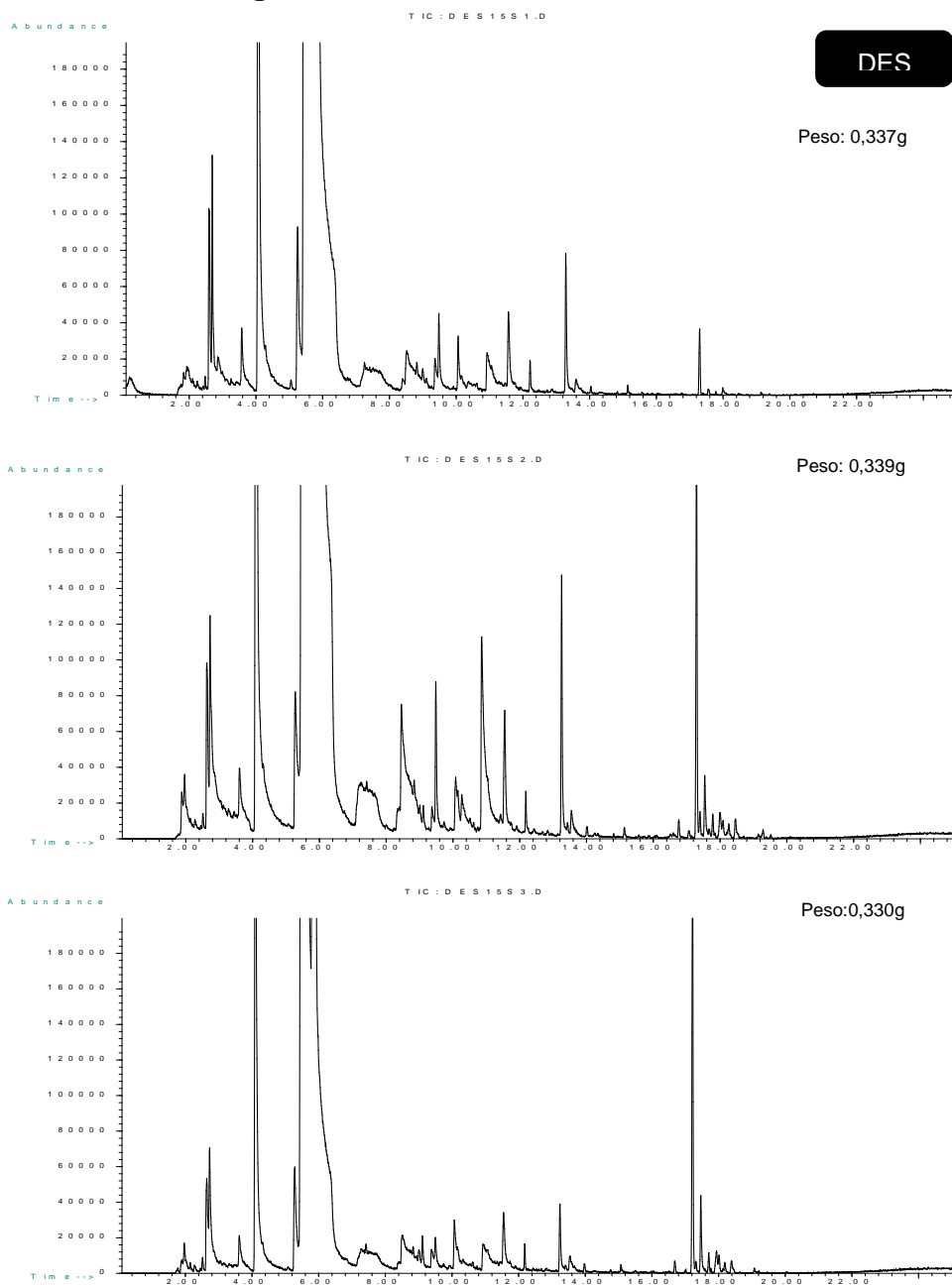


Figura 34: Cromatogramas GC-MS de *Solanum tuberosum* cv. Desiree por triplicado.

Fuente: elaboración personal.

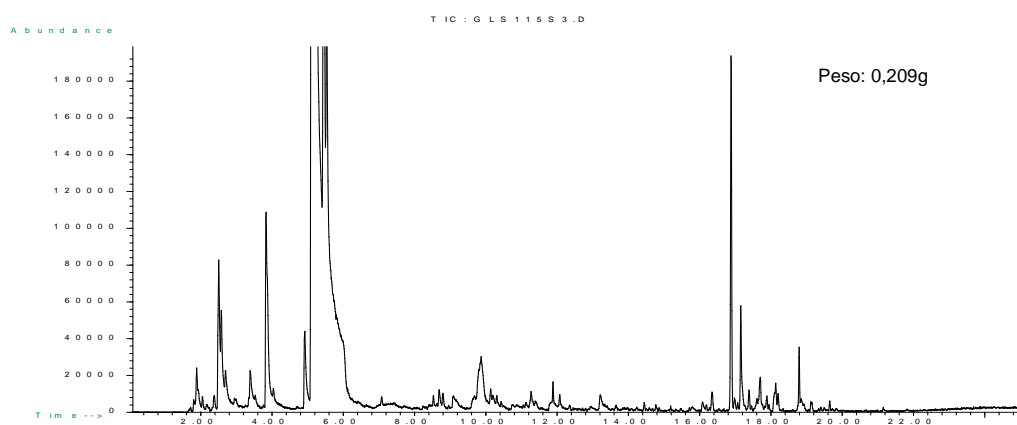
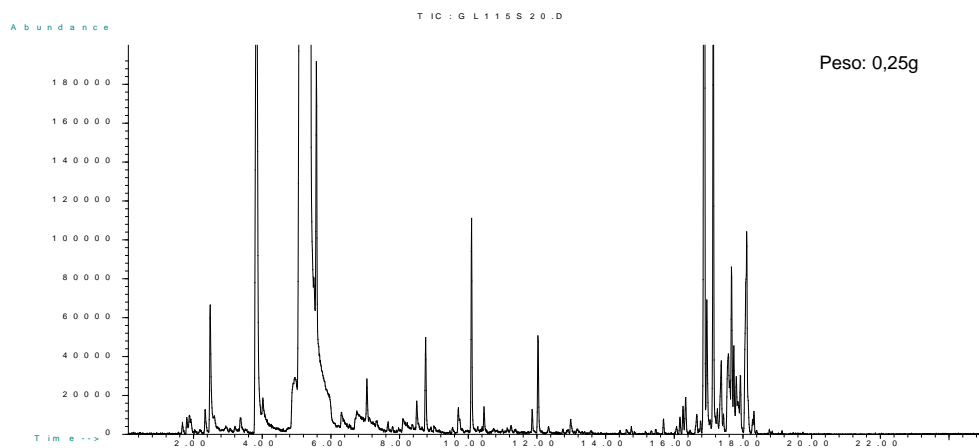
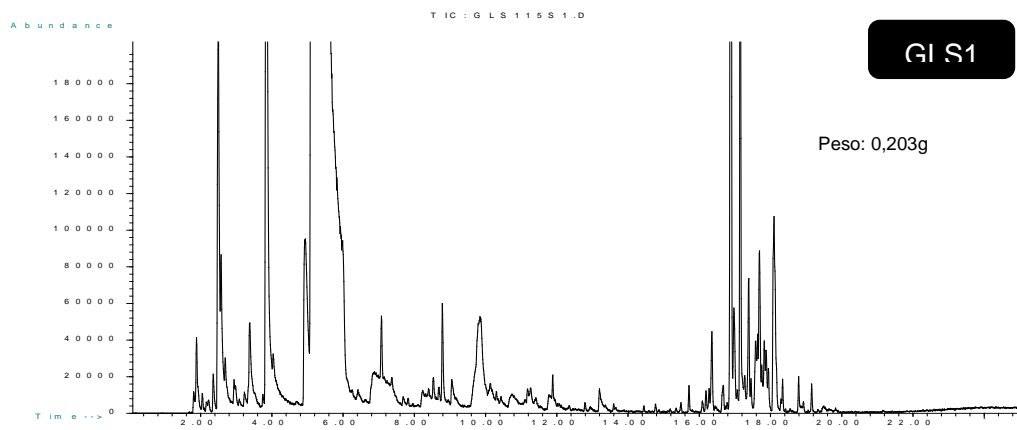


Figura 35: Cromatogramas GC-MS del GLS 1, por triplicado.
Fuente: elaboración personal.

Anexo 9: Tablas suplementarias

Tabla 14: resultados de análisis HPLC de eventos en condiciones *in vitro*.

Numeración	Código de evento	Exp. de Transformación	Resultado HPLC
1	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]1	1	Neg.
2	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]2	1	Pos.
3	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]4	1	Pos.
4	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]5	1	Neg.
5	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]6	3	Neg.
6	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]7	2	Neg.
7	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]9	3	Neg.
8	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]10	1	Neg.
9	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]11	3	Pos.
10	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]12	1	Pos.
11	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]13	1	Neg.
12	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]14	1	Neg.
13	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]15	1	Neg.
14	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]16	1	Pos.
15	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]17	3	Pos.
16	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]18	1	Neg.
17	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]19	2	Neg.
18	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]19,2	2	Neg.
19	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]22	1	Neg.
20	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]23	1	Pos.
21	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]24	1	Pos.
22	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]25	1	Neg.
23	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]26	1	Pos.
24	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]27	2	Pos.
25	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]29	4	Neg.

26	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]30	1	Neg.
27	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]31	1	Pos.
28	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]32	4	Neg.
29	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]34	4	Neg.
30	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]38	1	Neg.
31	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]41	1	Neg.
32	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]42	4	Pos.
33	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]43	4	Pos.
34	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]45	4	Pos.
35	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]46	3	Pos.
36	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]47	4	Pos.
37	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]48	4	Neg.
38	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]49	2	Pos.
39	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]50	3	Neg.
40	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]51	4	Neg.
41	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]52	4	Pos.
42	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]53	4	Pos.
43	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]57	2	Neg.
44	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]59	3	Neg.
45	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]60	4	Pos.
46	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]61	4	Neg.
47	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]62	3	Neg.
48	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]66	5	Pos.
49	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]69	4	Neg.
50	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBS:ORF1.3]71	2	Neg.

Fuente: elaboración personal.

Tabla 15: Producción promedio de dBGLs (pmol/g) de eventos en condiciones *in vitro*.

Numeración	Evento	Promedio (pmol/g)	Mediana	Número de repeticiones evaluadas
1	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]26	51,827	4,569	12
2	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]11	32,176	2,039	6
3	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]27	27,529	1,981	7
4	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]23	27,489	2,424	9
5	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]45	26,848	2,286	5
6	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]16	23,888	1,975	10
7	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]31	23,774	1,525	10
8	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]42	23,518	1,883	5
9	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]4	19,102	1,931	11
10	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]24	18,800	1,602	7
11	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]47	18,019	1,838	5
12	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]53	16,920	1,669	10
13	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]52	16,516	1,546	10
14	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]12	15,709	1,157	9
15	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]49	15,658	1,531	8
16	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]2	14,040	1,308	5
17	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]66	13,661	0,898	9
18	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]43	10,087	0,995	4
19	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]17	0,9977	0,781	7
20	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]46	0,9437	0,853	4
21	Desiree[SUR1:GT:ST+pRBSc:ORF1.3]60	0,8141	0,884	5

Fuente: elaboración personal.

Tabla 16: Peso seco de eventos en condiciones de invernadero.

EVENTOS	Rep1				Rep2				Rep3			
	Pre (g)	Post (g)	Mat, seca (%)	Agua (%)	Pre (g)	Post (g)	Mat, seca (%)	Agua (%)	Pre (g)	Post (g)	Mat, seca (%)	Agua (%)
GLS 1	0,55	0,036	6,5	93,5	0,67	0,058	8,6	91,4				
GLS 4	0,3	0,024	8	92	0,363	0,022	6	94	0,193	0,016	8,4	91,6
GLS 5	0,167	0,013	7,5	92,5	0,184	0,011	5,9	94,1	0,199	0,014	7,1	92,9
GLS 6	0,126	0,011	8,8	91,2	0,08	0,007	9,3	90,8	0,092	0,007	7,6	92,4
GLS 8	0,745	0,059	8	92	0,485	0,036	7,3	92,7	0,601	0,039	6,5	93,5
GLS 9	0,149	0,007	4,8	95,2	0,35	0,017	4,7	95,3	0,601	0,03	5	95
GLS 10	0,183	0,017	9,1	90,9	0,147	0,012	7,8	92,2	0,234	0,016	6,9	93,1
Desiree	0,151	0,007	4,6	95,4	0,24	0,011	4,4	95,6	0,408	0,023	5,7	94,3
85.2	0,496	0,038	7,7	92,3	0,522	0,035	6,7	93,3	0,274	0,02	7,1	92,9

Fuente: elaboración personal.

Tabla 17: Concentraciones de las soluciones estándar de dBGLS y áreas de los picos expresadas en unidades arbitrarias. HPLC.

Curva de calibración dBGLS				
μM (μmol/L)	A (UA)	B (UA)	C (UA)	Promedio
0,29	1440	1740	1240	1473,33
0,58	2550	2820	2570	2646,67
2,89	14950	12780	11240	12990,00
5,79	28040	25140	24000	25726,67
11,57	56950	48350	47920	51073,33

Fuente: elaboración personal.

Tabla 18: Concentraciones de las soluciones estándar de dBGLS y áreas de los picos promedio expresadas en unidades arbitrarias. LC-ESI-MS.

Concentración Promedio de dBGLs(μM)	Area (mAU)
16,4	57,9
11,4	40,8
8,1	29,1
4,4	15,1
3,8	13,47
2,3	8,4

Fuente: elaboración personal.



Msc. Giovani Aragón Alvarado

Asesor



Bach. Karina Cancino Maldonado

Tesista