



7.32110

**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE AGRONOMIA**

**INGENIERÍA GENÉTICA EN PAPA (*SOLANUM
TUBEROSUM* L.) PARA RESISTENCIA MÚLTIPLE A
PATÓGENOS.**

Por

FACULTAD DE AGRONOMIA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Victoria BONNECARRÈRE
Maximiliano MAZZOLLA**

Tesis presentada como uno de
Los requisitos para obtener el
Título de Ingeniero Agrónomo
(orientación Producción Vegetal Intensiva)

**Montevideo
Uruguay
1998**

Página de Aprobación.

Tesis aprobada por:

Director:

Daniel Pagliano

Nombre completo y firma

Cristina Mazzella

Nombre completo y firma

Jorge Monzó

Nombre completo y firma

Fecha:

12/12/1998

Autor:

Victoria Bonaccorsi

Nombre completo y firma

Maximiliano Mazzolla

Nombre completo y firma

Agradecimientos:

Agradecemos muy especialmente a todas las personas del laboratorio de Biotecnología de INIA – Las Brujas, por su invaluable paciencia y ayuda. A las compañeras tesisistas por su dedicación y socorro. A Daniel Pagliano, por su continuo empuje y soporte incondicional. Y a nuestras familias por estar siempre.

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.

<i>Cuadro 1. Genes de quitinasas clonados.</i>	17
<i>Cuadro 2. Actividad específica de quitinasas aisladas de tabaco.</i>	20
<i>Cuadro 3. Actividad específica de β-1,3-glucanasas purificadas de tabaco.</i>	25
<i>Cuadro 4. Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas tipo 1.</i>	28
<i>Cuadro 5. Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas Tipo 2.</i>	29
<i>Cuadro 6. Secuencia N-terminal de la proteína AP24 y otras osmotinas.</i>	36
<i>Cuadro 7. Descripción de los plásmidos utilizados.</i>	48
<i>Cuadro 8. Módulo estándar de transformación.</i>	54
<i>Cuadro 9. Módulos de transformación realizados.</i>	57
<i>Cuadro 10. Escala de crecimiento y enraizamiento</i>	58
<i>Cuadro 11. Resumen de resultados de módulos con el plásmido pGJ 370</i>	70
<i>Cuadro 12. Resumen de resultados de módulos con el plásmido pHAL 73</i>	71
<i>Cuadro 13. Regeneración en los controles de los módulos con el plásmido pGJ 370</i>	72
<i>Cuadro 14. Regeneración en los controles de los módulos con el plásmido pHAL73</i>	72
<i>Cuadro 16. Número de plantas T, Q, QT y PCR positivas obtenidas.</i>	76
<i>Cuadro 17. Enraizamiento en medio selectivo y resultado de PCR.</i>	78
<i>Cuadro 18. Relación entre capacidad de enraizar en medio con agente de selección y resultado de PCR.</i>	78
<i>Figura 1. Actividad del gen GUS bajo la acción del promotor de la enzima malato deshidrogenasa.</i>	5
<i>Figura 2. Influencia del ácido salicílico y del peróxido de hidrógeno en el complejo de defensa bioquímico</i>	6
<i>Figura 3. Nivel de expresión de un gen de defensa, en función al tiempo, en una reacción de resistencia (A), y una de susceptibilidad (B).</i>	11
<i>Figura 4. Reacción de hipersensibilidad bajo el sistema barnasa-barstar</i>	13
<i>Figura 5. Transgénicos de tabaco expresando Quitinasa, RIP y β-1,3-glucanasas vs. Control.</i>	31
<i>Figura 6. Reducción de severidad en la infección de E. carotovora en tubérculos de papa transgénica.</i>	42
<i>Figura 7. Región ADN- T de los plásmidos pHAL 73 y pGJ370.</i>	47

TABLA DE CONTENIDO.

<i>Página de Aprobación.</i>	<i>I</i>
<i>Agradecimientos:</i>	<i>II</i>
<i>LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.</i>	<i>III</i>
<i>1. INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
<i>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</i>	<i>4</i>
<i>2.1 MECANISMOS NATURALES DE DEFENSA.</i>	<i>4</i>
<i>2.2 ESTRATEGIAS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS RESISTENTES A BACTERIAS Y HONGOS</i>	<i>9</i>
<i>2.2.1 TRANSFORMACIÓN CON UN GEN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA</i>	<i>9</i>
<i>2.2.2 TRANSFORMACIÓN CON VARIOS GENES DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.</i>	<i>11</i>
<i>2.2.3 GENERACIÓN DE RESPUESTAS DE HIPERSENSIBILIDAD</i>	<i>11</i>
<i>2.2.4 GENES PARA LA PRODUCCIÓN DE FITOALEXINAS Y OTRAS ALTERNATIVAS COMPLEJAS.</i>	<i>13</i>
2.2.4.1 Utilización de genes de enzimas y/o sustratos claves en la biosíntesis de fitoalexinas.	13
2.2.4.2 Glucosa oxidasa.	14
2.2.4.3 STH 2.	15
<i>2.3 GENES Y PROTEÍNAS DE DEFENSA INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A BACTERIAS Y HONGOS.</i>	<i>16</i>
<i>2.3.1 QUITINASAS.</i>	<i>16</i>
2.3.1.1 Estructura y clasificación.	17
2.3.1.2 Rol en la fisiología vegetal.	19
<i>2.3.2 B-1,3 – GLUCANASAS.</i>	<i>23</i>
2.3.2.1 Estructura y clasificación.	23
2.3.2.2 Rol en la fisiología vegetal.	23
<i>2.3.3 PROTEÍNAS INACTIVADORAS DE LOS RIBOSOMAS.</i>	<i>26</i>
2.3.3.1 Clasificación y estructura.	27
2.3.3.2 Propiedades antivirales y antifúngicas de las RIPs.	29
<i>2.3.4 COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE QUITINASAS, B-1,3-GLUCANASAS Y RIPs</i>	<i>30</i>
<i>2.3.5 ACCIÓN SINÉRGICA: QUITINASAS, B-1,3-GLUCANASAS Y RIPs.</i>	<i>31</i>
<i>2.3.6 OSMOTINAS.</i>	<i>33</i>
2.3.6.1 Osmotina AP24.	35
2.3.6.2 Mecanismo de acción.	37

2.3.7 PROTEÍNAS ASESINAS.	37
2.3.8 CECROPINAS.	39
2.3.9 LISOZIMAS.	41
2.4 CONSIDERACIONES FINALES.	43
<u>3. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	45
3.1 SELECCIÓN DE CULTIVARES DE PAPA	45
3.2 Descripción de los genes y plásmidos utilizados.	45
3.3 TRANSFORMACIÓN DE <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	48
3.3.1 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.	49
3.3.2 DIGESTIÓN DE LOS PLÁSMIDOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.	50
3.4 TRANSFORMACIÓN DE PAPA	53
3.4.1 PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN	53
3.4.2 ESTRATEGIA DE TRANSFORMACIÓN	54
3.5 ENSAYO DE ENRAIZAMIENTO DE LOS POSIBLES TRANSFORMADOS	57
3.5.1 CALIBRACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL AGENTE SELECTOR PARA SELECCIONAR EN MEDIO DE ENRAIZAMIENTO.	57
3.5.2 ENRAIZAMIENTO DE CLONES POSIBLEMENTE TRANSFORMADOS.	58
3.6 EVALUACION MOLECULAR DE LOS POSIBLES TRANSFORMADOS	59
3.6.1 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE PLANTAS PARA REACCIÓN DE PCR.	59
3.6.2 PROTOCOLO DE REACCIÓN DE PCR.	60
3.7 ACLIMATACIÓN Y OBTENCIÓN DE MINITUBERCULOS EN INVERNÁCULO.	62
<u>4. RESULTADOS</u>	63
4.1. DESARROLLO DE LOS SEGMENTOS INTERNODALES	63
4.2 DESARROLLO DE LOS MÓDULOS DE TRANSFORMACIÓN	65
4.3. PLANTAS POSIBLEMENTE TRANSGÉNICAS OBTENIDAS EN LOS MÓDULOS DE TRANSFORMACIÓN.	69
4.4. ANÁLISIS POR PCR	73
4.5. RELACIÓN ENTRE CAPACIDAD DE ENRAIZAMIENTO EN MEDIO SELECTIVO Y RESULTADO DE PCR	77
4.6. ACLIMATACIÓN Y OBTENCIÓN DE MINITUBÉRCULOS	79
<u>5. DISCUSIÓN</u>	80
<u>6. CONCLUSIONES</u>	83

7. RESUMEN	84
8. SUMMARY	86
9. BIBLIOGRAFÍA	88
10. ANEXO	95
<i>10.1 Gen y traducción de lizosima aislada de clara de huevo de pollo.</i>	<i>95</i>
<i>10.2 Gen y traducción gen modificado ap24 (versión apoplástica) aislado de tabaco</i>	<i>96</i>
<i>10.3 Algunos transgénicos liberados hasta el momento.</i>	<i>97</i>

1. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum*) es un cultivo originario de la región andina (Perú y Bolivia), pero en la actualidad se cultiva en casi todas las regiones del mundo. Es el cuarto cultivo en importancia a nivel mundial, después del trigo, arroz y maíz. Su valor nutritivo la coloca entre los principales alimentos de la humanidad, lo que pone en evidencia la relevancia de cualquier mejoramiento de su producción, tanto cualitativa como cuantitativamente.

En el Uruguay es de gran importancia dentro del sector hortícola. En el año 1996, existía una superficie sembrada de 12.103 hectáreas (considerando los dos ciclos anuales del cultivo) involucrando un total de 3.802 productores. La tendencia actual, al igual de lo que ocurre en todo el sector agropecuario, es la disminución del área sembrada, aumentando el rendimiento y disminuyendo el número de productores (com. pers. Ing. Agr. Luis Aldabe). Esto se debe principalmente a la pérdida de competitividad de los productores que cuentan con menos recursos, parte de lo cual reside en los elevados costos de producción de este cultivo.

El porcentaje de los costos de producción que corresponden a la sanidad del cultivo, explicado por la aplicación de agroquímicos y la compra de papa semilla, representan el 15% y 35% de los costos variables respectivamente. La papa semilla se importa en especial de Canadá por la incapacidad de generar en el Uruguay este germoplasma libre de virus en cantidad suficiente para cubrir la demanda nacional.

Además de las enfermedades virósicas, aquellas causadas por hongos y bacterias fitopatógenas también provocan importantes decrementos en la producción. En el país se citan como principales enfermedades fúngicas a los tizones temprano y tardío, causados por *Phytophthora infestans* y *Alternaria solani* respectivamente, y como principales enfermedades bacterianas el marchitamiento bacteriano, producido por *Pseudomonas solanacearum* y la podredumbre blanda y pierna negra causadas por *Erwinia carotovora*. Además de éstos existe un gran número de patógenos que amenazan constantemente al cultivo. Si a esto se suma la inexistencia de cultivares con niveles elevados de resistencia o tolerancia a éstas enfermedades, se pone de manifiesto la importancia de la generación de nuevos cultivares de papa con niveles mejorados de resistencia a patógenos.

El mejoramiento genético vegetal ha evolucionado, desde la simple selección de las mejores plantas como progenitoras para los próximos cultivos, hasta el uso de las sofisticadas herramientas de la biología molecular, que

permiten introducir genes con actividad precisa y conocida dentro del genoma de las plantas.

Estas nuevas tecnologías, permiten a la ingeniería genética producir nuevos cultivares con características mejoradas, a los que se los denominan cultivos transgénicos, por su condición de llevar dentro de su genoma genes introducidos artificialmente.

En los últimos años se han generado más de 800 cultivares transgénicos, (ver anexo 10.3) incluyendo la mayoría de los cultivos de importancia mundial. Esto refleja que esta nueva tecnología presenta considerables ventajas, como lo son: mayor rapidez respecto a las técnicas convencionales de mejoramiento, mantenimiento del resto de las características genéticas del cultivar, inexistencia de barreras impuestas por la incompatibilidad sexual entre especies vegetales y la incorporación de genes de organismos no pertenecientes al reino vegetal.

Con el objetivo de obtener plantas transgénicas resistentes o con mayores niveles de tolerancia a hongos y bacterias, es necesario conocer los mecanismos naturales de defensa de la planta, de manera de poder definir las distintas estrategias a utilizar.

Las plantas transgénicas deben ser evaluadas de acuerdo a su performance productiva y se debe fiscalizar que mantengan las características morfológicas y fisiológicas del cultivar transformado. Esto es muy importante dado que la inserción aleatoria de un gen foráneo en el genoma vegetal puede afectar la integridad del mismo, además, no hay que olvidar que se están expresando constitutivamente genes que pueden tener funciones alternativas a la función buscada. La suma de estos factores puede desencadenar alteraciones en el comportamiento de la planta.

El destino final de una planta transgénica puede ser la producción directa, por lo que su evaluación a campo debe ser exhaustiva y rigurosa y numerosas evaluaciones *in vivo* deben ser llevadas a cabo antes de su lanzamiento como cultivar. Es importante constatar altos niveles de expresión de las proteínas transgénicas, y que esto conduzca a reacciones de resistencia a diferentes patógenos.

El camino a seguir para que un evento de transformación de lugar a un cultivar comercial, requiere que la planta supere desafíos biológicos en invernáculo, con altas concentraciones de inóculo, para luego pasar un riguroso sistema de evaluación a campo donde se evalúa el comportamiento productivo. Este es el modo de cerciorarse que la inserción de genes foráneos no haya

silenciado genes nativos de la especie y que el cultivar mantenga sus características agronómicas.

La revisión se centrará en el análisis de las diferentes estrategias de transformación y de algunos de los genes y sus productos proteicos inhibidores del desarrollo del patógeno que han sido usados, o podrán serlo, en la generación de plantas transgénicas resistentes a enfermedades. Existen diferentes métodos de transformación vegetal, los cuales no se considerarán en esta revisión por que han sido abordados en la tesis de grado de la Ing. Agr. Silvia Méndez (Facultad de Agronomía, 1995, Montevideo, Uruguay.)

El objetivo de este trabajo es la generación de plantas de papa transgénicas que hayan incorporado dentro de su genoma genes codificadores de proteínas de defensa, de modo que después de un proceso de selección, permita producir un nuevo cultivar de papa que cumpla con las características productivas del país y que además sea resistente a las principales enfermedades.

Se seleccionaron para tal fin dos cultivares de papa utilizados en el país, Kennebec e Iporá, como genomas receptores y se transformaron con dos combinaciones de dos genes cada una. Los genes utilizados codifican proteínas de actividad bactericida y fungicida de manera que confieren mayor resistencia a enfermedades causadas por estos agentes. La transformación se realizó mediante el sistema de *Agrobacterium tumefaciens*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 MECANISMOS NATURALES DE DEFENSA.

Las primeras barreras que debe enfrentar un potencial patógeno, son aquellas estructuras preformadas de la planta, tales como cutícula, epidermis y ceras. Si el patógeno logra superarlas, la planta puede desencadenar respuestas físicas produciendo estructuras como capas de suber, capas de abscisión, tilosis y producción de gomas.

A pesar de esto, la resistencia de una planta al ataque de un patógeno no obedece tanto a las barreras estructurales, sino a las sustancias que producen sus células antes o después de haberse producido la infección. A éstos mecanismos de defensa se les denomina conjuntamente **defensa bioquímica** (Agrios, 1989).

Al igual que en las barreras físicas, en la defensa bioquímica existen mecanismos preexistentes al ataque del patógeno e inducidos por éste. Entre estas se encuentran los inhibidores liberados por las plantas al medio ambiente, inhibidores presentes en las células vegetales antes de que se produzca la infección, así como deficiencia de algunos nutrientes esenciales al patógeno, entre otros. Entre las respuestas inducidas por el patógeno se encuentran la producción de compuestos tóxicos como las fitoalexinas, la inactivación de las enzimas del patógeno, la detoxificación de compuestos fitotóxicos producidos por los microorganismos y la síntesis inducida de proteínas y enzimas inhibidoras del desarrollo del patógeno.

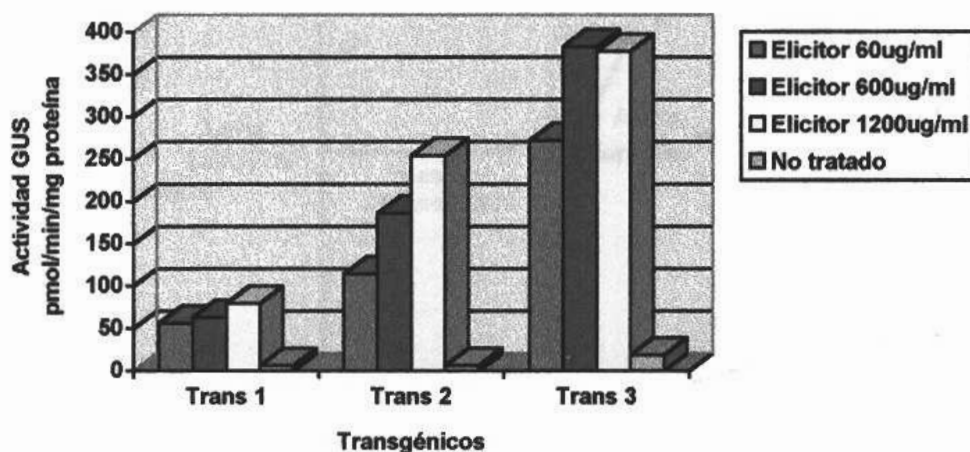
Después de una infección o herida se da una acumulación de fitoalexinas. Las fitoalexinas son sustancias fungitóxicas que las plantas producen en cantidades apreciables sólo después de haber sido estimuladas por ciertos microorganismos, o bien después de haber sufrido daños causados por agentes químicos o mecánicos, y que inhiben el desarrollo de los microorganismos patógenos de las plantas. Las fitoalexinas incluyen varios compuestos como la ipomeamarona, el orquinol, la pisatina, la faseolina y la rishitina (Agrios, 1989)

Existe una correlación positiva entre la concentración de estos compuestos tóxicos y la resistencia generada (Cornelissen y Melchers, 1993), cada especie vegetal produce una serie específica de fitoalexinas resultado de la co-evolución con patógenos (Keen, 1992).

Estas fitoalexinas son el resultado de un proceso metabólico complejo, donde hay varios genes involucrados. La enfermedad se desarrolla cuando el patógeno puede detoxificar dichas fitoalexinas (Keen, 1992).

Luego del reconocimiento huésped-patógeno, la primer consecuencia es el aumento del metabolismo basal de las células vegetales, lo que incrementa la disponibilidad de energía para los procesos subsecuentes en la generación de resistencia. Este proceso fue evidenciado por Schaaf *et al.* (1995), mediante el estudio del comportamiento del promotor de la enzima malato deshidrogenasa, una de las enzimas claves del metabolismo celular. En plantas de tabaco transgénicas que expresaban el gen reportero GUS (β - glucuronidasa) bajo el control de dicho promotor, se detectó mayor expresión del gen cuando las plantas eran tratadas con un elicitor fúngico (potencial patógeno) según se muestra en la figura 1.

Figura 1. Actividad del gen GUS bajo la acción del promotor de la enzima malato deshidrogenasa.



Fuente: Schaaf *et al.*, 1995.

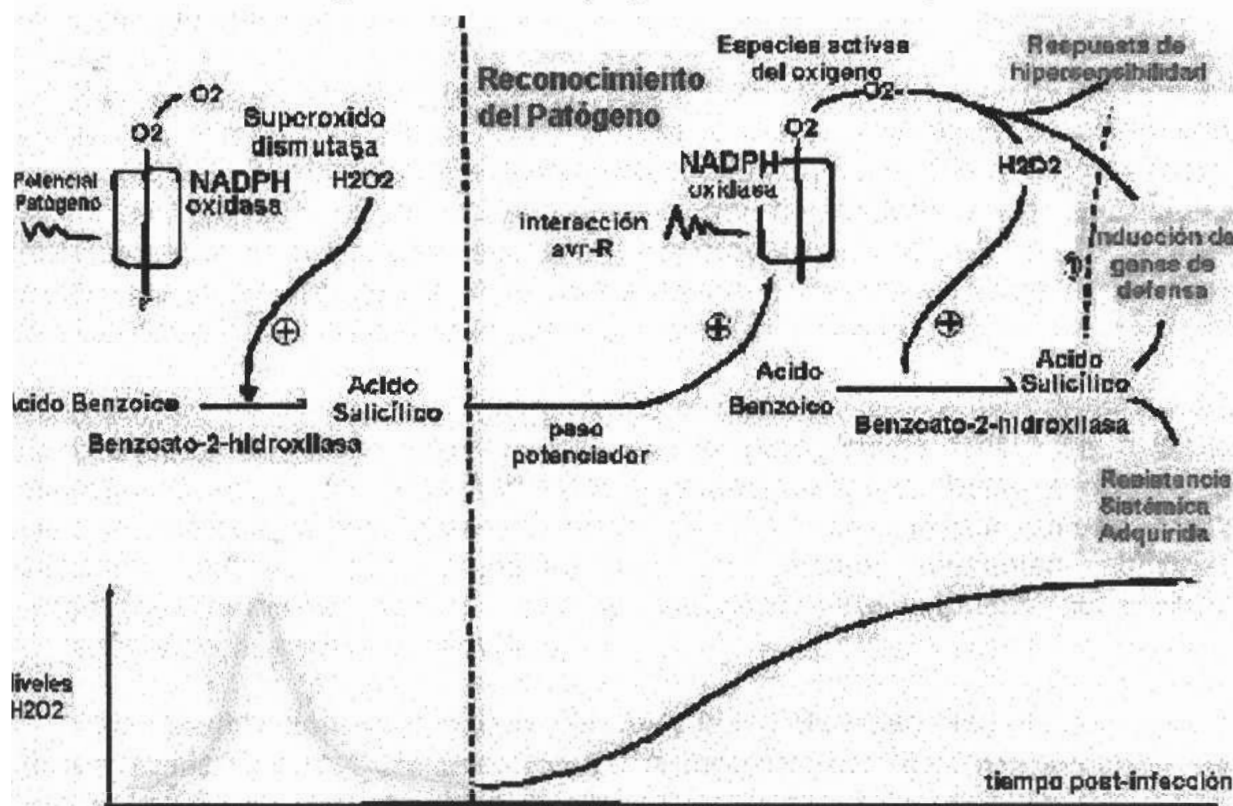
Esta mayor actividad en el metabolismo implica un incremento en los niveles de peróxido de hidrógeno y de otras especies reactivas del oxígeno como el radical aniónico superóxido y el radical hidroxilo, que estimulan la producción de ácido salicílico (Draper, 1997). La situación se resume en la figura 2.

Si existe un reconocimiento huésped-patógeno (interacción avr(-) - R) se desencadenan reacciones que involucran al ácido salicílico preformado y al ácido benzoico, lo que determina una acumulación aún mayor de peróxido de hidrógeno (Draper, 1997). Estas reacciones y la subsiguiente acumulación de

peróxido de hidrógeno, parecen ser uno de los eventos más tempranos después del reconocimiento del patógeno por la planta, y tienen un rol importante en la defensa de las mismas (Baker y Orlandi, 1995).

Este incremento de las especies reactivas del oxígeno en el metabolismo celular se ha comprobado en varios cultivos. En tomate, por ejemplo, se observó un aumento de estos metabolitos luego de la adición de un elicitor fúngico (Vera-Estrella *et al.*, 1994).

Figura 2. Influencia del ácido salicílico y del peróxido de hidrógeno en el complejo de defensa bioquímico



Fuente: Draper, 1997.

Al peróxido de hidrógeno se le asignan diversos roles como la estimulación de la producción de fitoalexinas, inducción del entrecruzamiento de las glicoproteínas de pared celular, estar involucrado en el disparo de la reacción de hipersensibilidad, actuar como una señal difusible para activar genes de protección celular y también podría estar relacionado en la generación de resistencia sistémica adquirida (Wu *et al.*, 1995).

Todas estas reacciones concluyen en tres tipos de respuestas:

- Reacción de Hipersensibilidad.
- Resistencia Sistémica Adquirida (SAR).
- Inducción de genes de defensa.

Reacción de hipersensibilidad: las formas reactivas del oxígeno y/o proteínas de suicidio celular causan necrosis rápida y localizada de las células en el sitio de infección, limitando el desarrollo del patógeno.

Resistencia sistémica adquirida: luego de una infección o herida, se producen señales que se traslocan a toda la planta y el ácido salicílico está involucrado en la síntesis de esta/s molécula/s (Draper, 1997; Staskawicz *et al.*, 1995; Godiard *et al.*, 1994). Esta señal desencadena en las células respuestas de defensa, que resulta en una mayor tolerancia de la planta a un amplio rango de patógenos. Aún no se conocen los mecanismos específicos involucrados, ni la molécula que actúa como señal difusible.

Inducción de genes de defensa: estos genes codifican un tipo de proteínas denominadas proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), los que se expresan después del reconocimiento huésped-patógeno. Estas proteínas si bien son productos monogénicos, dentro de una misma planta pueden existir distintas isozimas. Las proteínas PR en general presentan actividad antipatogénica directa. Algunos autores consideran esta respuesta como parte de la resistencia sistémica adquirida.

Esta clasificación, respecto a las posibles y diversas respuestas que se desencadenan en una planta luego del reconocimiento huésped-patógeno, es una simplificación que ayuda a establecer un orden a la hora de realizar un estudio de las mismas.

Es esperable, que al tratarse de un sistema biológico complejo todas estas respuestas estén integradas y coordinadas entre sí. El rol globalizador de las respuestas de las plantas al ataque de patógenos, así como a diversas situaciones de estrés, ha sido adjudicado por algunos autores al ácido jasmónico y a algunos de sus derivados, en especial el metil jasmonato (en conjunto se los denomina jasmonatos).

Los jasmonatos pueden ser transportados local o sistémicamente dentro de la planta. El metil jasmonato es un compuesto volátil que puede ser liberado a la atmósfera y alcanzar plantas vecinas, donde induciría respuestas de defensa anticipadas al patógeno "que se acerca" (Reinbothe *et al.*, 1994).

El mecanismo principal por el cual los jasmonatos influyen sobre estas respuestas es alterando la expresión génica. Se le atribuye la inducción de la síntesis de nuevos polipéptidos, denominados JIPs (jasmonate-induced proteins), la represión selectiva de otras proteínas relacionadas al proceso fotosintético y la inducción de un retraso temporal general de la biosíntesis proteica (Reinbothe *et al.*, 1994).

Se ha comprobado en el cultivo de arroz, que la aplicación de ácido jasmónico induce la acumulación de productos de los genes de las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), e incrementos de ARNm. Asimismo, aplicaciones exógenas de un precursor del ácido jasmónico (ácido 13-hidroperoxilinoléico) conduce a la acumulación de la fitoalexina momilactona A (Schweizer *et al.*, 1997).

Las JIPs se corresponderían con las ya citadas proteínas de defensa. Como se verá más adelante una de las JIPs, la JIP60 es una proteína inactivadora de los ribosomas, producto de uno de los posibles genes a utilizar en la generación de plantas transgénicas resistentes a patógenos. Esta JIP puede desencadenar el suicidio celular, lo que se ve reflejado como una respuesta de hipersensibilidad (Reinbothe *et al.*, 1994).

La concentración de los jasmonatos, y en especial del metil jasmonato, puede ser una variable importante en el momento de designar el tipo de respuesta a desencadenar. Se plantea que a concentraciones no demasiado elevadas se puede dar la inducción de genes de defensa y actuar como metabolito difusible confiriendo la ya definida resistencia sistémica adquirida. Así que la reacción de hipersensibilidad se produciría con mayores concentraciones del metabolito (Reinbothe *et al.*, 1994). En plantas de papa y tomate, aplicaciones exógenas de jasmonatos indujo la aparición de esta resistencia sistémica contra el patógeno *Phytophthora infestans* (Schweizer *et al.*, 1997).

El conocimiento detallado de los mecanismos que generan la resistencia sistémica adquirida abrirá nuevas e interesantes alternativas para el mejoramiento genético, en especial en las áreas de ingeniería genética.

2.2 ESTRATEGIAS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS RESISTENTES A BACTERIAS Y HONGOS

El conocimiento de los mecanismos naturales de defensa de las plantas, permite diseñar diferentes estrategias para la generación de plantas transgénicas resistentes a patógenos fúngicos y bacterianos.

Los mecanismos que componen las reacciones de defensa de la planta, como producción de fitoalexinas, inducción de genes de defensa, reacción de hipersensibilidad y resistencia sistémica adquirida, pueden usarse como referencia para la elección de la estrategia de transformación. Mecanismos recientemente estudiados, que podrían estar involucrados en la restauración del metabolismo normal de la planta luego de la infección, podrían ser usados para la obtención de plantas con mejores niveles de resistencia. (Constabel *et al.*, 1995)

A continuación se citan algunas de las estrategias más comúnmente utilizadas en ingeniería genética para la producción de plantas transgénicas resistentes a enfermedades.

2.2.1 TRANSFORMACIÓN CON UN GEN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La utilización de genes de actividad antimicrobiana (genes de defensa PR u otros genes) ha sido muy difundida en la generación de transgénicos. Como se verá más adelante, esta estrategia ha dado resultados muy eficientes en lo que respecta a la generación de resistencia a enfermedades. El hecho de que sus productos proteicos sean monogénicos hace al sistema menos complejo, cuando se lo compara con otros procesos de defensa que involucran extensas vías metabólicas y por ende un gran número de genes. Sin embargo puede no lograrse la resistencia deseada cuando el producto de un solo gen no es lo suficientemente eficaz como para contener la enfermedad (Zhu *et al.*, 1994; Jongedijk *et al.*, 1995). Además, los patógenos pueden superar mediante mutaciones este tipo de resistencia monogénica (Strittmatter *et al.* 1995). A pesar del riesgo que esto involucra, las probabilidades de que se generen cepas resistentes son menores a las existentes en el mejoramiento convencional, ya que en este caso se afecta generalmente el mecanismo de reconocimiento huésped - patógeno, el cual es más fácil de saltar por parte del patógeno.

El gran desarrollo de esta estrategia, ha impulsado la abundante clonación de genes cuyos productos proteicos presenten probada actividad biológica contra patógenos vegetales.

El hallazgo de cierta actividad proteica de interés en un vegetal o incluso en seres vivos de otros reinos, como el animal, conduce en primer lugar a la detección del gen involucrado en su síntesis. A partir de esta información y utilizando técnicas de biología molecular se clona el gen, lo que significa su aislamiento y posteriormente su secuenciación. De esta manera se podrán producir un número ilimitado de genes de la secuencia deseada.

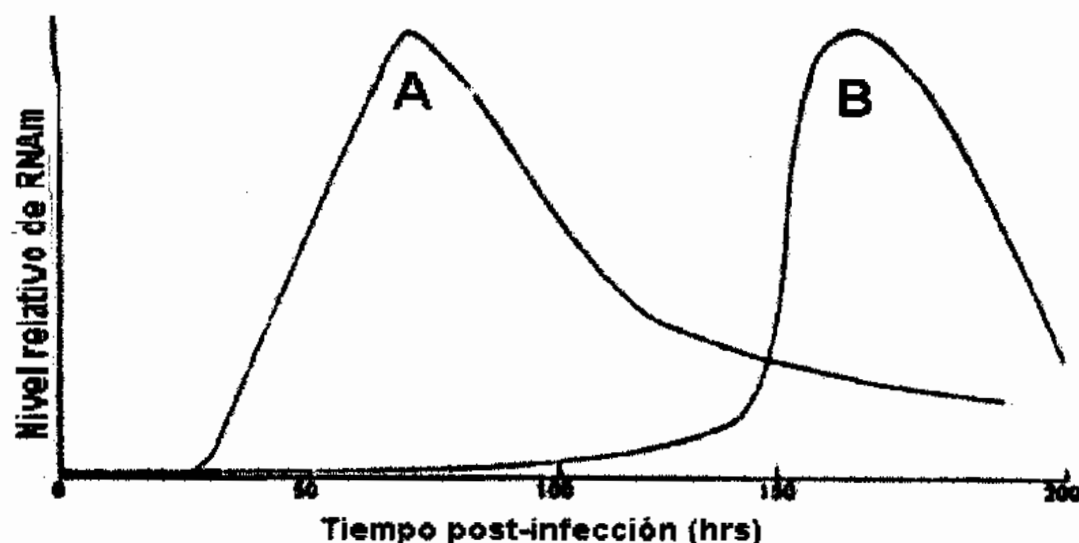
No menos importante es la selección de los promotores que dirigen la transcripción de los genes de interés. Los promotores más ampliamente utilizados son aquellos, en su mayoría fuertes, que permiten una expresión constitutiva del gen. Esto simplifica los estudios de expresión y permiten asegurarse un nivel constante de la proteína de interés. También implican, en general, altos niveles de expresión lo cual es especialmente importante para aquellas proteínas para las cuales existe correlación positiva entre los niveles de expresión y la inhibición del crecimiento del patógeno.

La utilización de promotores inducibles, parece ser una estrategia más racional, debido a que se pueden generar expresiones tejido u órgano específicas de estas proteínas. Además se cuestiona que niveles extremadamente altos de estas (Jach, G., com. pers, cita hasta 16,2% de las proteínas totales del espacio intercelular corresponden al producto transgénico) pueden representar un alto costo energético, desencadenar reacciones no deseadas o afectar la integridad de la planta en casos en que altas concentraciones del producto génico resulten fitotóxicos.

Muchas veces las plantas presentan los genes que codifican para las proteínas de defensa, pero la expresión tardía de los mismos hace ineficiente este mecanismo de defensa permitiendo el avance del patógeno. La utilización de promotores constitutivos hace posible saltar esta limitante (Lamb *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1996)

En la figura 3 se observa la cantidad relativa de ARNm de un gen de defensa luego de producida una infección en una planta resistente y en otra susceptible al mismo patógeno. En este caso el hecho de que la planta exprese el mismo gen de defensa horas antes, determina que sea resistente a la infección.

Figura 3. Nivel de expresión de un gen de defensa, en función al tiempo, en una reacción de resistencia (A), y una de susceptibilidad (B).



Fuente: Lamb *et al.*, 1992

2.2.2 TRANSFORMACIÓN CON VARIOS GENES DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

La posibilidad de incluir más de un gen en los vectores de transformación permite lograr niveles mejorados de resistencia en un vegetal, ya sea utilizando genes cuyos productos proteicos expresan sinergismo en su acción contra un determinado patógeno, o mediante la utilización de genes que por su actividad sobre distintos tipos de organismos, determinen un rango más amplio de resistencia.

Las consideraciones hechas sobre los promotores en el apartado anterior se mantienen para este caso. En capítulos subsiguientes se detallan ejemplos específicos sobre la actividad sinérgica de algunos de los genes.

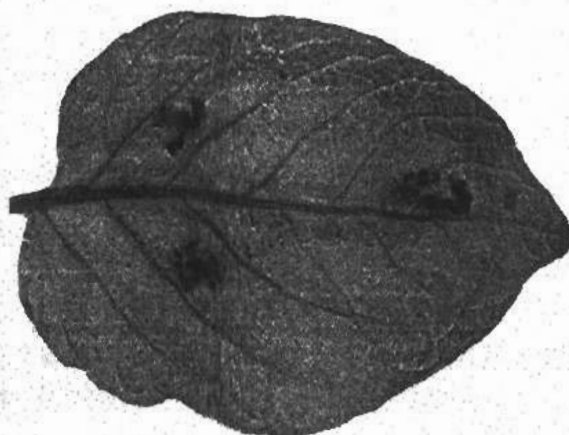
2.2.3 GENERACIÓN DE RESPUESTAS DE HIPERSENSIBILIDAD

Este tipo de resistencia es menos específica y más duradera, por lo que ha generado mucho interés. Su propio mecanismo de acción, la inducción de muerte celular, exige la restricción de la acción citotóxica al sitio de infección, ya que si se extiende produciría necrosis generalizada de la planta.

Esta restricción conduce a un extenso estudio de promotores inducibles, los que únicamente deberán actuar frente a un solo tipo de estímulo y en forma muy específica. Lograr una inducción específica por patógenos es muy compleja ya que, por ejemplo, la producción de heridas en los vegetales produce efectos muy similares a las de una infección.

Como ya ha sido citado, el estudio de promotores inducibles es muy difícil. Para ello se ha utilizado mayoritariamente el gen GUS, cuyo producto proteico es muy fácil de detectar y por lo tanto la acción del promotor que dirige su transcripción. En la foto 1 se observa la actividad de la construcción del promotor inducible prp1-1 más el gen GUS sobre hojas que fueron pulverizadas con esporas de *P. infestans*, donde se observa que el promotor es sensible a dicho patógeno (Martini *et al.*, 1993).

Foto 1. Actividad del promotor prp1-1.



Se observan sobre la hoja, manchas que corresponden a la actividad del gen GUS, en los lugares donde se indujo al promotor prp1-1 por acción de esporas de *P. infestans* rociadas sobre esas zonas hoja.

El promotor parece ser lo suficientemente sensible y específico como para ser usado en una estrategia de hipersensibilidad.

Fuente: Martini *et al.* (1993)

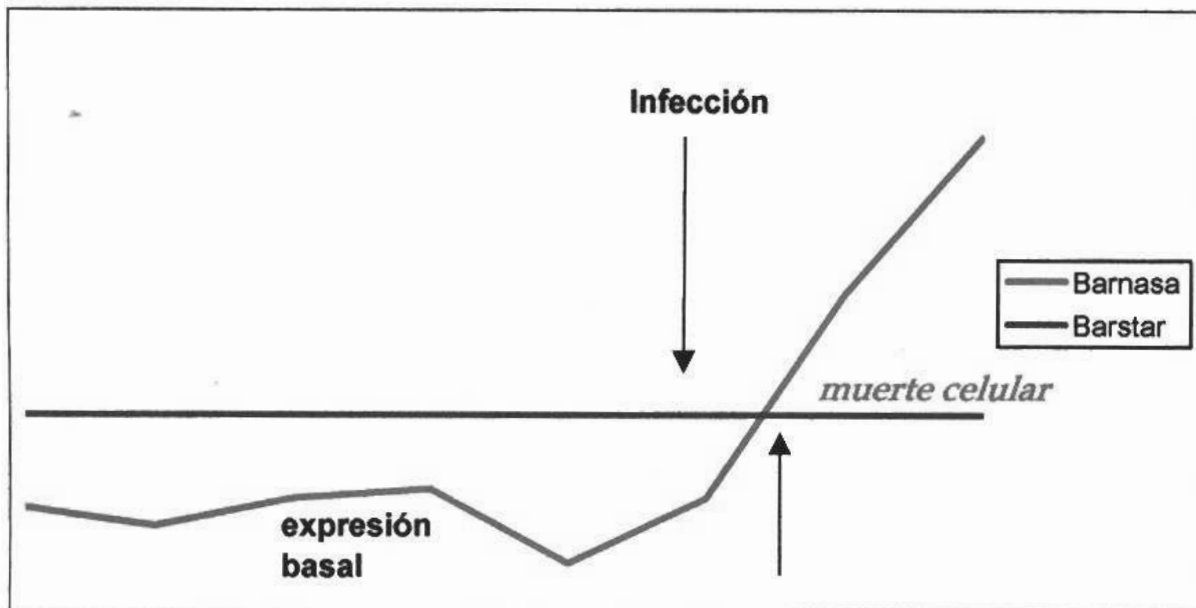
El promotor prp1-1, también estudiado por Strittmatter *et al.* (1995), ejemplifica la complejidad del estudio de promotores, y en especial frente a la posibilidad de generación de respuestas de hipersensibilidad mediante el uso de un promotor inducible por patógenos.

Dichos autores colocaron el gen barnasa, el cual codifica para una ARNasa de *Bacillus amyloliquetasiens* con acción citotóxica en células vegetales, bajo la acción de este promotor. En el mismo proceso colocaron el gen sintético barstar, inhibidor específico de barnasa, pero bajo la acción del promotor fuerte y de expresión constitutiva CaMV 35S. De esta forma lograron que en condiciones normales la expresión de barstar superara a la de barnasa, y por lo



tanto la célula no muriese. En el caso de que se produjera una infección, se invertiría esta situación, elevándose los niveles de barnasa respecto a los de barstar, y por lo tanto se desencadenaría la necrosis celular, generando la respuesta de hipersensibilidad buscada (Figura 4).

Figura 4. Reacción de hipersensibilidad bajo el sistema barnasa-barstar



Fuente: interpretación personal del trabajo de Strittmatter *et al.*, 1995.

2.2.4 GENES PARA LA PRODUCCIÓN DE FITOALEXINAS Y OTRAS ALTERNATIVAS COMPLEJAS.

2.2.4.1 Utilización de genes de enzimas y/o sustratos claves en la biosíntesis de fitoalexinas.

La expresión de fitoalexinas de otra especie vegetal por una planta determina que los patógenos no puedan detoxificarlas, por lo que se ve bloqueada la infección desde su inicio (Keen, 1992).

Se citan a continuación ejemplos que ilustran la importancia de las fitoalexinas en el complejo de interacción primaria entre las plantas y potenciales patógenos.

Un gen de *Fusarium solani* pv. *pisi* cuyo producto proteico detoxifica una fitoalexina de arveja (pisatina) fue introducido en *Cochliobolus heterostrophos*,

un patógeno exclusivo de maíz. Este presentó un crecimiento significativo en arveja, lo que determina que por el sólo hecho de detoxificar una fitoalexina de arveja se convirtió en cuasi-patógeno (Keen, 1992).

Tabaco transgénico expresando una enzima clave en la síntesis de la fitoalexina de maní, resveratrol, resultó más resistente a la infección de *Botrytis cinerea* que un control no transformado (Keen, 1992).

La principal desventaja de esta estrategia es que exige un gran conocimiento del metabolismo de la biosíntesis de fitoalexinas, ya que podría ser necesaria la modificación de toda una vía metabólica, sin alterar otros aspectos del metabolismo normal del vegetal.

2.2.4.2 Glucosa oxidasa.

Ya fue citada la importancia del peróxido de hidrógeno en las reacciones de defensa, así como la de las especies activas del oxígeno en general. En base a esto, se ha planteado la obtención de plantas transgénicas que expresen genes involucrados en el metabolismo de especies activas del oxígeno.

Con el objetivo de incrementar la producción de peróxido de hidrógeno y estudiar sus efectos en la resistencia de la planta a enfermedades, Wu *et al.*, 1995 expresaron un gen que codifica glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* en papa transgénica. Los autores demostraron que la expresión de un gen de GO de un hongo lleva a una producción elevada de peróxido de hidrógeno en las plantas de papa transgénicas. Esta elevada cantidad de peróxido de hidrógeno medió una fuerte resistencia contra *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* y una mayor resistencia a *Phytophthora infestans* (síntomas más leves y menores tasas de crecimiento del hongo). La glucosa oxidasa (GO) cataliza la oxidación de β -D-glucosa por oxígeno molecular, dando ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Esta enzima es producida por varias bacterias y hongos, pero no por plantas y animales.

A partir del análisis de la ubicación subcelular, se determinó que la mayoría de la GO era secretada al apoplasto, aunque se detectaron pequeñas cantidades intracelulares.

En los tubérculos de papa que expresaban GO, el nivel de peróxido de hidrógeno aumentó después de la infección con *E. carotovora*. Wu *et al.*, explican este comportamiento en base a que la GO se encontraba mayoritariamente en el espacio intercelular, por lo que era necesario la

liberación de glucosa intracelular para la producción de peróxido de hidrógeno. Esto fue posible luego de la acción de las enzimas de degradación de la pared celular (pectato liasa y celulasas) de la bacteria.

La generación de resistencia por este tipo de genes que controlan los niveles endógenos de especies activas del oxígeno (AOS), es importante por la capacidad de generación de resistencia para un amplio número de patógenos. Se vio además de la resistencia a *E. carotovora*, *P. infestans* y *Verticillium dahliae*. Los mayores niveles de peróxido de hidrógeno en estas plantas transgénicas confieren resistencia a patógenos diversos vía un mecanismo en común.

Las plantas transformadas con GO crecían normalmente, aunque los niveles de peróxido de hidrógeno en sus tejidos fueran significativamente elevados. Aparentemente estas plantas son capaces de tolerar altos niveles de peróxido de hidrógeno sin desarrollar anomalías en su crecimiento. También es probable que los efectos del peróxido de hidrógeno en los tejidos de las plantas sean diferentes cuando es generado por una enzima producida constitutivamente y se localiza en el apoplasto. Los mecanismos antioxidantes intracelulares (peroxidasas, catalasas, etc.) pueden cointeractuar con los efectos producidos por la peróxido de hidrógeno extracelular en las plantas transgénicas.

El uso de una enzima generadora de AOS representa una nueva y efectiva estrategia de ingeniería genética para la producción de cultivos transgénicos resistentes a enfermedades.

2.2.4.3 STH 2.

La STH2 es una proteína de 17 Kda que naturalmente se expresa en papa, espárrago y arveja, y tal vez en muchos otros vegetales, como consecuencia del reconocimiento huésped-patógeno o situaciones de estrés. También es conocida como PR 10a.

A diferencia de otras proteínas PR, en el caso de la STH2 su función no es conocida, y su rol en el mecanismo de defensa no está del todo claro.

Papas transgénicas que expresaban constitutivamente esta proteína, no mostraron diferencias significativas en su susceptibilidad a *P. infestans* y al virus PVX, con respecto a los controles (Constabel *et al.*, 1993). El crecimiento y desarrollo de estas plantas fue totalmente normal.

Surge la pregunta de por qué se da este comportamiento si la supuesta proteína de defensa se encuentra en altas concentraciones en la planta. Los mismos autores ofrecen tres posibles respuestas al fenómeno:

- a) la proteína afecta a otros patógenos diferentes a los evaluados. Se asume alta especificidad, la cual no es esperada en una proteína ubicada en distintas especies vegetales y elicitada de manera general por diversos patógenos.
- b) es sólo efectiva en combinación con otro/s gen/es de defensa, los cuales al no estar sobreexpresados limitan la respuesta.
- c) no es un gen de primera línea, sino que puede actuar en la reparación de tejidos dañados o en la recomposición del metabolismo normal luego de la infección (tercer línea de defensa).

2.3 GENES Y PROTEÍNAS DE DEFENSA INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A BACTERIAS Y HONGOS.

Una vez identificada la existencia de acción antipatogénica de un determinado producto proteico *in vitro* es posible la clonación de los genes codificantes, lo que ha permitido posteriormente, gracias al vasto conocimiento de las técnicas de transformación, el desarrollo de plantas transgénicas portadoras de dichos genes. Para muchos de estos genes identificados, se han determinado sus mecanismos de acción y los niveles de defensa que desencadenan.

A continuación se analizan varios de los diferentes genes que se han utilizado o que se podrán utilizar en el futuro para la generación de plantas transgénicas resistentes a hongos y a bacterias fitopatógenas.

2.3.1 QUITINASAS.

Las quitinasas son enzimas hidrolíticas de la quitina, un homopolímero de β -1,4- N-acetil-D-glucosamina. La quitina representa del 3 al 60% de la pared celular de Ascomycetes, Deuteromycetes, Basidiomycetes y hongos imperfectos (Oppenheim y Chet, 1992).

2.3.1.1 Estructura y clasificación.

Las quitinasas han sido aisladas de hongos, bacterias y plantas (Oppenheim y Chet, 1992), siendo muy variadas en su secuencia aminoacídica y en su ubicación celular.

Se distinguen, según su estructura primaria tres clases de quitinasas (Collinge *et al.*, 1993). Las quitinasas clase I son enzimas con un dominio N-terminal rico en cisteína de aproximadamente 40 aminoácidos y una secuencia principal altamente conservada, separados ambos por una región bisagra variable. Las de clase II no tienen el dominio rico en cisteína, pero si mantiene una alta identidad en la secuencia principal vista en la clase I, mientras que las de clase III no mantienen la secuencia similar mencionada para las dos anteriores (Collinge *et al.*, 1993).

También se propusieron nuevas clases para incluir quitinasas que no pertenecían a ninguna de las clasificaciones precedentes. Así la clase IV, contiene a las quitinasas que presentan un dominio N-terminal rico en cisteína y una secuencia principal altamente conservada, lo que recuerda a las quitinasas de clase I. Sin embargo, la secuencia principal de las quitinasas de clase IV es significativamente más chica que la de las clase I o II debido a cuatro deleciones. Las enzimas de clase I se distinguen de las de clase IV mediante técnicas serológicas (Collinge *et al.*, 1993).

A pesar de que no presentan una alta homología entre ellas, su acción lítica se mantiene (Collinge *et al.*, 1993; Oppenheim y Chet, 1992). Como se muestra en el cuadro 1 han sido clonados un gran número de genes de quitinasas de diferentes especies vegetales.

Cuadro 1. Genes de quitinasas clonados.

Planta	Clon	Clase	Numero accesión	Referencia
<i>Allium sativum</i>	ADNc		M94105	Van Damme <i>et al.</i> (en prensa)
<i>Arabidopsis</i>	Gen	II	M38240	Samac <i>et al.</i> 1990
	Gen	III	M34107	Samac <i>et al.</i> 1990
<i>Hordeum vulgare</i>	ADNc	Ib	X15349	Swegle <i>et al.</i> 1989
	ADNc	II	M36989	Leah <i>et al.</i> 1991
<i>Phaseolus vulgaris</i>	ADNc	Ia	M13968	Brogie <i>et al.</i> 1986
	ADNc	Ia	M19052	Hedrick <i>et al.</i> 1988

	ADNc	IV	X57187	Margis-Pinheiro <i>et al.</i> 1991
<i>Cucumis sativus</i>	ADNc	III	M24365	Mettrauet <i>et al.</i> 1989
<i>Zea mays</i>	ADNc		M84164	Haynh <i>et al.</i>
<i>Pisum sativum</i>	ADNc	Ib	X63899	Vad <i>et al.</i> 1991
<i>Populus sp.</i>	ADNc	Ia	M25336	Parsons <i>et al.</i> 1989
	Gen	Ia	X59995	Davis <i>et al.</i> 1991
<i>Solanum tuberosum</i>	ADNc	Ia	X14133	Laflamme 1989
	ADNc, gen	Ia	X07130	Gaynor 1988
<i>Oryza sativa</i>	Gen	Ia	X54367	Huang <i>et al.</i> 1991
	ADNc	Ia		Nishizawa 1991
	ADNc, gen	Ia		Zhu, Lamb 1991
<i>Beta vulgaris</i>	ADNc, gen			Mikkelsen <i>et al.</i> 1992
	ADNc, gen	III,IV		Mikkelsen <i>et al.</i> 1992
<i>Nicotiana sp.</i>	ADNc	Ia	M15173	Shinshi <i>et al.</i> 1987
	Gen	Ia	X64518	Van Beuuren <i>et al.</i> 1992
	ADNc, gen	Ia	X16938	Shinshi <i>et al.</i> 1990
	Gen	Ia	X51599	Fakuda <i>et al.</i> 1991
	ADNc, gen	II	X51425	Linthorst <i>et al.</i> 1990
	ADNc	II	M29868	Payne <i>et al.</i> 1990
	ADNc	III	Z11563	Lawton <i>et al.</i> 1992

Fuente: Collinge *et al.*, 1993

Publicaciones más recientes citan hasta 88 genes clonados de quitinasas de los más diversos orígenes (Levorson y Chlan, 1997).

Estudios de expresión realizados mediante genes quiméricos GUS + fragmentos de distintos largos *upstream* de la zona transcripta, muestran que 10bp entre -430 y -441 son responsables de la respuesta por elicitor (Kellmann *et al.*, 1996).

Estas enzimas se pueden ubicar tanto celular como extracelularmente. Por ejemplo las quitinasas clase I son vacuolares, mientras que las de clase II son apoplásticas. Seis aminoácidos en posición C-terminal son necesarios y suficientes para la localización vacuolar; sin este residuo su ubicación es apoplástica (Collinge *et al.*, 1993).

2.3.1.2 Rol en la fisiología vegetal.

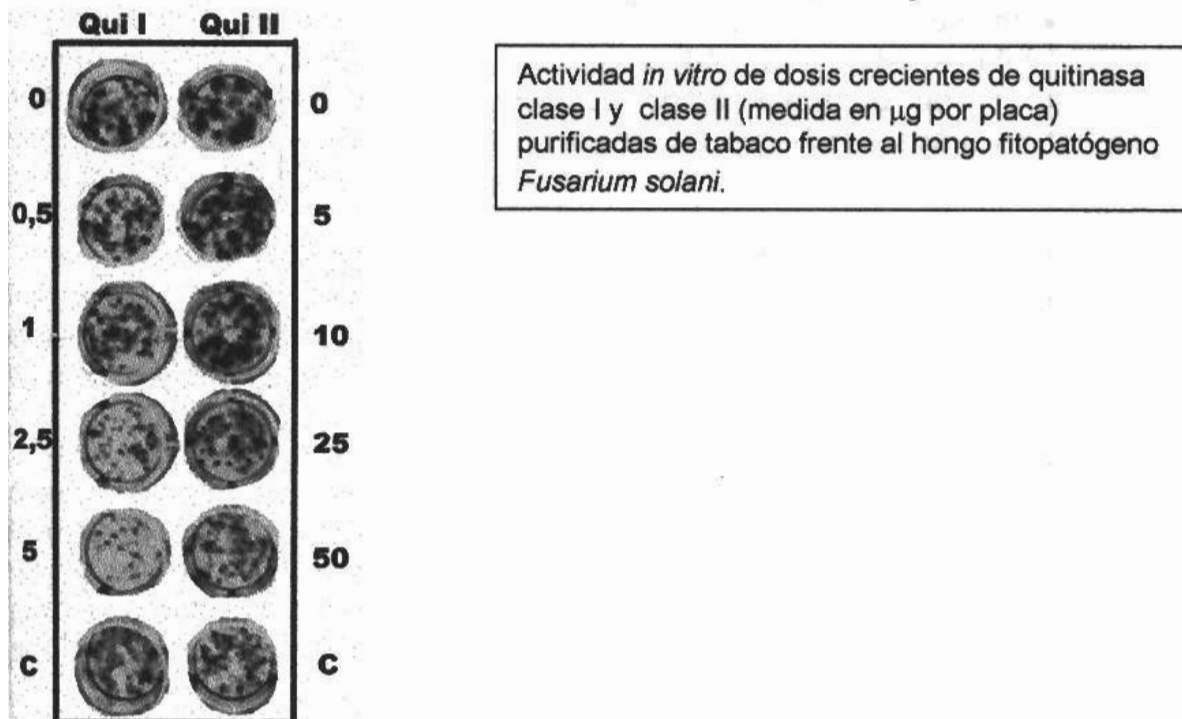
Las quitinasas son encontradas en bajas concentraciones en plantas sanas, incrementándose su expresión luego del ataque de un patógeno o en contacto con metales pesados (Oppenheim y Chet, 1992; Kellmann *et al.*, 1996). Es por ello que las quitinasas pertenecen al grupo de proteínas denominadas PR, las cuales se expresan como resultado directo de la infección de patógenos o agentes abióticos agresivos para el vegetal. Si a esto se le suma el hecho de que no hay quitina en las plantas, su rol defensivo se hace evidente.

Sin embargo, algunos autores le atribuyen a las quitinasas funciones en el desarrollo temprano del embrión y embriogénesis somática, indicando roles no defensivos (Collinge *et al.*, 1993).

Las quitinasas de ubicación apoplástica inhiben el crecimiento de las hifas, produciendo trozos de pared celular del hongo, los que sirven de nuevos elicitores para otros genes de defensa adicionales. Quitinasas de ubicación vacuolar se almacenan en grandes concentraciones y son liberadas cuando se da la lisis celular o cuando la vacuola es alcanzada por el haustorio del hongo (Samac y Shah, 1994), produciendo una respuesta muy importante en la reacción de defensa del vegetal. Por esta razón se debe estudiar el hábito de crecimiento de cada patógeno en particular para seguir una estrategia de defensa contra el mismo.

Mediante el estudio del crecimiento *in vitro* de distintos hongos en presencia de esta enzima purificada, se determinó su acción antifúngica de forma directa. Los resultados mostraron niveles diferenciales de actividad para las distintas clases estudiadas. Las quitinasas clase I mostraron mayor actividad respecto a las de clase II, las que no presentaron acción fungicida (Foto 2 ; Cuadro 2). (Sela-Buurlage *et al.*, 1993).

Foto 2. Actividad *in vitro* de quitinasas clase I y clase II.



Fuente: Sela-Buurlage *et al.*, 1993.

Su acción directa también se puede comprobar mediante la expresión de genes de quitinasas en organismos transgénicos. *Escherichia coli* transgénicas, produciendo quitinasas de la bacteria *Serratia marcescens* agregadas al agua de riego, protegieron significativamente a las plantas contra el patógeno del suelo *Sclerotium rolfsii* (Oppenheim y Chet, 1992).

Cuadro 2. Actividad específica de quitinasas aisladas de tabaco.

Enzima	Actividad específica (cpm/ μg)
Qui-I (32 kD)	10000-11000
Qui-I (34 kD)	17000-19000
Qui-II (PR-3a)	1000-1100
Qui-II (PR-3b)	1000-1100

Fuente: Sela-Buurlage *et al.*, 1993

Numerosos ejemplos confirman la acción de estas enzimas. Quitinasas bacterianas purificadas o el extracto celular de plantas transgénicas, hidrolizaron

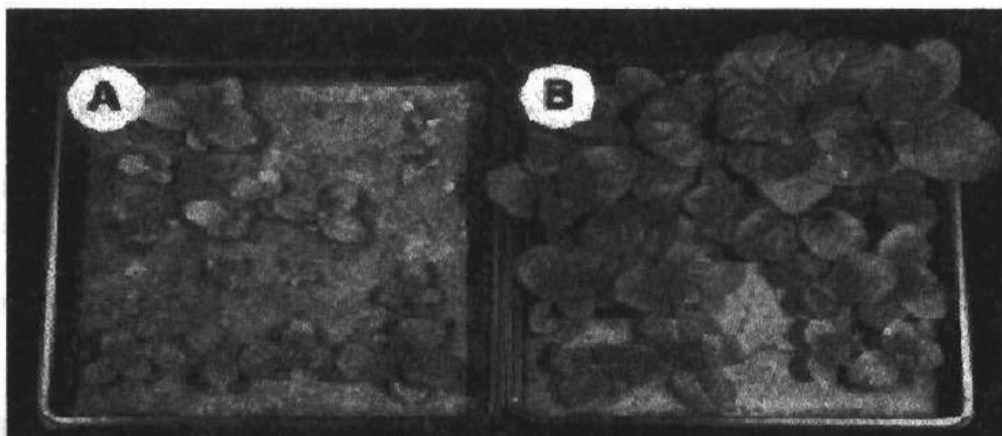
al hongo *S. rolfsii* *in vitro*, y a *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora megasperma* *in vivo* e *in vitro* (Kellmann *et al.*, 1996). Una endoquitinasa de tabaco aislada, mostró actividad antifúngica *in vitro* contra *Alternaria radicina* (Melchers *et al.*, 1994). En todos los casos, luego de comprobada su acción *in vitro*, se construyeron numerosas plantas transgénicas que expresaban, en su mayoría constitutivamente, genes de quitinasa.

La acción antifúngica de las quitinasas encontrada *in vitro*, se mantiene en las plantas transgénicas obtenidas, lo que evidencia que la inclusión de la enzima al metabolismo de la planta y a su interacción con el patógeno, no limita su acción antifúngica.

Diferencias significativas de comportamiento frente a patógenos entre plantas control sin transformar y plantas transgénicas ha entusiasmado a investigadores a adoptar este tipo de estrategias en sus programas de mejoramiento. Plantas de canola con expresión constitutiva de una quitinasa de poroto, presentaron resistencia significativamente mayor a *Rhizoctonia solani* que los controles sin transformar (Foto 3) (Benhamou *et al.*, 1993).

Plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan ARNm antisentido de quitinasa, presentaron niveles reducidos de esta enzima luego de la infección con *Botrytis cinerea* y debido a esto mayor susceptibilidad (Samac y Shah, 1994). Esto representa una importante prueba de la acción defensiva natural de las quitinasas en las plantas.

Foto 3. Canola transgénica con gen de quitinasa vs. Control.



- A - Plantas de Canola infectadas con *Rhizoctonia solani* (Control).
 B - Plantas de Canola transformadas con un gen de quitinasa infectadas con *Rhizoctonia solani*

Fuente: Benhamou *et al.*, 1993

La inserción aleatoria de un gen de quitinasa de expresión constitutiva en el genoma vegetal, puede afectar la integridad del mismo, lo que sumado a la especulación de las funciones alternativas de estas enzimas, podría estar alterando el normal desarrollo de la planta. Sin embargo, se ha constatado que niveles de cerca del 20% de proteína total intercelular, correspondiente a la proteína inserta, no afecta el desarrollo de la planta y no parecen representar un gasto energético significativo. (Mass *et al.*, no publicada).

Por otra parte plantas transgénicas de tabaco expresando constitutivamente quitinasa bajo el promotor fuerte CaMV 35S, no mostraron ninguna diferencia con las plantas control salvajes, en lo que respecta al crecimiento y al desarrollo. (Broglie *et al.*, 1993).

Se constata por último, que en todos los casos anteriormente citados son indistinguibles entre sí una quitinasa natural y una transgénica, lo que confirma que se mantiene el mismo procesamiento post-transcripcional y post-traducciona.

La sobreexpresión de una quitinasa de tabaco en plantas transgénicas de canola llevadas a campo determinaron que estas mostraran mayor tolerancia a los patógenos testados (*Cylindrosporium concentricum*, *Phoma lingam* y *Sclerotinia sclerotiorum*). Estos testajes se realizaron en diferentes regiones geográficas lo que valida la técnica. La protección lograda involucraba demora

en la aparición de síntomas y reducción en el número de lesiones (Grisson *et al.*, 1996).

2.3.2 β -1,3 – GLUCANASAS.

Estas proteínas al igual que las quitinasas pertenecen al grupo de proteínas PR. hidrolizan los enlaces del β -1,3-glucano, componente importante de la pared celular de muchos hongos y en especial del ápice en crecimiento de las hifas (Neuhaus *et al.*, 1992).

2.3.2.1 Estructura y clasificación.

Las β -1,3 glucanasas son proteínas no glicosiladas y en general intracelulares. Se distinguen tres clases que se diferencian en estructura, ubicación y actividad antifúngica. Las de clase I son isoformas básicas, de localización vacuolar mientras que las de clase II son acídicas y de localización apoplástica. Solamente una enzima clase III ha sido identificada hasta el momento, una proteína acídica extracelular que muestra una homología del 54% al 59% con las de clase II (Sela-Buurlage *et al.*, 1993).

Las enzimas vacuolares son más efectivas, lo que se debe tanto a una mayor actividad biológica como a una mayor concentración de esta enzima, debido a que se liberan cuando se da la lisis celular (Sela-Buurlage *et al.*, 1993). Estos autores también encontraron que enzimas de clase I, modificadas para cambiar su *targeting* resultaron más efectivas extracelularmente que las de clase II, lo que reafirma el concepto de su mayor actividad biológica independientemente de su ubicación (Foto 4).

2.3.2.2 Rol en la fisiología vegetal.

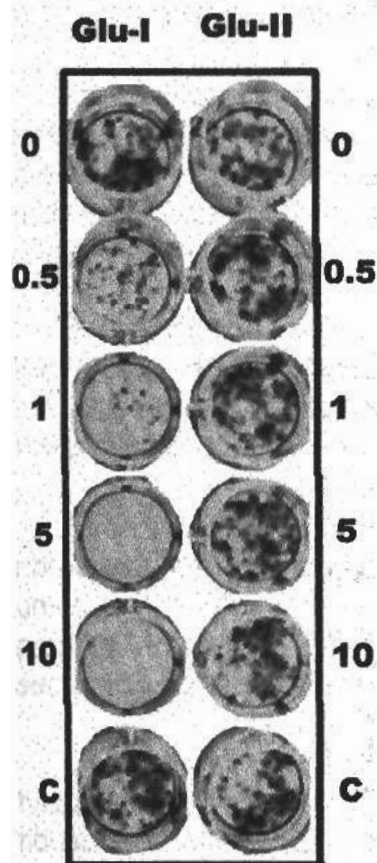
La ubicación celular de las glucanasas en las plantas es en raíces, epidermis de hojas bajas y semillas. Basándose en la ubicación de la enzima o un sustrato alternativo de la misma, la callosa, diversos autores citados por Neuhaus *et al.*, 1992, especulan que la enzima posiblemente tenga funciones adicionales a la defensiva. Se cree que puede estar involucrada en los procesos de división celular, biosíntesis de celulosa y regulación del transporte por el sistema vascular.

Sin embargo, a través de la construcción de plantas transgénicas que expresaban ARNm antisentido y por lo tanto con niveles muy reducidos de β -1,3-glucanasa, se demostró que las plantas crecían y se desarrollaban normalmente, no estando entonces involucradas en funciones de mantenimiento celular. Estas mismas plantas no mostraron mayores niveles de susceptibilidad a *Cercospora nicotiana*, como era esperado, lo que estaría indicando la poca incidencia de la enzima en relación al desarrollo de dicho patógeno (Neuhaus *et al.*, 1992).

No obstante esto, hay importantes evidencias de su rol defensivo ya que se ha comprobado que, en interacciones huésped-patógeno incompatibles (reacción de resistencia) la concentración de esta enzima es más alta que en reacciones de compatibilidad. Así mismo, se cita que en tabaco se expresan altos niveles de glucanasa en raíces como supuesta forma de protección permanente contra los hongos de la rizosfera, y que en hoja de poroto la β -1,3 endoglucanasa es usada como última línea de defensa, de manera que su función es ser liberada cuando la célula es atacada y destruida (Chang *et al.*, 1992).

Estudios *in vitro* de β -1,3-glucanasas, purificadas a partir de plantas de tabaco, mostraron una gran actividad frente a *Fusarium solani* (Sela-Buurlage *et al.*, 1993). Los mismos autores midieron las actividades específicas de estas enzimas purificadas, lo que se muestra en cuadro 3.

Existen pocos ejemplos de plantas transgénicas que expresan solamente genes foráneos de glucanasa. Se comprobó que plantas de tabaco transgénico que expresaban constitutivamente una glucanasa clase II de cebada, presentaban mayor resistencia a *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea* (com. pers. Jach, G.).

Foto 4. Actividad *in vitro* de glucanasas clase I y clase II

Actividad *in vitro* de dosis crecientes de glucanasa clase I y clase II (medida en μg por placa) purificadas de tabaco frente al hongo fitopatógeno *Fusarium solani*.

Fuente: Sela-Buurlage *et al.*, 1993

Cuadro 3. Actividad específica de β -1,3-glucanasas purificadas de tabaco.

Enzima	Actividad específica (nkat/mg)
Glu-I	400-500
Glu-II (PR-2a)	5-10
Glu-II (PR-2b)	5-10
Glu-II (PR-2c)	400-500

Fuente: Sela-Buurlage *et al.*, 1993

2.3.3 PROTEÍNAS INACTIVADORAS DE LOS RIBOSOMAS.

Las proteínas inactivadoras de los ribosomas o RIPs (ribosome inactivating proteins), son enzimas ARN N - glicosidasas que hidrolizan el enlace N - glicosídico entre una adenina y la ribosa. Modifican el ARNr 28S, importante en la unión del factor de elongación 2, inhibiendo de ésta forma la síntesis proteica. (Girgés *et al.*, 1996).

En todos los casos la depurinación del ARNr que lleva a la desactivación irreversible de los ribosomas, se realiza quitando una adenina de una secuencia ubicada dentro de un *loop* del ARNr altamente conservada (Girgés *et al.*, 1996; Prestle *et al.*, 1992).

Esta secuencia, 5' - AGUACGAGAGNANC - 3', se encuentra en todos los ribosomas estudiados hasta el momento. La adenina (A) es la responsable de la unión con el factor de elongación 2 (Girgés *et al.*, 1996). Se ha comprobado que para la acción de las RIPs es un requerimiento absoluto la existencia de la secuencia GAGA (Hartley *et al.*, 1996).

La ricina, extraída de *Ricinus communis*, es una de las RIPs más estudiadas hasta el momento. Esta proteína hidroliza la A 4234 del ARNr 28S de los ribosomas del hígado de ratón. También se encontró que los ribosomas de animales, hongos y bacterias son inactivados por la ricina (Girgés *et al.*, 1996).

Frente a este planteo surgió una de las principales interrogantes en cuanto a si las RIPs son capaces o no de inactivar los propios ribosomas vegetales. Algunos autores plantean que las RIPs son activas en varios ribosomas vegetales, pero no en todos (Girgés *et al.*, 1996); por otra parte otros autores afirman que las RIPs no inactivan los ribosomas de la planta y que muestran grados variables de actividad frente a ribosomas de especies relacionadas, así como en ribosomas de hongos (Logemann *et al.*, 1992).

Se han planteado diversas hipótesis para responder a esta pregunta y explicar los diferentes grados de actividad de las RIPs en distintos organismos:

- La diferencia de la sensibilidad a las RIPs entre los diferentes ribosomas, presumiblemente reside en las proteínas ribosomales, las que pueden permitir o no el acceso de las RIPs al ribosoma (Hartley *et al.*, 1996)
- Los ribosomas de las plantas que producen RIPs también son inactivados por sus propias RIPs. Se plantea la hipótesis de que las RIPs forman parte

de una estrategia de suicidio celular y que se ubican en la matriz de la pared celular, es decir su localización impide que inactive sus propios ribosomas (Prestle *et al.*, 1992; Reinbothe *et al.*, 1994).

Con respecto a esta última hipótesis se ha comprobado que las RIP-PAP (RIPs aisladas de *Phytolacca americana*) se ubican mayoritariamente en la matriz de la pared celular y pequeñas cantidades en la vacuola y las RIP-Saponas (RIPs aisladas de *Saponaria officinalis*) se ubican en el espacio intercelular y en vacuolas. La necesidad de dirigir las RIPs a diferentes compartimentos depende de la sensibilidad de los ribosomas coespecíficos (Hartley *et al.*, 1996).

Se han detectado RIPs en 50 especies (13 familias) de angiospermas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, en la mayoría de los órganos y tejidos, y en dos especies de bacterias. Son muy diversas en cuanto a su toxicidad en mamíferos y en su especificidad *in vitro* hacia ribosomas de diferentes fuentes. Muchas RIPs están reguladas con el desarrollo y son órgano específicas (Hartley *et al.*, 1996).

2.3.3.1 Clasificación y estructura.

Respecto a la estructura de las RIPs, la más conocida es la ricina, considerada como el arquetipo de las RIPs. La ricina es un heterodímero glicosilado de estructura globular. La cadena A, que presenta tres dominios tiene 267 aminoácidos, de los cuales el 50 % están arreglados como hélice α o lámina β . La cadena B contiene 262 aminoácidos, organizados en dos dominios homólogos (bilobal), cada uno unido a una galactosa. La estructura terciaria se encuentra altamente conservada entre las diferentes RIPs analizadas. Las mayores diferencias se ubican en la región carboxilo terminal (Hartley *et al.*, 1996).

Se han realizado dos clasificaciones en base a su estructura molecular y su actividad (Hartley *et al.*, 1996). Considerando ambas clasificaciones se describen a continuación los diferentes tipos de RIPs.

RIPs tipo 1.

Las RIPs de tipo 1 son glicoproteínas de una sola cadena polipeptídica. Son más numerosas que las del tipo 2 y menos citotóxicas. Pueden penetrar a la célula por la fase fluida de la endocitosis.

A continuación se presenta un cuadro en donde se muestran las RIPs tipo 1 que han sido identificadas y su origen.

Cuadro 4. Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas tipo 1.

Familia Vegetal	Especie	Organo	RIP
<i>Earyophyllaceae</i>	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Hoja	Dianthin 30
		Hoja	Dianthin 32
	<i>Saponaria officinalis</i>	Raíz	Saporin - R1
		Semilla	Saporin - S6
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	Raíz	Trichosantin
		Raíz	p-Trichosantin
		Raíz	TAP 29
	<i>Momordica charantia</i>	Semilla	Momordin
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Gelonium multiflorum</i>	Semilla	Gelonin
<i>Nyctogineceae</i>	<i>Mirabilis jalapa</i>	Raíz	MAP
<i>Phytolaccaceae</i>	<i>Phytolacca americana</i>	Hoja	PAP
		Hoja	PAP II
<i>Poaceae</i>	<i>Triticum aestevum</i>	Hoja	Tritin - L
		Semilla	Tritin - S
	<i>Hordeum vulgare</i>	Semilla	Barley RIP

Fuente: Hartley, *et al.*, 1996

RIPs tipo 2.

Las RIPs del tipo 2 presentan dos cadenas polipeptídicas. La cadena A enzimáticamente activa (similar a la de tipo 1) y la cadena B con función lectina. Ambas cadenas se unen covalentemente mediante uniones disulfuro. La cadena B se une a la célula por interacción con los galactósidos de la superficie celular, luego se internalizan y la introducción de la cadena A en el citosol provoca la muerte celular (Hartley *et al.*, 1996).

Este tipo de RIP probablemente se origine de la fusión de un gen ancestral de tipo 1 y un gen de lectina. Son menos comunes que las RIPs de tipo 1 pero más tóxicas (Hartley *et al.*, 1996; Girgés *et al.*, 1996). En el cuadro 5 se muestran las RIPs tipo 2 y su origen.

Cuadro 5. Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas Tipo 2.

Familia Vegetal	Especie	Organo	RIP
<i>Caprifoliaceae</i>	<i>Sambucus nigra</i>	corteza	Nigrin b
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Ricinus communis</i>	semilla	Ricin
<i>Fabaceae</i>	<i>Abrus precatorius</i>	semilla	Abrin
<i>Passifloraceae</i>	<i>Adenia digitata</i>	raíz	Modeccin
	<i>Adenia volkensii</i>	raíz	Volkensin
<i>Viscaceae</i>	<i>Viscum album</i>	hoja	Viscumin

Fuente: Hartley *et al.*, 1996

RIPs tipo 4.

Este tipo de RIPs han sido las últimas en describirse. Presentan dos dímeros asociados por fuerzas no covalentes y cada dímero se corresponde a dos polipéptidos unidos por puentes disulfuro (semejantes a las RIPs de tipo 2).

Se han clasificados en tóxicas y no tóxicas frente a ribosomas de mamíferos. Dentro de las primeras se citan los ejemplos de aglutininas de *Ricinus communis* y de aglutininas de *Abrus precatorius* y dentro de las segundas se citan aglutininas de *Viscum album* (Hartley *et al.*, 1996).

2.3.3.2 Propiedades antivirales y antifúngicas de las RIPs.

Las RIPs pueden actuar en la defensa contra el ataque de patógenos, especialmente contra hongos y virus.

Las RIPs puras de diferentes fuentes poseen actividad contra virus vegetales y animales de manera no específica. Selectivamente entran al citosol de las células infectadas e inactivan los ribosomas, limitando la replicación viral. Pueden acceder al citosol de la célula vegetal cuando la integridad del plasmalema es rota por un vector de transmisión viral como los áfidos (Hartley *et al.*, 1996).

El rol antiviral de estas proteínas ha sido comprobado, como en el caso de otras proteínas de defensa, mediante la generación de plantas transgénicas. La mayor evidencia del rol antiviral (anti PVX y PVY) de las RIPs se ha comprobado en tabaco y papas transgénicas, mediante la expresión de una ADNc de PAP

(Lodge *et al.*, 1993). Las RIP-PAP junto con las Diantinas y Saporinas han sido descritas como las más activas (Hartley *et al.*, 1996).

Las RIPs también presentan actividad antifúngica. Esta actividad ha sido comprobada *in vitro* donde las RIPs purificadas inhiben el crecimiento de hongos. A su vez, se han construido plantas de tabaco transformadas con genes de RIPs de cebada que fueron altamente resistentes a la infección con *Rhizoctonia solani* (Logemann *et al.*, 1992).

Hasta el momento las RIPs han sido usadas como inmunotoxinas, como agentes antivirales en plantas transgénicas y como agentes anti - HIV (Logemann *et al.*, 1992).

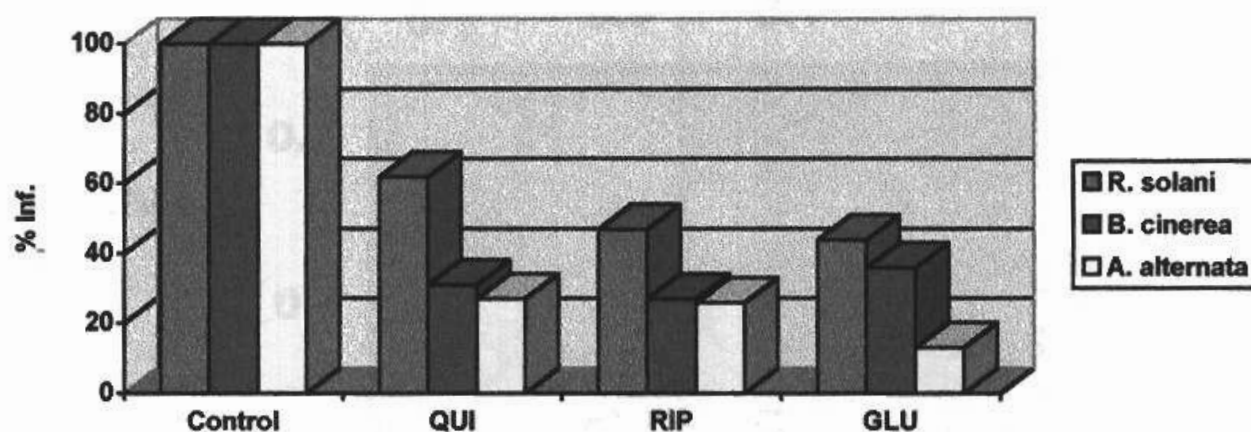
2.3.4 COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE QUITINASAS, β -1,3-GLUCANASAS Y RIPs

El trabajo realizado por Mass *et al.** resume los efectos de estas tres proteínas, en plantas de tabaco transgénicas con genes RIP, quitinasa y glucanasa de cebada por separado. Los niveles de expresión de estas proteínas en las tres plantas transgénicas (expresado como porcentaje de proteína en el lavado de fluido intercelular- IWF) fueron 2,1 %, 4,2 % y 16,2 % respectivamente.

Las plantas transgénicas fueron infectadas con tres hongos: *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*. En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos para los diferentes desafíos.

* MAAS,C.; FRANKEN,P.; JACH,G.; PINSdorf,E.; GIANINAZZI-PEARSON,V.; SCHELL,J.; GIEFFERS,W. Barley antifungal proteins mediate resistance to the fungal pathogens *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea* in transgenic tobacco without affecting the mycorrhizal symbiont *Glomus mosseae*. EN PRENSA

Figura 5. Transgénicos de tabaco expresando Quitinasa, RIP y β -1,3-glucanasas vs. Control.



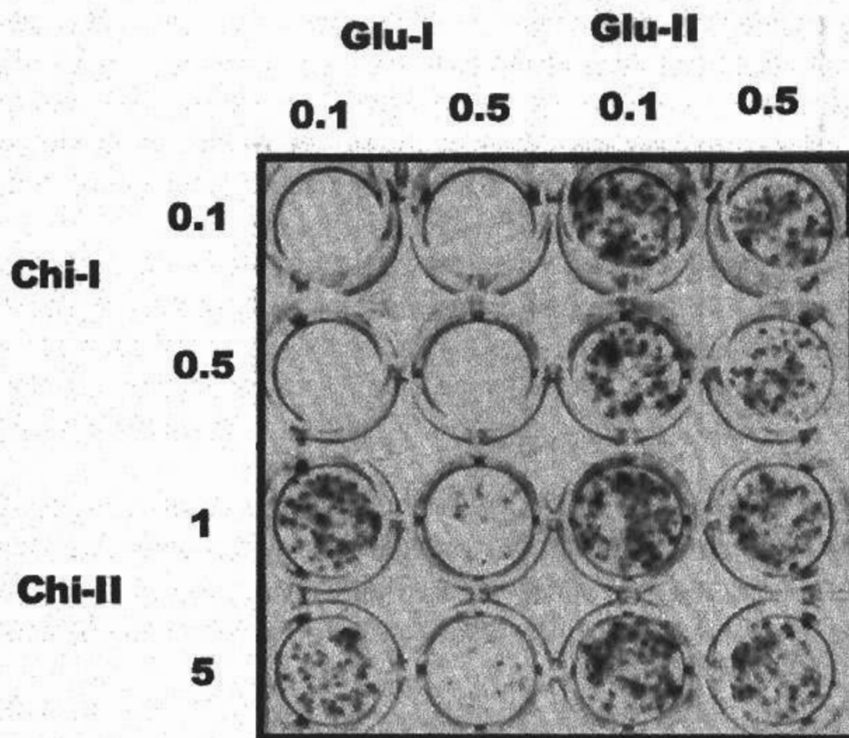
Fuente: Mass *et al.* (en prensa)

2.3.5 ACCIÓN SINÉRGICA: QUITINASAS, β -1,3-GLUCANASAS Y RIPs.

En los hongos, la hifa en crecimiento va produciendo en su ápice quitina y β -1,3- glucano simultáneamente. Una vez que las hifas envejecen, las paredes se recubren y entrelazan con otros polisacáridos y proteínas, por lo que se va haciendo inaccesible al ataque enzimático (Collinge *et al.*, 1993); de aquí la importancia en el rol defensivo, de la acción conjunta y temprana de quitinasas y β -1,3-glucanasas.

Ambas enzimas actúan sinérgicamente lo cual ha sido verificado en diversas oportunidades. Enzimas purificadas mostraron importante acción fungicida *in vitro* contra *Fusarium solani* cuando actuaban conjuntamente. Como se muestra en la foto 5, la mayor actividad antifúngica se comprobó cuando se adicionaba quitinasa tipo I y glucanasa tipo I (Sela-Buurlage *et al.*, 1993).

Foto 5. Actividad sinérgica de Quitinasas y Glucanasas.



Fuente: Sela-Buurlage *et al.*, 1993

Basado en esto, Jongedijk *et al.* (1995) y Zhu *et al.* (1994), contribuyeron con la primera evidencia experimental de este sinergismo observado *in vitro*, construyendo plantas doble transgénicas. El objetivo era comprobar si este fenómeno se mantenía *in vivo* y si confería mejores niveles de resistencia respecto a los controles salvajes o transgénicos simples.

Con tal fin construyeron transgénicos simples y luego los cruzaron para obtener el doble transgénico. Esta estrategia permitió comparar el doble transgénico con los simples, ya que al ser los mismos eventos de transformación se evitaron diferencias causadas por el lugar de inserción o número de copias.

Se testó la susceptibilidad contra *Cercospora nicotiana* de plantas de tabaco transformadas con quitinasa de arroz y β -1,3 endoglucanasa de alfalfa (Zhu *et al.*, 1994); y la susceptibilidad contra *Fusarium oxysporum* f.sp. de tomate transformado con una quitinasa clase I y una β -1,3-endoglucanasa clase I de tabaco (Jongedijk *et al.*, 1995).

En ambos casos se observó un aumento en la protección contra los patógenos reduciéndose hasta 75% la severidad en tabaco y entre 36% - 58% en tomate. Esto ha resultado en un interesante enfoque de las estrategias de construcción de plantas transgénicas resistentes. Además, esta estrategia presenta menor probabilidad de quiebre de resistencia, por lo que puede ser una invaluable ayuda para diseñar una amplia y durable resistencia a campo.

Los efectos de protección observados fueron debidos a una demora en la aparición de la primera lesión visible y reducción en el tamaño y número de lesiones; esto es dado por la lisis de la pared celular y la posterior lisis del hongo, así como por la liberación de glucano y quitina, potentes elicitores del sistema de defensa de la planta (Dixon y Harrison, 1990).

La inhibición del desarrollo fúngico que ejercen las RIPs está potenciada por la presencia de enzimas que degradan la pared celular de los hongos como las quitinasas y β -1,3-glucanasas. Nuevamente se resalta la importancia de la acción sinérgica de dos o más proteínas de defensa.

Combinaciones de RIP de semilla de cebada con quitinasas y glucanasas del mismo origen, actúan sinérgicamente en la inhibición del crecimiento micelial de *Trichoderma reesei* y *Fusarium sporotrichioides* (Hartley *et al.*, 1996). La expresión combinada de quitinasas, glucanasas y RIPs en tabaco transgénico, dio una protección significativa contra el hongo *Rhizoctonia solani*, en comparación con la línea que expresaba un solo transgén (Girgés *et al.*, 1996).

2.3.6 OSMOTINAS.

Las osmotinas y las proteínas tipo osmotinas son producidas en los vegetales en respuesta a múltiples factores, tales como: altas concentraciones de cloruro de sodio, desecación, etileno, ABA, heridas, virus, luz UV, hongos, etc. (Liu *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1996). Estos factores activan la formación de las proteínas, que son codificadas por una familia de multigenes (Zhu *et al.*, 1996).

Las osmotinas forman parte de la gran familia de proteínas tipo taumatinas (Reimann y Dudler, 1993) las que presentan actividad antifúngica contra varios hongos (Zhu *et al.*, 1996).

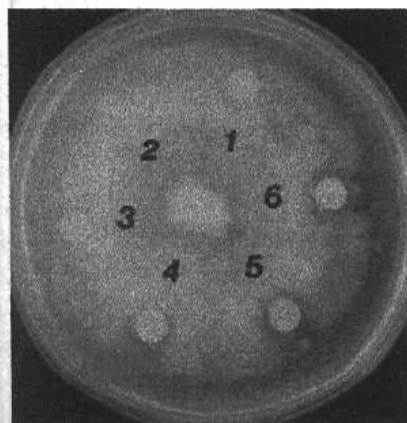
En vid (*Vitis vinifera* cv. Muscat de Alexandria) se ha determinado que la acumulación de la proteína tipo taumatina VVTL1 aumenta con la maduración de la baya y se correlaciona con la incapacidad de iniciar nuevas infecciones de

bayas por el hongo *Uncinula necator* (Tattersall *et al.*, 1997). De esta manera se evidencia las funciones de estas proteínas dentro del desarrollo fisiológico normal de las plantas.

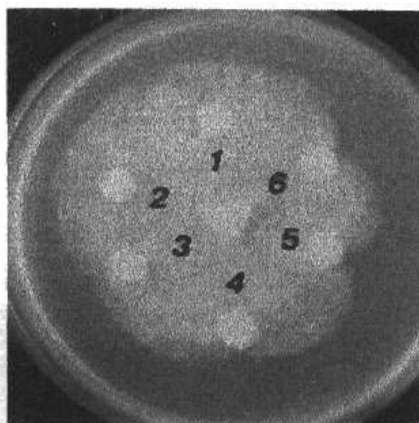
El concepto se reafirma mediante la evaluación de la actividad *in vitro*. Las osmotinas han mostrado actividad antifúngica contra *Phytophthora infestans* (Woloshuk *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 1996) lo que demuestra la importancia de su rol dentro del complejo defensivo de las plantas. Sin embargo, la actividad antifúngica *in vitro* de las osmotinas es variable entre patógenos y es específica contra micelios y esporas (Liu. *et al.*, 1994)

A modo ilustrativo, a continuación se muestra el efecto de distintas concentraciones de osmotina sobre el crecimiento en placa de los hongos *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* y *Phytophthora infestans* (Foto 6, A y B respectivamente).

Foto 6. Efecto inhibitorio de osmotina de tabaco sobre crecimiento de hifas de *P. parasitica* var. *nicotianae* (A) y *P. infestans* (B)



(A)



(B)

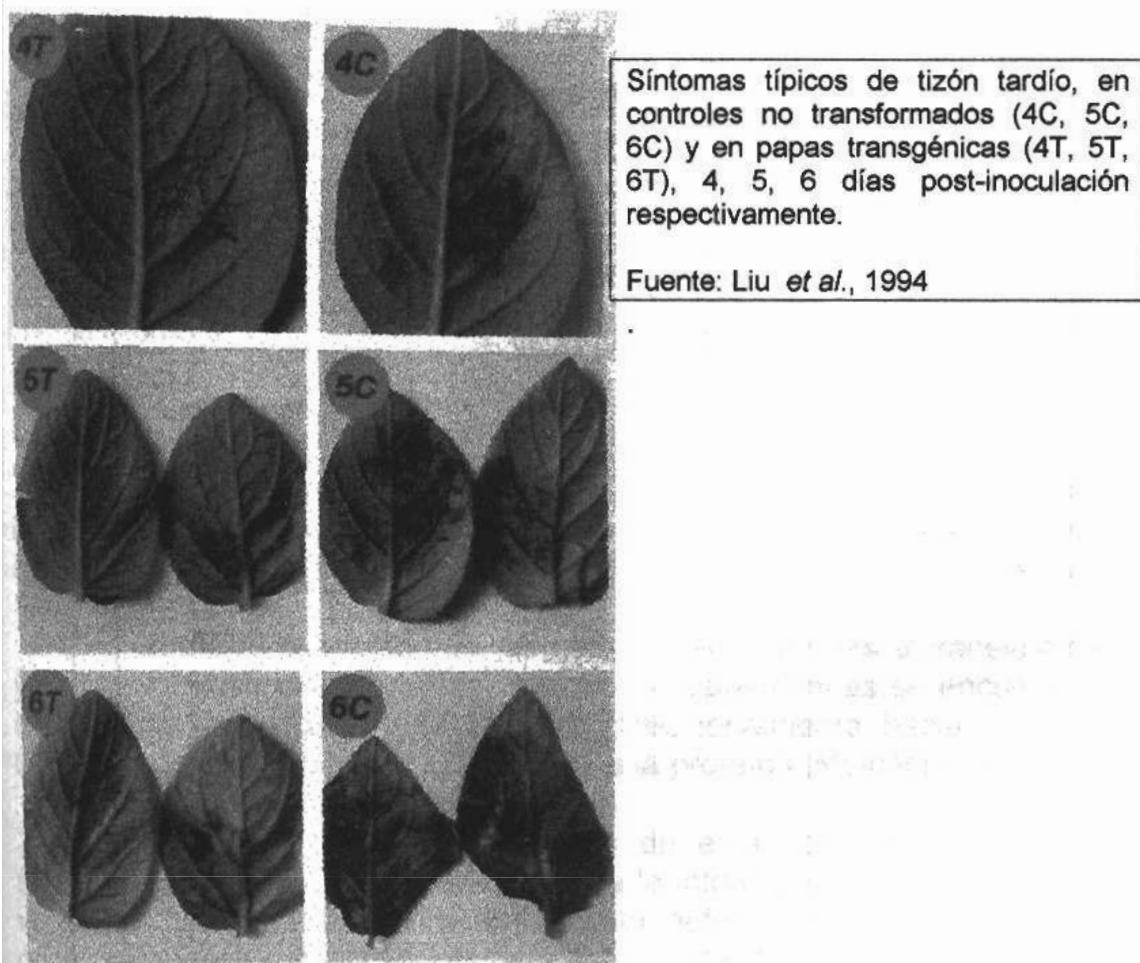
Fuente: Liu. *et al.*, 1994

Los productos de los genes PR son activos contra microorganismos que no son patógenos en la especie vegetal que sirve de fuente para dichos genes. Este hecho puede deberse al resultado de la co-evolución huésped-patógeno (Liu *et al.*, 1994).

La actividad antifúngica de estas proteínas, también se ha comprobado mediante la obtención de transgénicos. La sobreexpresión de una osmotina de tabaco (pA13) retrasa el desarrollo de los síntomas de *Phytophthora infestans* en

papa, no ocurriendo lo mismo para otros oomycetes (Foto 7). Nuevamente se comprueba que existe una especificidad biológica entre la actividad de estas proteínas y los patógenos (Zhu *et al.*, 1996). Estos autores sugieren que el tiempo de expresión de la osmotina pA13 es más importante que el nivel absoluto de la misma, una vez alcanzado cierto umbral.

Foto 7. Comparación de transgénicos infectados con *P. infestans* vs. control



2.3.6.1 Osmotina AP24.

Basados en antecedentes que determinan que los oomycetes son insensibles a la acción de las quitinasas y a la mezcla de quitinasas y glucanasas, Woloshuck *et al.*, (1991), plantean la hipótesis de la existencia de otros factores con actividad antifúngica en plantas que han sido inducidas por un hongo oomycete. En base a esta hipótesis, aislaron este factor y determinaron que la actividad inhibitoria era

proteica, que la proteína es de carácter muy hidrofóbico y que presenta un PM de 24 Kd.

A partir de la secuenciación de la región N terminal de esta proteína (Cuadro 6), se determinó que era exactamente igual a una osmotina de tabaco (osmotina II) y similar a otras osmotinas de otras especies. A esta proteína se la denominó AP 24.

Cuadro 6. Secuencia N-terminal de la proteína AP24 y otras osmotinas.

Osmotina	Secuencia N-terminal
AP 24 de tabaco	ATIEVRNNCPYTVWAASTPIGGGRRLDRGQTWVINAPRGT
Osmotina I tabaco	ATIEVRNNCPYTVWAASTPIGGGRRLDRGQTWVINAPPGT
Osmotina II tabaco	ATIEVRNNCPYTVWAASTPIGGGRRLDRGQTWVINAPRGT
AP 24 tomate	ATFEVRNNCPYTVWAASTPIGGGRRLD
NP 24 tomate	ATIEVRNNCPYTVWAASTPIGGGRRLNRGQTWVINAPRGT

Fuente: Woloshuck *et al.*, 1991

A partir de ensayos inmunológicos se determinó que esta proteína correspondía al grupo PR5 y se comprobó que causaba disminución del crecimiento de *Phytophthora infestans in vitro* (Woloshuck *et al.*, 1991).

Existen diferentes isoformas de esta proteína: formas extracelulares (ácidas) y formas intracelulares (básicas). Dentro de estas últimas se encuentra la AP 24 de localización vacuolar. El correcto direccionamiento hacia la vacuola está determinado por el extremo C terminal de la proteína (Melchers *et al.*, 1993)

Las secuencias de los propéptidos de estas proteínas no muestran una secuencia consenso obvia que contenga la información para el direccionamiento vacuolar. Se propone que la señal esta determinada por propiedades físico-químicas y/o estructurales del propéptido (Melchers *et al.*, 1993). Así mismo mediante mutaciones en el péptido señal, se puede lograr el direccionamiento de la AP24 al espacio intercelular

2.3.6.2 Mecanismo de acción.

Se han planteado distintas hipótesis que explican el mecanismo de acción de las osmotinas.

Se propone la existencia de una combinación de efecto lítico y de inhibición del crecimiento, sugiriendo actividad hidrolítica de la pared celular (Woloshuck *et al.*, 1991). La AP24 interacciona con la membrana plasmática del hongo, debido a su naturaleza hidrofóbica, causando la lisis y la posterior inhibición del crecimiento. Esta hipótesis es soportada por el hecho de que la AP24 aislada de tomate, que es menos hidrofóbica que la de tabaco, presentaba menor actividad antifúngica.

Por otro lado, se plantea que las osmotinas pueden contener dominios estructurales que interaccionen con los receptores de la membrana del hongo formando poros en dicha membrana (Liu *et al.*, 1994).

Se ha visto agregación citoplasmática en los primeros estadios de la reacción de resistencia a hongos en papa. La agregación citoplasmática es una traslocación rápida del citoplasma al sitio donde penetra el hongo debido a la polimerización de la actina. Se detectaron dos proteínas asociadas a la actina que fueron identificadas como quitinasa (32Kd) y una proteína tipo osmotina (22Kd). Es posible que las quitinasas básicas y las proteínas tipo osmotinas sean traslocadas mediante filamentos de actina durante la agregación citoplasmática, para participar en las respuestas de defensa de las plantas al ataque del patógeno (Takemoto *et al.*, 1997).

2.3.7 PROTEÍNAS ASESINAS.

El virus *Ustilago maydis virus* (Umv) parasita, como su nombre lo indica, al hongo *Ustilago maydis*. Este virus produce una toxina específica contra distintos subtipos del hongo, diferentes al subtipo que parasita. De esta manera elimina competencia para su hospedero al eliminar subtipos que pudieran competir en la misma planta.

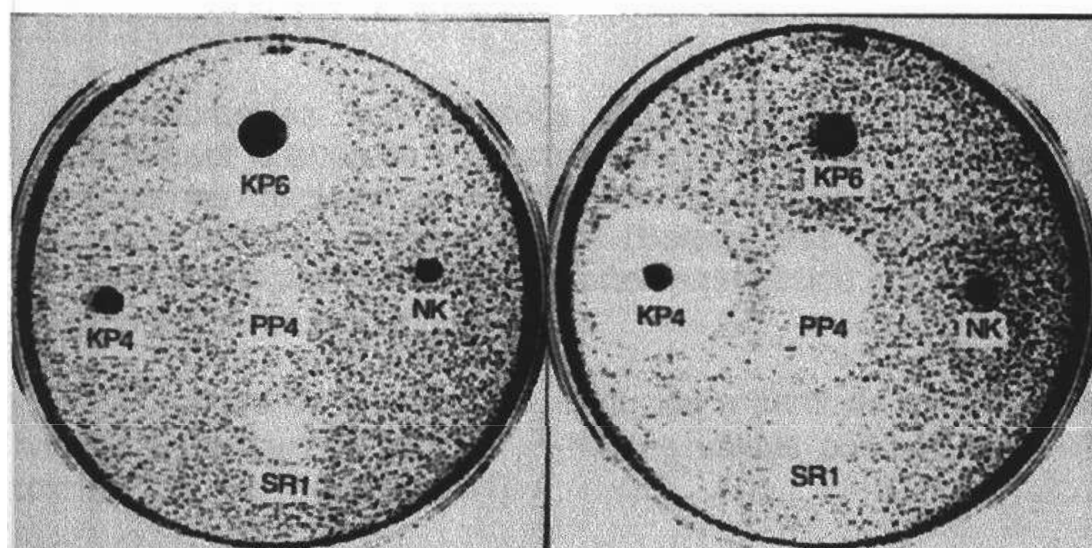
Esta proteína fue denominada proteína asesina (*Killer Protein* o Kp). Es una proteína de 11 Kd que actúa inhibiendo canales de calcio en las membranas de las células susceptibles.

Cuando se evaluó la actividad de la proteína como inhibidor del crecimiento del hongo *in vitro* se demostró la alta especificidad que la misma posee contra

distintos subtipos del hongo *Ustilago maydis* (Park *et al.*, 1996). Discos de papel de filtro estériles que contenían una solución de la proteína Kp4 (Killer protein del subtipo 4 de *U. maydis*) creó un halo de inhibición sobre el crecimiento en placa del subtipo 6 de *U. maydis*, pero no sobre el crecimiento del subtipo 4. A su vez la proteína Kp6 actuó de manera inversa inhibiendo el desarrollo en la placa de *U. maydis* subtipo 4, pero no la del subtipo 6 (Foto 8) (Park *et al.*, 1996).

Adicionalmente los autores crearon plantas transgénicas de tabaco las cuales expresaban el gen de la proteína Kp4, bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S. De esta manera se obtuvieron altos niveles de expresión de una proteína idéntica a la Kp4 real, lo que indica que fue procesada correctamente por la célula vegetal y no fue glicosilada, ya que además mostró una alta especificidad y efectividad al inhibir el crecimiento en placa de las cepas susceptibles. Estas plantas transgénicas se comportaron de forma totalmente normal, tanto en su crecimiento como en su desarrollo, aún conteniendo gran concentración de la proteína.

Foto 8. Actividad *in vitro* de las proteínas Kp4 y Kp6.



Placa *U. maydis* subtipo 4

Placa *U. maydis* subtipo 6

Fuente: Park *et al.*, 1996

La proteína Kp6 consiste de dos polipéptidos, α y β , los cuales son correctamente procesados por la célula vegetal al igual que en la célula fúngica. Una protoxina es clivada por la proteasa Kex2p (común en células eucariotas) dando los polipéptidos alfa y beta. Los péptidos producidos por plantas

transgénicas interactuaban correctamente con el péptido complementario natural. Todo esto indica, que estas proteínas tienen señales de procesamiento que pueden ser reconocidas tanto por la célula fúngica como por la vegetal (Kinal *et al.*, 1995).

Se especula que el mecanismo de resistencia se encuentra a nivel de receptores de membrana, por ejemplo, existe un caso de producción de Kp por *Saccharomyces cerevisiae* que introduce nuevos canales de iones en las membranas celulares (Park *et al.*, 1996). Sin embargo no se conoce con certeza.

Estos ejemplos muestran la existencia de proteínas de acción antifúngica, muy efectivas y específicas, cuya sobreexpresión no altera el comportamiento normal de la planta. Podrían ser tenidas en cuenta para la generación de plantas resistentes a ciertos patógenos, incluso a nivel subtipo específico.

A medida que se avance en este campo, más moléculas de este tipo serán descritas y clonadas, pudiendo tener alguna de ellas importancia antipatogénica real en un programa de mejoramiento.

2.3.8 CECROPINAS.

Las cecropinas son péptidos antibacterianos de 35-37 aminoácidos, secretados por la pupa de *Hyalophora cecropia* (gusano de seda) en respuesta a infecciones bacterianas. Todas las cecropinas, son traducidas como propéptidos de 62 - 64 aminoácidos (Boman, 1991), carecen de cisteínas y contienen una región N - terminal fuertemente básica y en la mitad C - terminal una gran extensión hidrofóbica.

La estructura de la cecropina, deducida a partir de estudios de resonancia magnética nuclear, es de dos α -hélices unidas por una región bisagra que contiene Gly-Pro (Boman, 1991).

Las cecropinas parecen estar ampliamente distribuidas en el reino animal y son altamente activas contra bacterias (tanto gram-negativas como gram-positivas) y no frente a células eucariotas.

Se ha visto que forman canales en membranas artificiales, pero aún no está claro si este es el mecanismo responsable de la muerte bacteriana (Gudmundsson *et al.*, 1991; Boman, 1991).

Estudios *in vitro* con extractos de plantas de papa (cv. Desirée) transformadas con genes de cecropina evidenciaron actividad antibacteriana contra *Pseudomonas solanacearum*. El análisis fenotípico de las plantas transformadas reveló que no existieron alteraciones fenotípicas durante la transformación y la regeneración (Montanelli y Nascari, 1991).

De la evaluación de dichos transgénicos se concluyó que existía una alta variabilidad de la respuesta de las plantas transgénicas a *P. solanacearum*. Se detectaron líneas más resistentes, así como más susceptibles. Esto pudo deberse a diferentes modelos de expresión de los genes insertados. No se pudo atribuir la mayor resistencia a la actividad del nuevo gen introducido.

Papas transgénicas con un gen que codificaba para el precursor polipeptídico de este péptido no mostraron mayor resistencia contra *Erwinia carotovora*, quizá por una rápida degradación proteolítica del precursor de cecropina con el que se transformó (Allefs *et al.*, 1995).

Se realizaron varias construcciones del gen cecropina B tanto de expresión en el citosol como para su secreción (Florack *et al.* 1995). Con estos genes se transformaron plantas de tabaco, pero en ninguna de las plantas transgénicas se detectó el péptido de cecropina, quizá por una rápida degradación proteolítica. Igualmente se evaluó la resistencia de estas plantas contra *Pseudomonas solanacearum*, no encontrándose ningún resultado positivo.

Plantas de papa de las variedades Atlantic y FL1607 transformadas con un gen de cecropina unido a un péptido señal fueron evaluadas contra *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* y *atroseptica*. Esta evaluación reveló una moderada (10 - 20 %) disminución en la maceración del tubérculo respecto al control no transformado. (Hassan *et al.*, 1993)

Hightower *et al.*, 1994 obtuvieron plantas de tabaco transgénicas con un gen sintético de cecropina. Dichas plantas fueron evaluadas respecto a si presentaban mayor resistencia a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, pero al igual que en los casos antes citados, no mostraron diferencias con el control.

2.3.9 LISOZIMAS.

Las lisozimas son enzimas endo-glicosidasas que catalizan la hidrólisis de los polisacáridos de la pared celular bacteriana (ácido N-acetil glucosamina-ácido y N-acetil murámico).

Las lisozimas son una familia de enzimas con actividad lítica específica, dirigida a la pared celular bacteriana, ampliamente distribuida en diferentes especies de animales, plantas y bacteriófagos. Un gen de *Bombyx mori* (gusano de seda) que codifica para lisozima fue aislado y caracterizado, y a partir de su secuenciación parcial se determinó su homología con otro gen de lisozima aislado de pollo (Lee y Brey, 1995).

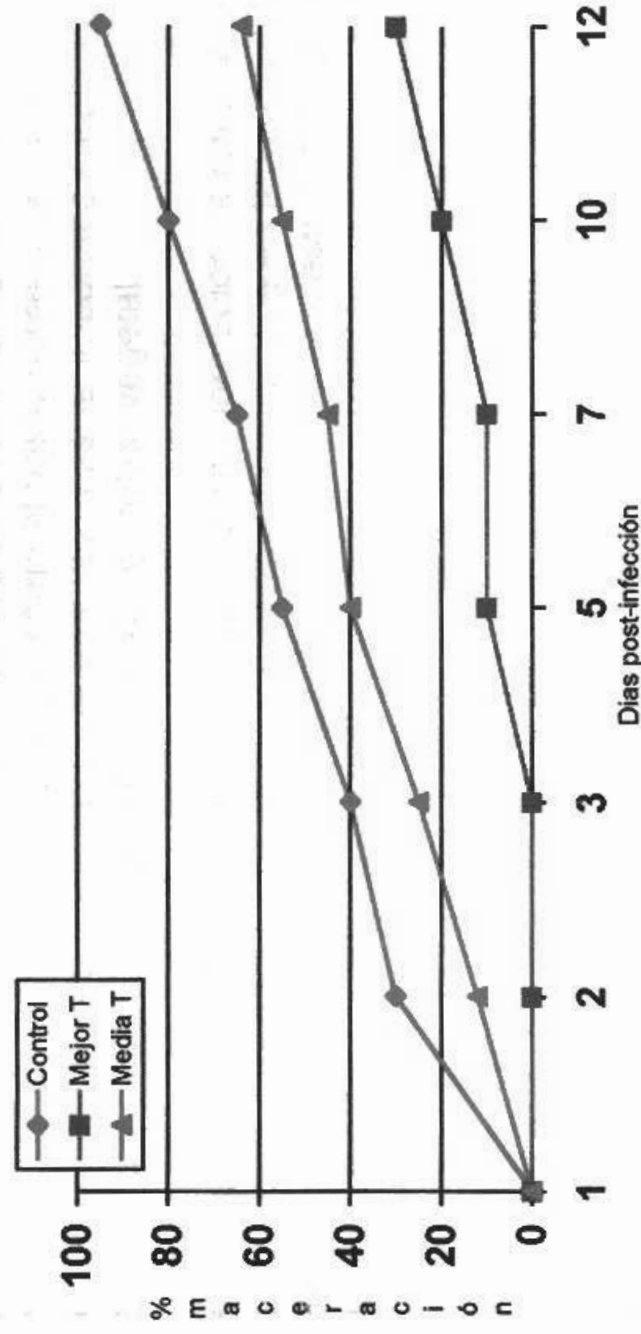
En varias especies vegetales se han detectado enzimas bifuncionales, con actividad lisozima más quitinasa, localizadas en la vacuola o asociadas a la pared celular. La actividad dominante es la de quitinasa y el efecto lítico en los péptidoglicanos es mucho menor que el de las lisozimas de mamíferos y bacteriófagos (Düring, 1993).

De tejidos de callo de naranja cv. Valencia fueron aisladas siete endoquitinasas. Las mismas exhibieron actividad quitinasa, lisozima y quitosanasa. La actividad lisozima se detectó a pH 4,5 y fuerza iónica baja, mientras que la actividad quitinasa estaba presente a pH 5 y a mayor fuerza iónica (Mayer *et al.*, 1996).

Usando diferentes bacterias como sustrato, se detectó una variación significativa en la actividad de una lisozima de papa hacia las diferentes especies fitopatógenas (Düring, 1993).

La lisozima del bacteriófago T4 es la más activa tanto contra bacterias gram negativas, como gram positivas. Plantas de papa fueron transformadas con un gen de esta lisozima y un péptido señal de una α -amilasa, de manera de dirigir la enzima al espacio extracelular ya que la bacteria para la cual se esperaba resistencia (*Erwinia carotovora*) se localiza en el apoplasto. En las plantas transgénicas se observó una reducción significativa en la maceración de los tejidos de disco de tubérculos (Figura 7) (Düring *et al.*, 1993).

Figura 6. Reducción de severidad en la infección de *E. carotovora* en tubérculos de papa transgénica.



Fuente: Düring et al., 1993

Estimaciones de los niveles de lisozimas y cecropinas que eran necesarios en los tubérculos para controlar *Erwinia carotovora* fueron hechas mediante la infiltración de soluciones de estas enzimas. Si bien ambas enzimas fueron letales para *E. carotovora* subsp. *Carotovora*, *atroseptica* y *chrysanthemi*, la lisozima fue más efectiva que la cecropina en la prevención de la infección.

2.4 CONSIDERACIONES FINALES.

El análisis de las diferentes estrategias que se utilizan en la actualidad para la generación de plantas transgénicas, así como el vasto número de genes que se han clonado con dicho fin, reafirma una vez más la importancia de estas nuevas técnicas en el campo del mejoramiento genético vegetal.

En lo que respecta al uso de las estrategias de transformación, la revisión de las publicaciones científicas más recientes, permite concluir que en la actualidad y en un futuro cercano se pondrá mayor énfasis en el uso de estrategias cada vez más racionales. Esto significa el empleo de promotores inducibles que respondan a los patrones normales de expresión de los genes en la planta, así como a la generación de plantas capaces de generar respuestas más rápidas y eficaces frente a un estrés biótico.

Una mayor racionalidad exige un conocimiento cada vez mayor de la fisiología vegetal como un todo, lo que implica la necesidad de interaccionar con otras áreas de investigación vegetal.

La biotecnología y en particular la ingeniería genética, debe responder rápidamente a las grandes necesidades alimenticias demandadas por la población. Por esta razón, es necesario implementar estrategias más rápidas, como lo son aquellas que involucran un mayor número de genes en cada evento de transformación. De esta forma, en un sólo evento se lograrán plantas mejoradas para varias características a la vez.

Se han clonado un gran número de genes capaces de conferir resistencia o tolerancia a diversos patógenos. Para la mayoría de las proteínas codificadas por éstos, se les ha constatado actividad *in vitro* y se han generado plantas transgénicas con niveles incrementados de resistencia. Las quitinasas, glucanases y proteínas inactivadoras de los ribosomas son las más estudiadas hasta el momento por su gran acción antifúngica. El estudio de las restantes proteínas con acción fungicida (en especial las osmotinas) es más reciente, planteando una nueva y fecunda área de estudio.

La generación de resistencia frente a enfermedades bacterianas ha sido menos estudiada y por ende desarrollada, lo que se ve reflejado en el menor número de genes clonados. A pesar de esto, la utilización de genes originarios de fuentes diferentes al reino vegetal, como el caso de la lisozima de origen aviar o las cecropinas del gusano de seda, genera grandes expectativas. El impacto económico logrado sería muy alto, ya que no existen en el mercado agrícola productos químicos que controlen eficientemente estas enfermedades.

Por último, es válido mencionar una nueva área de estudio que no se pudo abordar en esta revisión, pero que deja abierta una puerta para un análisis futuro. Esta involucra los mecanismos de detoxificación de las plantas hacia toxinas generadas por patógenos. Conociendo dichos mecanismos se podrán generar nuevas plantas transgénicas resistentes a un mayor número de patógenos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 SELECCIÓN DE CULTIVARES DE PAPA

En este trabajo se usaron los cultivares Kennebec e Iporá de *Solanum tuberosum*, debido al potencial impacto económico que producirían materiales mejorados de los mismos.

El cultivar Kennebec es el más plantado en el país, dado que cumple tanto con los requerimientos productivos, como con el estándar de calidad solicitado por del mercado nacional. Es un cultivar de ciclo largo (110 a 120 días) de piel y pulpa blanca. No presenta resistencia ni tolerancia a las enfermedades más relevantes del cultivo.

Iporá es un cultivar creado por el INIA, que se comporta como resistente a PVY (*Potato Virus Y*) y tizón tardío (*Phytophthora infestans*) y parcialmente resistente a PLRV (*Potato Leaf Roll Virus*). Presenta piel y pulpa blanca y es de ciclo medio (100 días). Actualmente se ha constatado el quiebre de resistencia a tizón tardío (com. pers. Ing. Agr. Fransisco Vilaró).

3.2 DESCRIPCIÓN DE LOS GENES Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS.

Se transformó con el sistema *Agrobacterium tumefaciens* con plásmidos binarios. Las cepas utilizadas contenían los genes *vir* en un plásmido, denominado plásmido de virulencia y en otro plásmido el ADN a transferir (ADN-T). Los bordes derecho e izquierdo del ADN-T son los únicos elementos en *cis* que se requieren en el plásmido portador para completar la incorporación del ADN-T al genoma vegetal. Los elementos en *trans* necesarios para la infección son codificados por el plásmido de virulencia.

Los plásmidos portadores del ADN-T de los que se disponía, fueron creados a partir de dos versiones del plásmido pPZP200, una que portaba el gen *neomicin fosfotransferasa II* (*npt II*), y otra con el gen *higromicina fosfotransferasa* (*hpt*). La expresión de estos genes confiere resistencia a los antibióticos kanamicina e higromicina respectivamente. Además, presentan un gen que otorga a las bacterias portadoras resistencia a estreptomina y espectinomina, pero al estar ubicados fuera del ADN-T, no son transferidos a la planta.

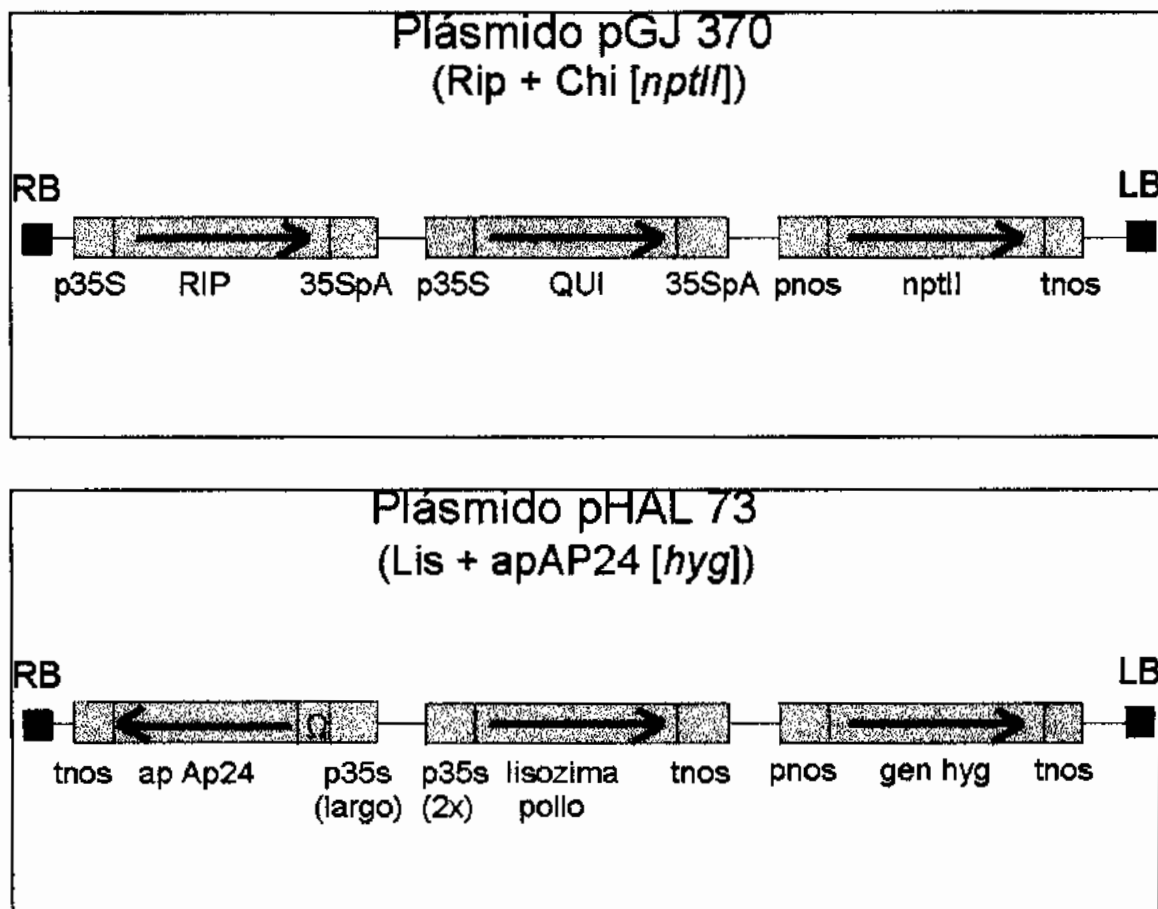
Estos plásmidos presentan dentro de la región del ADN-T, combinaciones de dos genes, ambos bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S y con las

regiones terminadoras tnos y pA35S según el caso (Figura 7). Estos genes son los que deben ser introducidos dentro de la planta, otorgando al expresarse la resistencia deseada contra diferentes patógenos.

Los genes codificantes de péptidos antipatogénicos utilizados para conferir resistencia fueron:

- Gen de lisozima de origen aviar (aislado de la clara de huevo de pollo), enzima que degrada la pared celular bacteriana hidrolizando los enlaces N-acetil glucosamina y N-acetil murámico. Se ha constatado que esta enzima direccionada hacia el espacio intercelular retarda los síntomas de infección por *Erwinia carotovora sp. atroseptica* en tubérculos y tallos de papa (com. pers. Julio Kalasich INIA-Chile; Lázaro Hernández CIGB-Cuba)
- Gen de osmotina AP24 aislado de tabaco (*Nicotiana tabacum*), presumiblemente forma canales proteicos en la membrana del microorganismo generando de esta manera desbalances osmóticos localizados resultando en la necrosis celular. Esta proteína es activa contra células eucariotas y procariotas.
- Gen de quitinasa de cebada (*Hordeum vulgare*). La quitinasa es una enzima hidrolítica de la quitina, un polisacárido que junto con el β -1,3-glucano son los componentes fundamentales de la pared celular fúngica.
- Gen de RIP de cebada, enzima que bloquea la síntesis proteica por inactivar los ribosomas mediante la hidrólisis del enlace N - glicosídico entre una adenina y la ribosa en la fracción 28S del ARNr.

Figura 7. Región ADN- T de los plásmidos pHAL 73 y pGJ370.



Como se mencionó, las construcciones plasmídicas utilizadas para la transformación de las plantas, portaban dos de estos genes dentro de la región ADN-T, transfiriendo de esta forma ambos simultáneamente al genoma vegetal y logrando mayor resistencia a los patógenos o resistencia a mas de un tipo patogénico diferente.

Las combinaciones de genes que se utilizaron en las construcciones plasmídicas fueron las siguientes: lisozima más la versión apoplástica de la osmotina AP24, con el gen de resistencia a higromicina (**pHAL 73 - Lis + apAP24 [hpt]**) y quitinasa más proteína inactivadora de ribosomas, con el gen de resistencia a kanamicina (**pGJ 370 - Qui + RIP [nptII]**). Estos plásmidos fueron contruidos en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de Cuba, (proporcionado por Lázaro Hernández); y en el Max Planck Institute (MPI) de Alemania, (proporcionado por Guido Jach). Esta información es resumida en el Cuadro 7.

El plásmido **pHAL 73 - Lis + apAP24 [hpt]** confiere resistencia combinada a bacterias (por lisozima y AP24) y hongos (por apAP24). La osmotina apAP24 es una versión apoplástica obtenida a partir de una mutación de la osmotina vacuolar AP24 en su péptido señal. Cabe destacar que se espera actividad antibacteriana sinérgica entre la lisozima y la osmotina, dado que si la lisozima degrada la pared celular bacteriana la osmotina tiene un acceso directo a la membrana y por lo tanto mayor actividad.

El plásmido **pGJ 370 - RIP + Quitinasa [nptII]** es una construcción que presenta genes de efecto sinérgico, dado que las RIP penetran más eficientemente a la célula fúngica si ésta ha sido previamente liberada de su pared celular por efecto de la quitinasa. Estos genes aportarán mayor resistencia a hongos, logrando de esta forma un mayor impacto en lo que respecta a enfermedades fúngicas. Además, las RIP también presentan efecto antiviral.

Cuadro 7. Descripción de los plásmidos utilizados.

Plásmido (1)	Genes de Interés		Gen de resistencia en el inserto.	Origen
pHAL 73	Lisozima	apAP24	Higromicina	MPI (Alemania)
pGJ 370	RIP	Quitinasa	Kanamicina	CIGB (Cuba)

(1) Nombre asignado por el laboratorio que construyó el plásmido

3.3 TRANSFORMACIÓN DE *Agrobacterium tumefaciens*.

Se usaron las cepas de *A. tumefaciens* LBA 4404 y GV 3101. La primera fue transformada con el plásmido pGJ 370 y la segunda con el plásmido pHAL 73.

Los plásmidos fueron incorporados a *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el protocolo de transformación de bacterias según se describe en Manniatis *et al.*, (1982).

Se seleccionaron los posibles transformados sobre medio selectivo conteniendo 100 mg/L de espectinomicina y 100 mg/L estreptomycin. Luego se multiplicaron a partir de colonias representativas en medio manteniendo los antibióticos y se verificó la inclusión del plásmido mediante su aislamiento y posterior corrida electroforética del ADN plasmídico digerido con enzimas de restricción, según se indica en el protocolo.

3.3.1 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.

El siguiente protocolo fue cedido por el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI), Buenos Aires.

1. Inocular en 5 mL de LB, con los respectivos antibióticos, una colonia aislada en placa previamente.
2. Cosechar por centrifugación en un solo tubo de microcentrifuga a velocidad máxima 2 minutos a 4 °C.
3. Remover el medio por aspiración de modo que el precipitado quede lo más seco posible.
4. Agregar 200µL de solución isotónica.
5. Resuspender.
6. Agregar 400µL solución de lisis.
7. Invertir suavemente los tubos.
8. Colocar en hielo 5 minutos.
9. Agregar 300µL de solución de neutralización.
10. Dejar en hielo 5 minutos.
11. Centrifugar 5 minutos a velocidad máxima a 4 °C.
12. Transferir sobrenadante a tubo nuevo.
13. Agregar un volumen de isopropanol.
14. Centrifugar a velocidad máxima a 4°C o temperatura ambiente durante 5 minutos.
15. Descartar el sobrenadante.
16. Agregar 1 mL de etanol 70% previamente enfriado.
17. Mezclar por inversión.
18. *spin down*
19. Descartar el sobrenadante cuidadosamente.
20. Secar el pellet en vacío.
21. Disolver el pellet en 200µL de buffer TE.
22. Agregar 1 µL de ARNasa (1 mg/mL) y se la deja actuar (media hora a 30 °C o toda la noche en la heladera).

Solución isotónica:

Tris-HCl 50mM
EDTA 10mM
Glucosa 1%(p/v)

Solución de lisis:

NaOH 200mM
SDS 1%(p/v)

Solución de neutralización:

Acetato de potasio 5M 60 mL
 Acido acético glacial 11,5 mL
 Agua 26,5 mL

Buffer TE 1x:

Tris-HCl 10mM pH 8
 EDTA 1mM

3.3.2 DIGESTIÓN DE LOS PLÁSMIDOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Los plásmidos fueron digeridos con enzimas de restricción diferentes, de modo de confirmar su integridad y existencia en la bacteria transformada. Las enzimas de restricción se eligieron de manera que realizaran dos o tres cortes en todo el plásmido, para así observar dos o tres bandas y facilitar la tarea de reconocimiento. El protocolo utilizado fue el que se describe a continuación.

Agregar a un tubo de microcentrífuga:

ADN plasmídico	8 μ L
Enzima elegida	2 μ L
Buffer de enzima	2 μ L
Agua	8 μ L
TOTAL	20μL

Incubar 2 horas a 37°C.

Detener la reacción calentado el tubo a 70°C durante diez minutos.

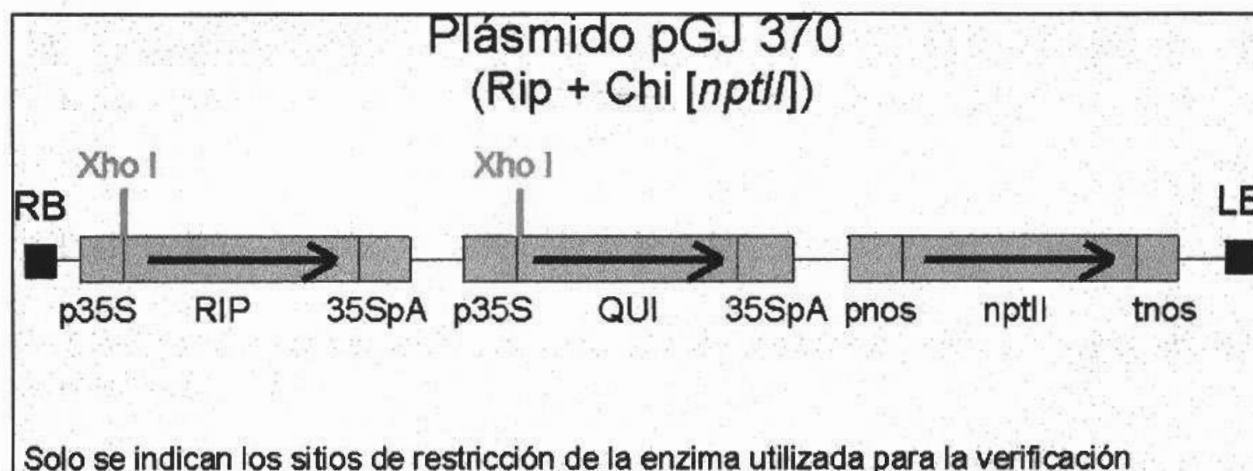
El plásmido pGJ 370 fue digerido con las enzima *Xho* I y el plásmido pHAL 73 con la enzima *Pst* I.

El producto de la digestión enzimática fue corrido en una electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TBE 0,5x durante una hora a 90V. Las bandas fueron reveladas por tinción con bromuro de etidio y visualizadas con luz ultravioleta según descripto en Maniatis *et al.*, (1982).

Las figuras 8 y 9 muestran los sitios de corte de estas enzimas en los plásmidos respectivos, las bandas esperadas y los patrones de bandas obtenidos en las electroforesis realizadas.

Figura 8. Identificación del plásmido pGJ 370 mediante corte con enzimas de restricción y electroforesis.

A - Sitios de corte de la enzima de restricción *Xho*I en la región ADN-T del plásmido pGJ 370



B - Electroforesis del producto de digestión del plásmido pGJ 370 con la enzima de restricción *Xho*I

Se muestra la restricción del plásmido con la enzima *Xho*I. Se esperaba obtener dos bandas de 1,7Kb y 10,3 Kb. Las bandas obtenidas en el gel se corresponden con lo esperado.

1. Marcador de peso molecular (escala de 1Kb).
2. Plásmido sin cortar con enzimas de restricción (tamaño 12 Kb)
3. Plásmido digerido con *Xho*I

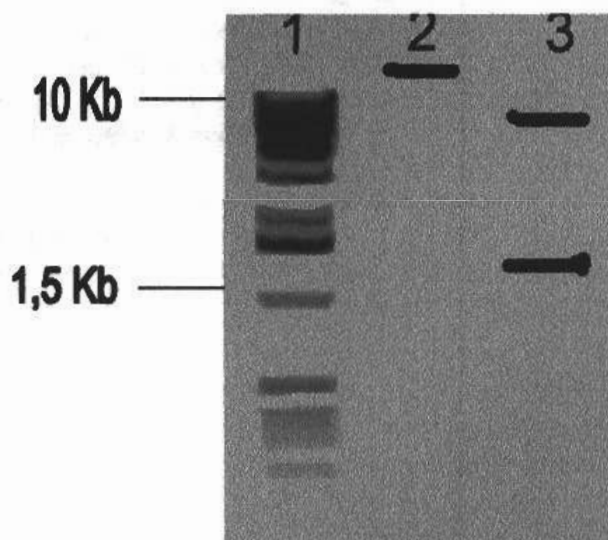
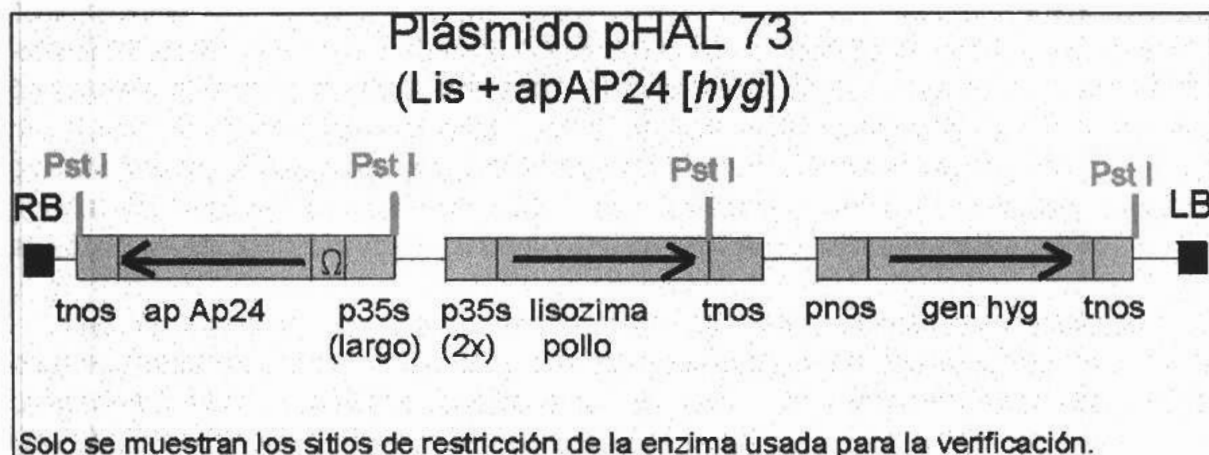
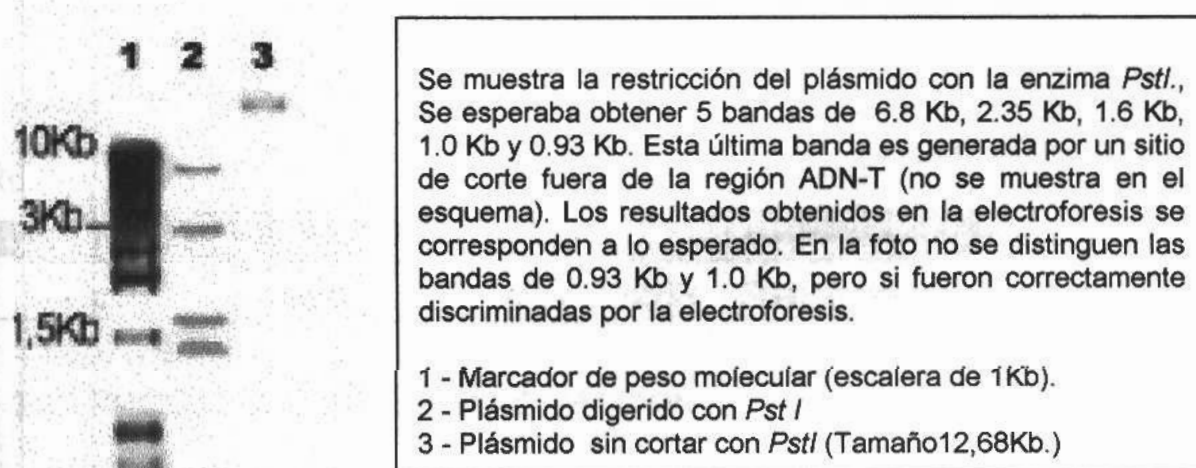


Figura 9. Identificación del plásmido pHAL 73 mediante corte con enzimas de restricción y electroforesis.

A - Sitios de corte de la enzima de restricción *Pst* I en la región ADN-T del plásmido pHAL 73



B - Electroforesis del producto de digestión del plásmido pHAL 73 con la enzima de restricción *Pst* I



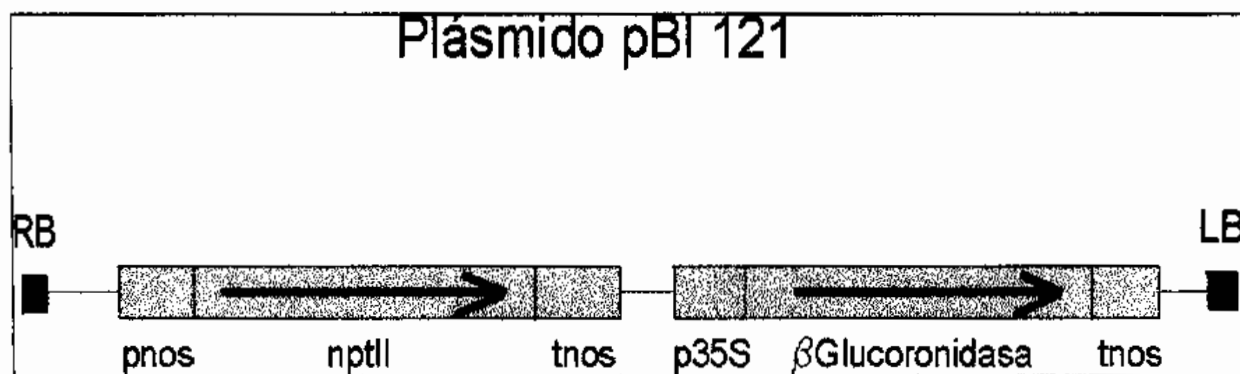
Adicionalmente se pueden testar las colonias bacterianas obtenidas, por medio de PCR (colony PCR) con *primers* específicos de una región del plásmido de manera de confirmar la transformación de las bacterias (ver sección 3.6.2).

3.4 TRANSFORMACIÓN DE PAPA

Debido a que las técnicas de transformación no estaban ajustadas para las condiciones de trabajo en el laboratorio, se debió realizar antes de la transformación con los plásmidos portadores de los genes de interés, un ensayo de transformación de papa utilizando el plásmido pBI121 (Figura 10) con el fin de poner a punto las técnica. Al contener este plásmido el gen de β -glucoronidasa (GUS), se pudo detectar fácil y rápidamente su expresión en la planta transformada, corroborando que el procedimiento utilizado estaba ajustado a las condiciones de trabajo (Tesis Ing. Agr. Silvia Méndez, 1995).

Las técnicas de cultivo *in vitro* utilizadas, los cultivos de bacterias, las concentraciones de antibióticos y las composiciones de los medios de cultivo utilizados fueron ajustadas gracias a los módulos de transformación realizados con el plásmido pBI 121. No se muestran los datos.

Figura 10. Región ADN-T del plásmido pBI121.



3.4.1 PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN

La transformación se hizo según el protocolo de Visser *et al.*, (1989) modificado, como se detalla a continuación.

Se preparan segmentos internodales de aproximadamente cinco milímetros de largo a partir de plantas crecidas *in vitro*. Estos explantes se sumergen "over night" (ON) en medio líquido MS 387 (MS suplementado con 80 mg/L de NH_4NO_3 , 14,7 mg/L de CaCl_2 , 10 mg/L de NAA y 10 mg/L de BAP). El día siguiente, los explantes se cocultivan con un cultivo ON de *A. tumefaciens* por 15 minutos y se secan en papel de filtro estéril. Los explantes tratados se

siembran en medio sólido (0,8% agar) MS379 (medio de inducción de tallo, MS suplementado con 1g/L de sacarosa, 4 g/L de manitol, 2,25 mg/L de BAP, 0,175 mg/L de IAA) en placas de petri. Después de dos días de cocultivo los explantes se transfieren a medio MS 384 (medio de inducción de tallos, MS suplementado con 15 g/L de sacarosa, 2,25 mg/L de BAP, 5 mg/L de GA3 con 300 mg/L de carbencilina y el agente de selección según el caso, 10 mg/L de higromicina o 40 mg/L de kanamicina).

Todos los cultivos permanecen a 25 grados con 16 hs de fotoperíodo. Cada 3 semanas los explantes se transfieren a medio fresco MS 384. Cuando se diferencian los tallos se remueven de los explantes y se siembran en medio MS papa multiplicación (Pm). Este es un medio MS normal pero que contiene 2,0 mg/L de pantotenato de Calcio y 0,4 mg/L de tiamina en lugar de las vitaminas.

En la figura 11 se esquematizan los pasos seguidos en el protocolo.

3.4.2 ESTRATEGIA DE TRANSFORMACIÓN

Se diseñó un módulo básico de transformación que se usó en todos los casos. Se contempló que dicho módulo poseyera todos los controles del proceso de transformación, de manera de contar en cada caso con cada uno de ellos.

El módulo estándar de transformación se conforma de 500 explantes (segmentos internodales) los cuales reciben distintos tratamientos, según lo indica el cuadro 8.

Cuadro 8. Módulo estándar de transformación.

Tratamiento.	Número de explantes		
	A. tumefaciens + plásmido de interés	A. tumefaciens	Sin infectar.
Medio 384 + agente selección	250 (I)	50 (II)	50 (III)
Medio 384	50 (IV)	50 (V)	50 (VI)

De cada uno de los tratamientos de espera lo siguiente:

(I). Obtención de transgénicos de forma directa. Se espera que el 3% de los explantes produzcan un brote transgénico (Visser, *et al.* 1989).

(II). Control negativo. Las plantas fueron infectadas con la bacteria que no portaba ningún plásmido, por lo que se esperaba que ningún explante fuera capaz de detoxificar el antibiótico y por lo tanto de sobrevivir. Se testea si la bacteria por si misma es capaz de tener algún efecto sobre la resistencia al antibiótico.

(III). Control negativo. Estos explantes fueron sometidos a los mismos pasos que los del tratamiento, menos a la infección con *Agrobacterium*, por lo que se esperaba que todos se necrosaran. De esta manera se controla el efecto del antibiótico y la posibilidad de falsos positivos en el tratamiento (se los denomina como escapes al tratamiento).

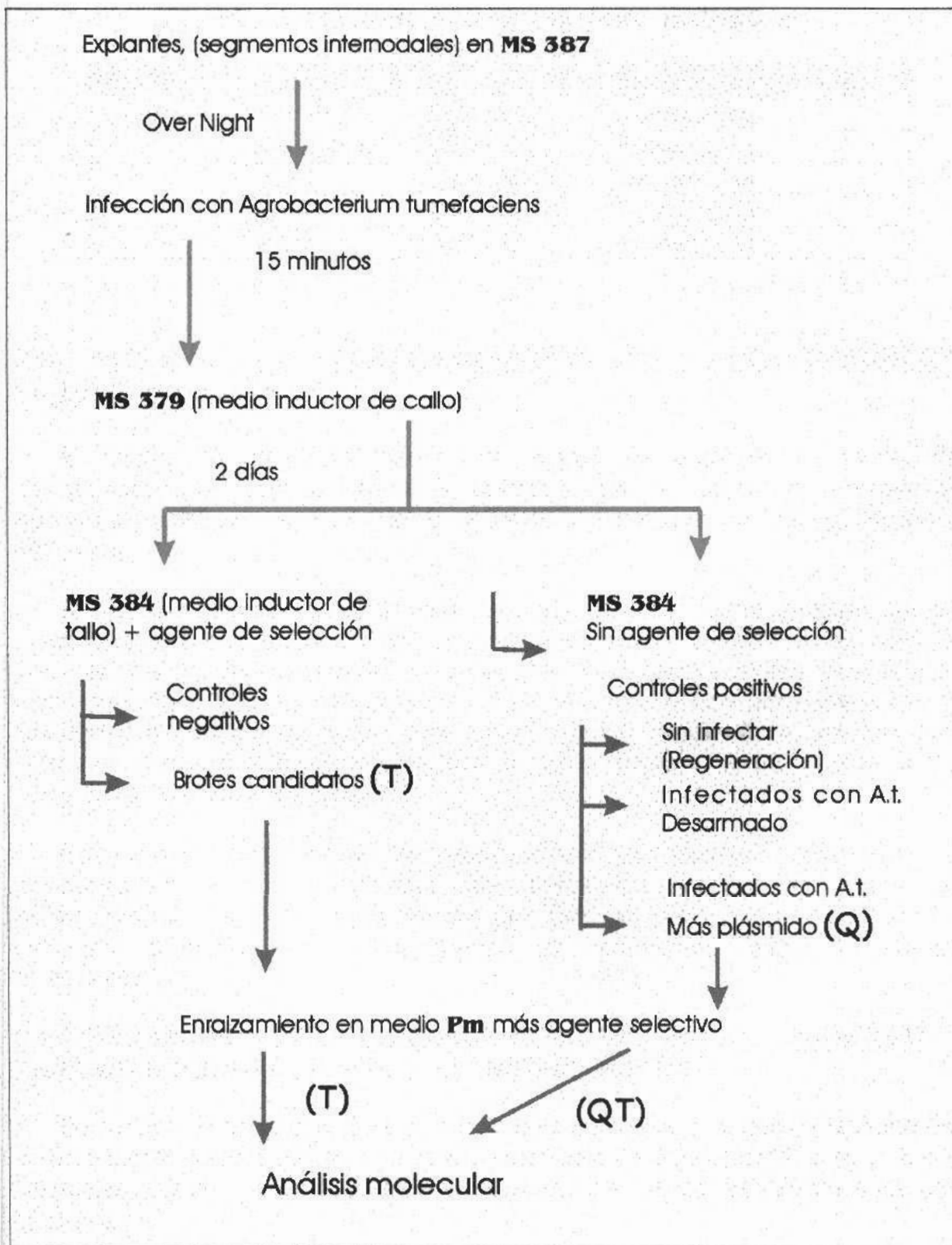
(IV). Control de regeneración de explantes infectados *A. tumefaciens* portando el plásmido de interés. Existe la posibilidad de que alguno de los brotes de estos explantes sea transgénico. Posteriormente se verificó, en una primera instancia, mediante un ensayo de enraizamiento de dichos brotes en medio selectivo.

(V). Control de regeneración de explantes infectados con *A. tumefaciens* desarmado (sin el plásmido portador del ADN-T). Este tratamiento muestra como incidía la infección de *A. tumefaciens* sobre la regeneración del explante.

(VI). Control positivo, o de regeneración. Si los medios y procedimientos utilizados fueron los adecuados, se esperaba un alto porcentaje de regeneración, a partir de los callos generados.

Se denominaron (T) a aquellos brotes que regeneraron directamente en medio selectivo. Se le denominan (Q) a aquellos brotes que regeneraron en medio no selectivo, pero que fueron infectados con *A. tumefaciens* conteniendo el plásmido con genes y pudiendo por lo tanto ser transgénico. Se denominaron (QT) a aquellos brotes Q, que enraizaron en medio con agente de selección.

Figura 11. Protocolo de Visser modificado.



En este trabajo se hicieron cinco módulos, según se indica en el cuadro 9.

Cuadro 9. Módulos de transformación realizados.

Módulo	Cultivar	Genes	Agente de selección
1	Kennebec	RIP + Qui	Kanamicina
1'	Kennebec	RIP + Qui	Kanamicina
2	Iporá	Lis + AP24	Higromicina
2'	Iporá	Lis + AP24	Higromicina
3	Iporá	RIP + Qui	Kanamicina

3.5 ENSAYO DE ENRAIZAMIENTO DE LOS POSIBLES TRANSFORMADOS

El hecho de que una planta sea capaz de enraizar en medio de multiplicación conteniendo agente de selección, es un importante indicador de que contenga el gen responsable de codificar la enzima detoxificadora de dicho antibiótico.

Si bien las plantas denominadas T ya habían sido seleccionadas por su capacidad de brotar en medio con agente de selección, también se las volvió a someter a esta nueva presión de selección: enraizar en medio conteniendo dicho antibiótico. Las plantas Q fueron sometidas a selección por primera vez al colocarlas a enraizar en este medio. Como ya se mencionó se denominaron plantas QT a aquellas que enraizaban en dicho medio y se descartaron a las que no eran capaces de hacerlo.

Para realizar este ensayo de enraizamiento fue necesario determinar la concentración mínima necesaria del antibiótico, capaz de limitar el enraizamiento y crecimiento de las plantas. Esto se debe a que los diferentes cultivares presentan diferentes grados de resistencia natural a dichos antibióticos.

3.5.1 CALIBRACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL AGENTE SELECTOR PARA SELECCIONAR EN MEDIO DE ENRAIZAMIENTO.

Se realizó un ensayo para determinar la concentración mínima inhibitoria del enraizamiento y crecimiento de plantas controles de ambos cultivares (Iporá y Kennebec), dado que es esperable una resistencia natural distinta para los dos genotipos.

Se repicaron explantes en frascos con medio Pm (ya descrito) y concentraciones ascendentes de antibiótico para determinar la resistencia tanto a higromicina como a kanamicina de los cultivares.

Para el cultivar Iporá se utilizaron concentraciones de 0,5,8,10,15 y 20 mg/L de higromicina y 0,20,40,60 y 100 mg/L de kanamicina.

Para el cultivar Kennebec se realizaron los mismos ensayos.

3.5.2 ENRAIZAMIENTO DE CLONES POSIBLEMENTE TRANSFORMADOS.

A distintos brotes obtenidos de los módulos de transformación se los colocó a enraizar en medio conteniendo los antibióticos correspondientes a las concentraciones mínimas inhibitorias determinadas por los ensayos de calibración.

Se les permitió el crecimiento durante cinco semanas y luego se los calificó según su crecimiento de acuerdo a una escala elaborada para tal fin. No todos los clones obtenidos fueron evaluados por este método.

El cuadro 10 muestra la escala elaborada para la clasificación de las plantas según su desarrollo en medio con agente de selección.

Cuadro 10. Escala de crecimiento y enraizamiento.

Escala de Crecimiento y Enraizamiento.				
0	1	2	3	4
No hay crecimiento, y explante necrosado. El control negativo tiene este valor.	Escaso desarrollo y enraizamiento, pero el explante sigue vivo.	Crecimiento normal, enraizamiento deficiente.	Crecimiento y enraizamiento adecuados, pero menor al obtenido en un tiempo igual, en medio no selectivo.	Crecimiento y enraizamiento idéntico al obtenido en un medio de crecimiento sin agentes de selección.

3.6 EVALUACION MOLECULAR DE LOS POSIBLES TRANSFORMADOS

Para determinar la naturaleza transgénica de las plantas obtenidas se realizaron pruebas de PCR con *primers* específicamente diseñados para detectar la presencia del gen inserto en el genoma vegetal. Previo a los ensayos de PCR, se extrajo el ADN genómico vegetal.

3.6.1 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE PLANTAS PARA REACCIÓN DE PCR.

1. En un tubo de microcentrífuga, se maceran dos hojas pequeñas con el auxilio de un bastón que encaja perfectamente en el fondo del tubo.
2. Se adicionan 400 μ L del buffer de extracción.
3. Se macera nuevamente el tejido.
4. Vortex por 30 segundos.
5. Centrifugar a velocidad máxima (12.000g) por 3 minutos.
6. Transferir 300 μ L del sobrenadante para un nuevo tubo de microcentrífuga.
7. Adicionar 300 μ L de isopropanol y mezclar por inversión.
8. Incubar a temperatura ambiente por 3 minutos.
9. Centrifugar a velocidad máxima (12.000g) por 5 minutos.
10. Descartar cuidadosamente el sobrenadante.
11. Lavar el pellet por adición de 300 μ L de etanol 70%.
12. Descartar el sobrenadante y secar con auxilio de un desecador.
13. Resuspender el pellet en 50 μ L de TE.

Buffer de extracción

Tris-HCl 200mM pH 7,5
NaCl 200mM
EDTA 25mM
SDS 0,5%

Protocolo cedido por EMBRAPA-CENARGEN.

3.6.2 PROTOCOLO DE REACCIÓN DE PCR.

Se utiliza para el análisis de PCR el kit de Gibco BRL-PCR Reagent ®. El kit incluye un control de calidad del proceso, el cual consta de ADN genómico humano y un juego de *primers* diseñados para amplificar un fragmento de 764 pares de bases que corresponde a una copia única del gen BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*). Se utilizó este control en todas las reacciones.

Para hacer los ensayo de PCR se agregan en un tubo en el siguiente orden:

Agua	23,25µL	(x número de reacciones +1)
Buffer 10x	5,00µL	(x número de reacciones +1)
MgCl ₂	1,50µL	(x número de reacciones +1)
Taq polimerasa	0,25µL	(x número de reacciones +1)
Primer 1. (250pmoles)	5,00µL	(x número de reacciones +1)
Primer 2. (250pmoles)	5,00µL	(x número de reacciones +1)

Se distribuyen a tubos nuevos 40 µL de la mezcla y se le agregan a cada uno:

ADN (muestra)	10,00µL
TOTAL	50,00µL

Se cubre la mezcla con aceite mineral. Y se realiza el siguiente ciclo:

94°	5 minutos.
35 ciclos de:	
94°	1 minuto.
48°	1 minuto*
72°	1 minuto 30 segundos.
72°	7 minutos.

* Temperatura de *annealing* ajustada para todos los juegos de *primers* según su T_m.

Dado su facilidad y economía, como control positivo se usó para todos los casos *E. coli* transformadas con el plásmido que contenía el ADN-T que se quería testear. Se partía de cultivo líquido O.D.₅₀₀ 0,6 y se diluía con agua destilada 1/10, luego se colocaba a baño maría 20 minutos. De esta dilución se usaron 10µl para realizar el control positivo.

El trabajo de análisis se organizó de manera que cada corrida contara con un control positivo del proceso (provisto por el fabricante), un control positivo del inserto (*E. coli* transformadas) y como control negativo una planta del mismo cultivar sin transformar, así como un número variable de clones derivados del mismo módulo de transformación.

Los *primers* utilizados fueron:

A) Para los posibles transformados con los genes RIP + Qui:

“Up 35S” hibridiza en el promotor hacia el inserto.

5' ATCTCCACTGACGTAAGGGA 3'

“Low Rip” hibridiza en la hebra complementaria sobre el gen de Rip.

5' TCCACGTTCTTCGCCATCTTTG 3'

Este juego produce un segmento de aproximadamente 180 nucleótidos.

B) Para los posibles transformados con los genes AP24 + Lis.

“T-NOS” hibridiza en el terminador NOS hacia el inserto.

5' CATTCAAGATCTCTCTGCCGACAGTGGTCC 3'

“AP24” sobre el gen de AP24

5' GGGATCCACCATGGGCAACTTGAGATCTTC 3'

Este juego produce un segmento de aproximadamente 780 nucleótidos.

Cabe destacar que los *primers* utilizados son, por su tamaño, muy específicos, por lo que no es esperable que hibridicen inespecíficamente con secuencias que no correspondan al gen inserto.

Dado que tanto el gen de osmotina AP24, como el de RIP son de origen vegetal, se podría objetar que el genoma de papa contiene versiones de estos genes, que aunque no sean exactamente los mismos que fueron introducidos, presentasen ciertas secuencias con un grado de homología tal que hibridizaran con el *primer* utilizado. Para eliminar este posible error en la evaluación molecular de los transformados cada juego contenía además de un *primer* interno del gen, un *primer* que hibridizaba tanto con el promotor de origen viral como con el terminador de origen bacteriano. De esta manera, como no es posible que la planta testigo presente estas secuencias, se aumenta la seguridad de no obtener falsos positivos.

Las corridas electroforéticas se realizan en gel de agarosa 1,5% en buffer TBE 0,5x, con un voltaje de 90V durante 1,5 hs.

Las bandas son reveladas por tinción con bromuro de etidio en reacción con luz ultravioleta según descrito en Manniatis *et al.*, (1982).

3.7 ACLIMATACIÓN Y OBTENCIÓN DE MINITUBERCULOS EN INVERNÁCULO.

Con el fin de obtener minitubérculos para ser llevados a campo para su futura evaluación, las plantas positivas obtenidas fueron colocadas en macetas con turba estéril, entutoradas y protegidas con una cubierta plástica, de manera de realizar una transición gradual al medio exterior.

Se parte de plantas *in vitro* de 6-8 cm con buen desarrollo foliar y radicular, se les elimina el agar cuidadosamente y se las transplanta.

Aproximadamente un mes posterior al trasplante las plantas se mantuvieron continuamente fuera de la cubierta plástica, creciendo bajo las condiciones de invernáculo hasta el fin de su ciclo. La cosecha de los minitubérculos se realizó de forma manual.

4. RESULTADOS

La evolución *in vitro* de los módulos de transformación puede evaluarse desde dos enfoques. En primera instancia, el comportamiento organogénico del explante individual en los diferentes controles y en el tratamiento en respuesta a la secuencia hormonal establecida, y posteriormente el análisis de la evolución en conjunto de explantes en los módulos de transformación propiamente dichos.

El análisis del desarrollo *in vitro* de las plantas es importante a la hora de validar el método de transformación. Para los objetivos de este trabajo, es más importante aún la obtención de plantas transgénicas PCR positivas, ya que esto significa la obtención de variabilidad genética para el posterior mejoramiento de los cultivos.

4.1. DESARROLLO DE LOS SEGMENTOS INTERNODALES

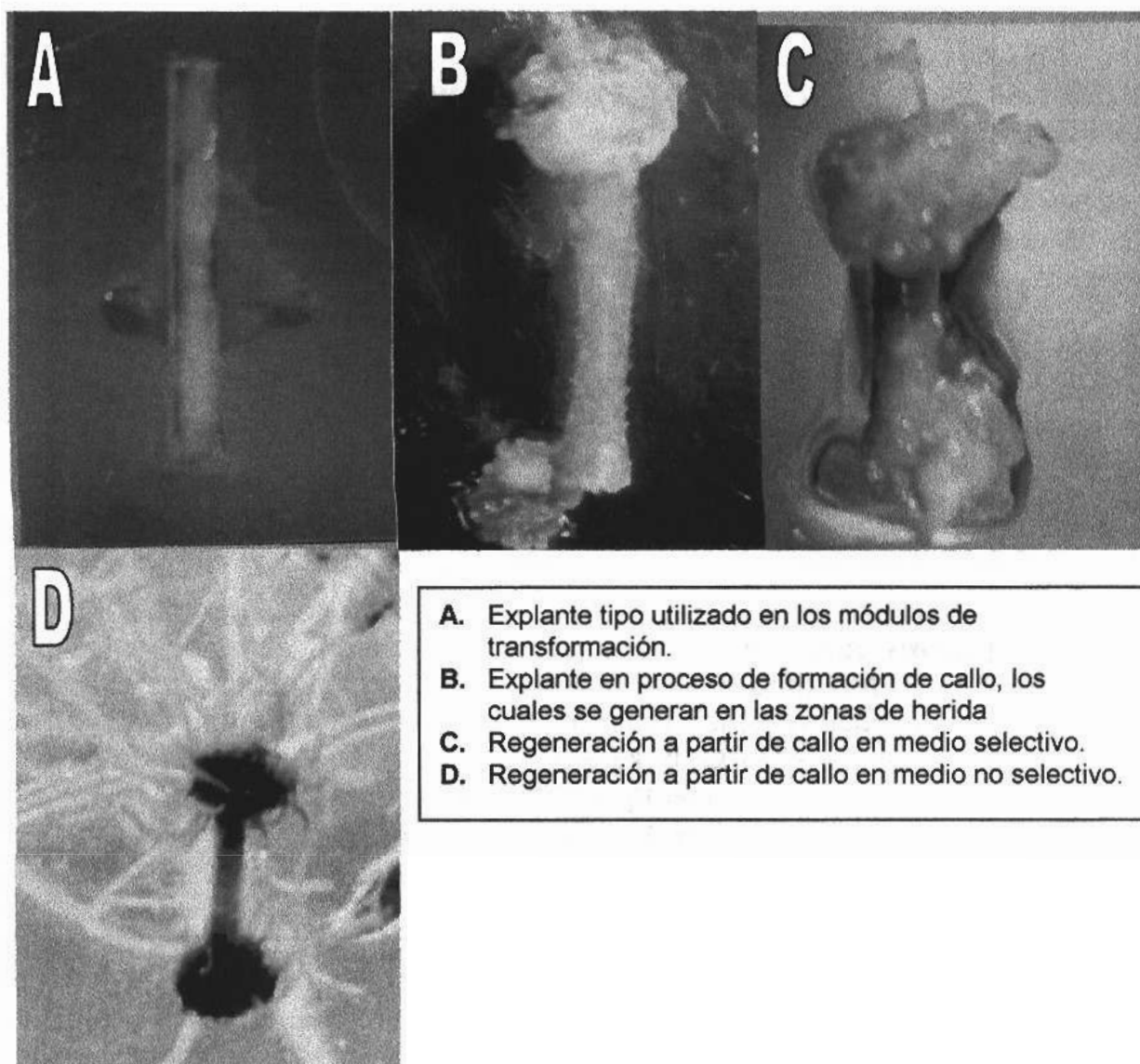
Los explantes seleccionados fueron segmentos internodales de plantas de papa crecidas *in vitro*. En la foto 9A se muestra el explante tipo del cual se partió según se especifica en el protocolo de transformación utilizado. Es importante evitar que yemas de los nudos queden sobre el explante de manera de no confundir brotaciones de éstos últimos con regeneración somática. Los extremos de los explantes se cortaron en forma sesgada de modo de aumentar la superficie de herida susceptible a la infección bacteriana y capaz de regenerar.

Estos explantes se sometían a un medio inductor de callo y después de colocarlos en el medio inductor de tallo, en los extremos se desarrollaban callos friables. Estas estructuras se muestran en la foto 9B.

Algunos explantes que se colocaron en medio con agente de selección y que habían sido transformados con *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo el plásmido, desarrollaron brotes en las estructuras callosas que según lo esperado corresponderían a brotes que habrían incorporado los genes de interés y por tanto, el gen capaz de detoxificar el agente de selección. Estos brotes posiblemente transgénicos se presentaban como el mostrado en la foto 9C. Cada uno de estos brotes, aunque se desarrollaran del mismo explante correspondían a eventos de transformación diferentes. En este trabajo se parte de la hipótesis de que la bacteria incorpora su ADN-T en cada célula vegetal de forma aleatoria y se espera que cada callo (y posteriormente brote) surja de una única célula vegetal que haya sido transformada.

En la foto 9D se observa un explante perteneciente al control positivo de regeneración. Estos explantes presentaban un comportamiento normal, desarrollando brotes capaces de regenerar según lo esperado de acuerdo al comportamiento *in vitro* de los cultivares de papa. De cada uno de los explantes se desarrollaban promedialmente 17 brotes y el enraizamiento era abundante.

Foto 9. Desarrollo de los segmentos internodales de papa.



4.2 DESARROLLO DE LOS MÓDULOS DE TRANSFORMACIÓN

Según el cultivar seleccionado y el agente de selección utilizado la evolución de los explantes en los tratamientos y en los diversos controles fue diferente. Estas diferencias se demuestran a continuación en las fotos 10 y 11, detallando en cada caso las características mas sobresalientes.

Módulo de transformación del cultivar Iporá con higromicina como agente de selección

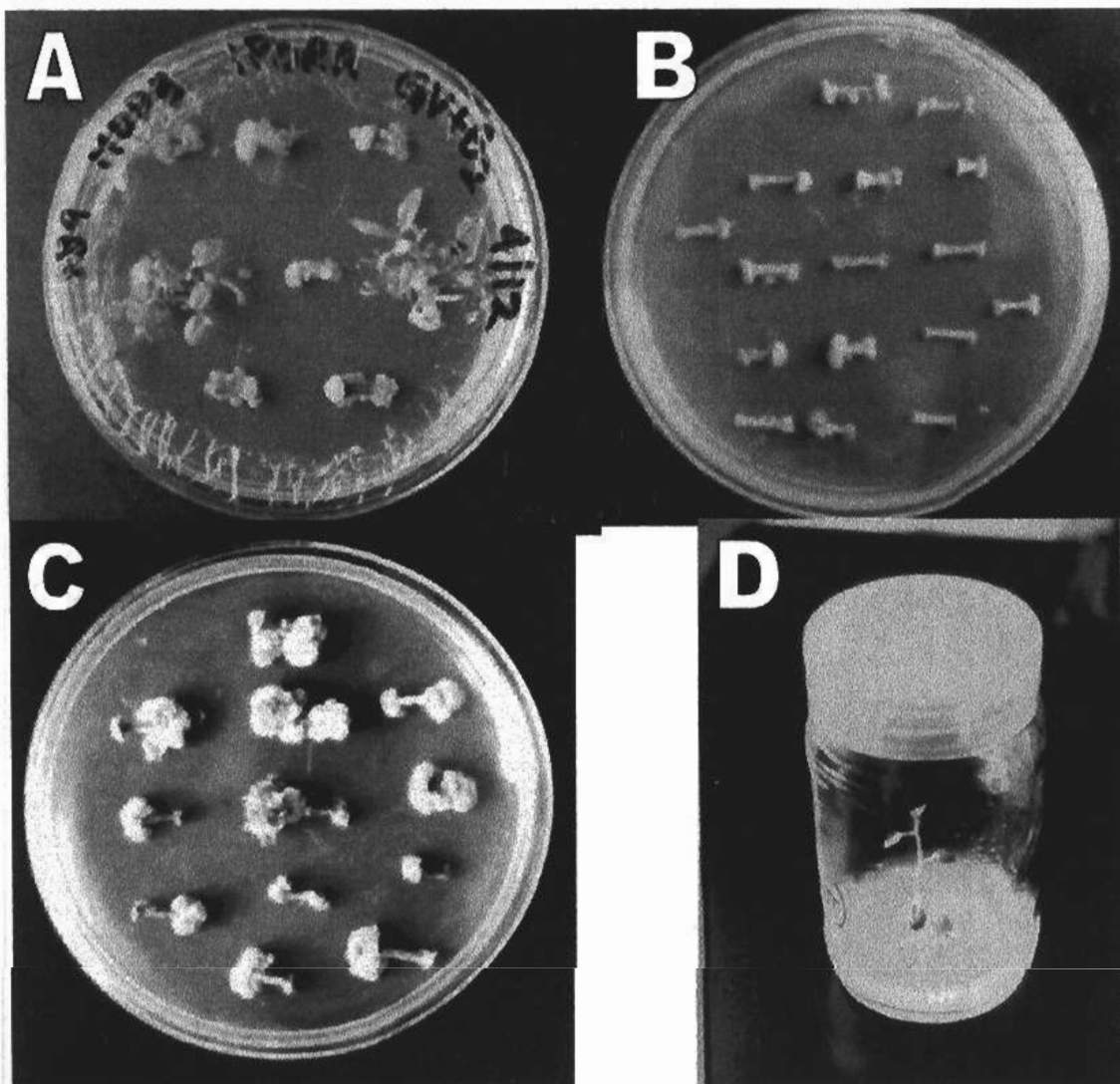
La foto 10A muestra el control positivo tipo de los módulos donde se utilizó el cultivar Iporá. En esta foto se puede observar que el desarrollo de los explantes no era sincronizado, sino que había diferencias notorias del tiempo de brotación de los diferentes explantes dentro de una misma placa. Estas diferencias pudieron deberse a variaciones en el contenido endógeno de hormonas de los explantes, ubicación diferencial dentro de la placa, competencia por nutrientes, entre otros.

Una placa de Petri conteniendo el control negativo del módulo (segmentos internodales sin tratamiento alguno y en medio con higromicina) se muestra en la foto 10B. Estos explantes, como ya se mencionó, desarrollaron callo en los extremos pero no evolucionaron mas allá de estas estructuras. Como se observa en la foto, los explantes se necrosaron totalmente.

En la foto 10C se observa una placa de Petri conteniendo 12 de los 250 explantes parte del tratamiento de transformación. Estos explantes también presentaron estructuras de callo en sus extremos, pero con mayor crecimiento respecto al control negativo. Algunos de estos callos evolucionaron a brotes los que formaron posteriormente tallos. Este es el caso del explante ubicado en el centro de la placa, donde se observa la presencia de brotes en uno de sus extremos. El hecho de que el tamaño de callo alcanzado fuese mayor al mostrado en los controles negativos, pudo deberse a que se presentara la bacteria en los explantes y que la expresión del gen de detoxificación de higromicina llevase a una menor concentración de ésta en el medio y por ende a un mayor desarrollo de los explantes, o también pudo deberse a que se estuviese expresando dentro del genoma de la planta, pero que la inserción del ADN-T impidiera el desarrollo posterior a brote de estos callos. Debido a que en el medio se utilizó un bacteriostático para impedir el desarrollo de *Agrobacterium* se esperaba que no fuera ésta la que estuviera detoxificando la higromicina.

En la foto 10D se observa una planta *in vitro* producto de unos de los brotes desarrollados a partir de los callos creciendo en medio con higromicina. Cada uno de estos brotes fue separado e identificado independientemente.

Foto 10. Comparación de explantes de un modulo de transformación de Ipomoea con higromicina como agente de selección.



- A. Control Positivo.
- B. Control Negativo.
- C. Tratamiento.
- D. Planta T en medio de multiplicación.

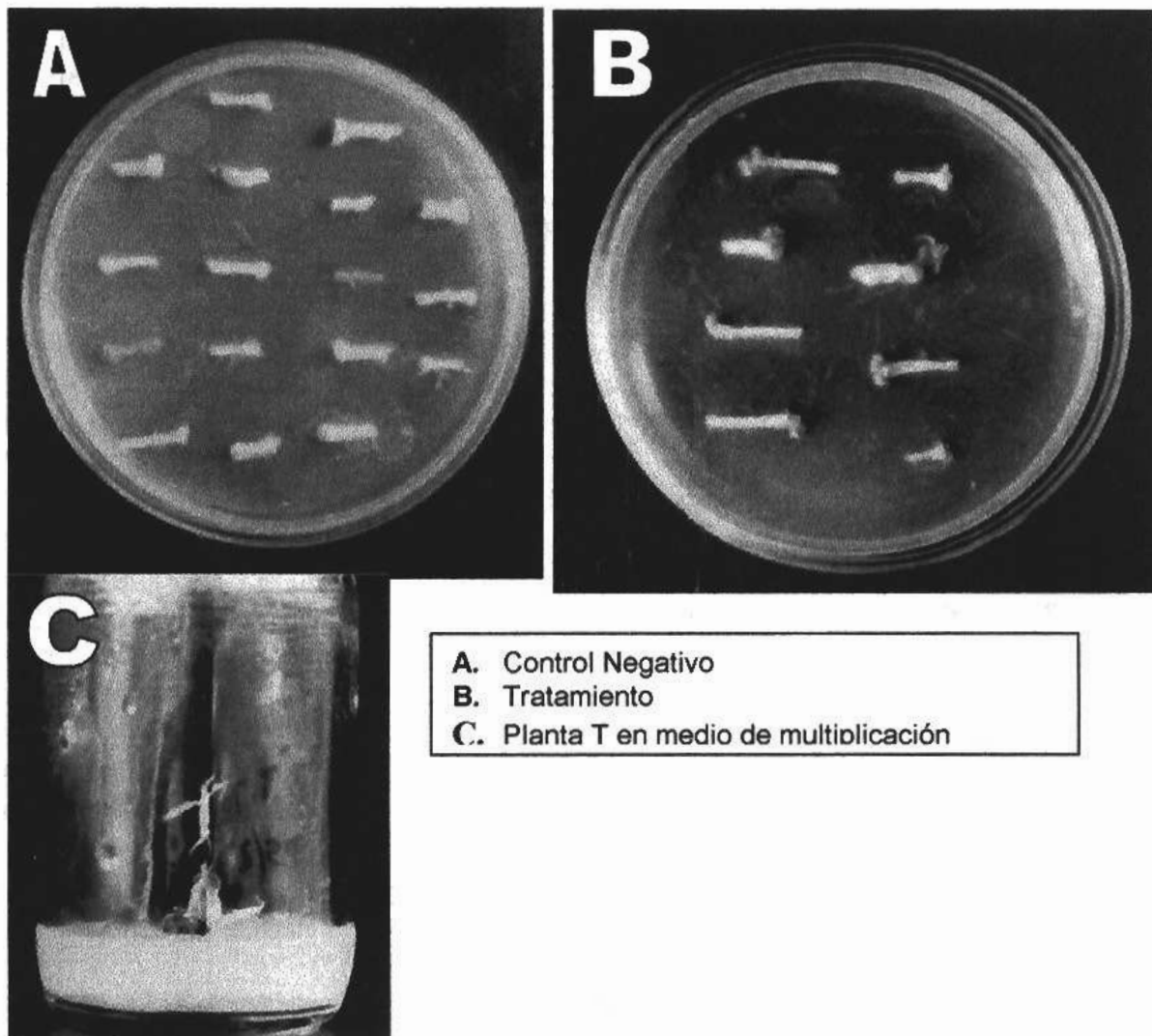
Módulo de transformación del cultivar Kennebec con kanamicina como agente de selección

Las características organogénicas vistas para el módulo donde se utilizó Iporá como cultivar e higromicina como agente de selección se mantuvieron para el caso del cultivar Kennebec y como agente de selección kanamicina, pero existen algunas diferencias que se detallan a continuación. El control positivo se presentó igual que el caso anterior, pero no así el control negativo. Como se muestra en la foto 11A los explantes colocados en medio con kanamicina se necrosaban totalmente antes de desarrollar callos en los extremos y su apariencia era de explantes etiolados, a diferencia de los necrosados por higromicina, que presentaban una consistencia más firme.

Del mismo modo, aquellos explantes crecidos en medio con kanamicina, pero que eran parte del tratamiento de transformación no mostraron un crecimiento de callo importante, sino que los brotes se desarrollaban a partir de estructuras tipo callo, pero menores. Esto se observa en la foto 11B, donde se ve el desarrollo de un brote a partir de estas estructuras.

En la foto 11C se observa, al igual que para el módulo anterior, la planta *in vitro* regenerada a partir de un brote posiblemente transgénico creciendo en medio de multiplicación de papa.

Foto 11. Comparación de explantes de un modulo de transformación de Kennebec con kanamicina como agente de selección.



4.3. PLANTAS POSIBLEMENTE TRANSGÉNICAS OBTENIDAS EN LOS MÓDULOS DE TRANSFORMACIÓN.

Las plantas seleccionadas por su capacidad de brotar en medio conteniendo agente de selección, se denominaron plantas T y aquellas que brotaron en medio sin agente de selección, pero que se seleccionaron por su capacidad de enraizar en medio conteniendo el agente de selección respectivo, plantas QT.

Para llevar a cabo los ensayos de enraizamiento se realizó con anterioridad una curva de calibración, de modo de determinar cuál era la concentración mínima de higromicina o kanamicina, frente a las cuales las plantas no mostraban ningún crecimiento (ni radicular ni de tallo). Esto se debe a que los diferentes cultivares pueden presentar algún grado de resistencia natural a dichos agentes.

En la foto 12 se muestra el ensayo de calibración del enraizamiento del cultivar Iporá creciendo en medio de multiplicación conteniendo diferentes concentraciones de higromicina. En esta foto se puede observar que a 8 mg/L de higromicina no existía desarrollo alguno de las plantas de Iporá. El mismo procedimiento se realizó para el cultivar Kennebec creciendo en medio de multiplicación con kanamicina y se determinó ausencia de crecimiento a 100 mg/L de kanamicina en el medio (Foto 13). En base a la capacidad de enraizamiento en medio presentando estas concentraciones de agente de selección (8 mg/L de higromicina y 100 mg/L de kanamicina, dependiendo del módulo) es que se seleccionaron las plantas QT y se volvieron a someter a presión de selección las plantas T. En este último caso todas las plantas enraizaron normalmente.

Foto 12. Capacidad de enraizamiento de plantas del cultivar Iporá en medio de multiplicación con diferentes concentraciones de higromicina (0, 5, 8, 10, 15 y 20 mg/L)

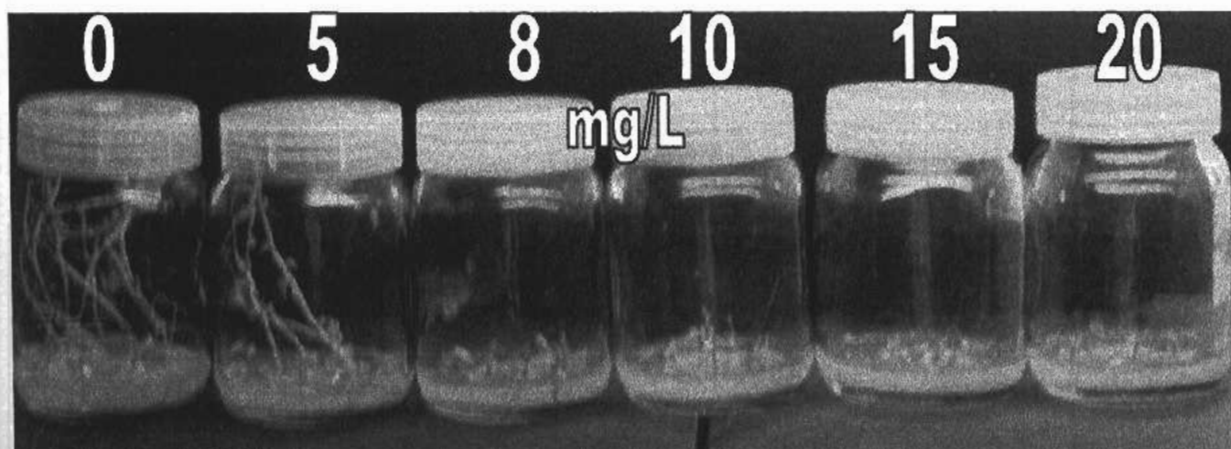
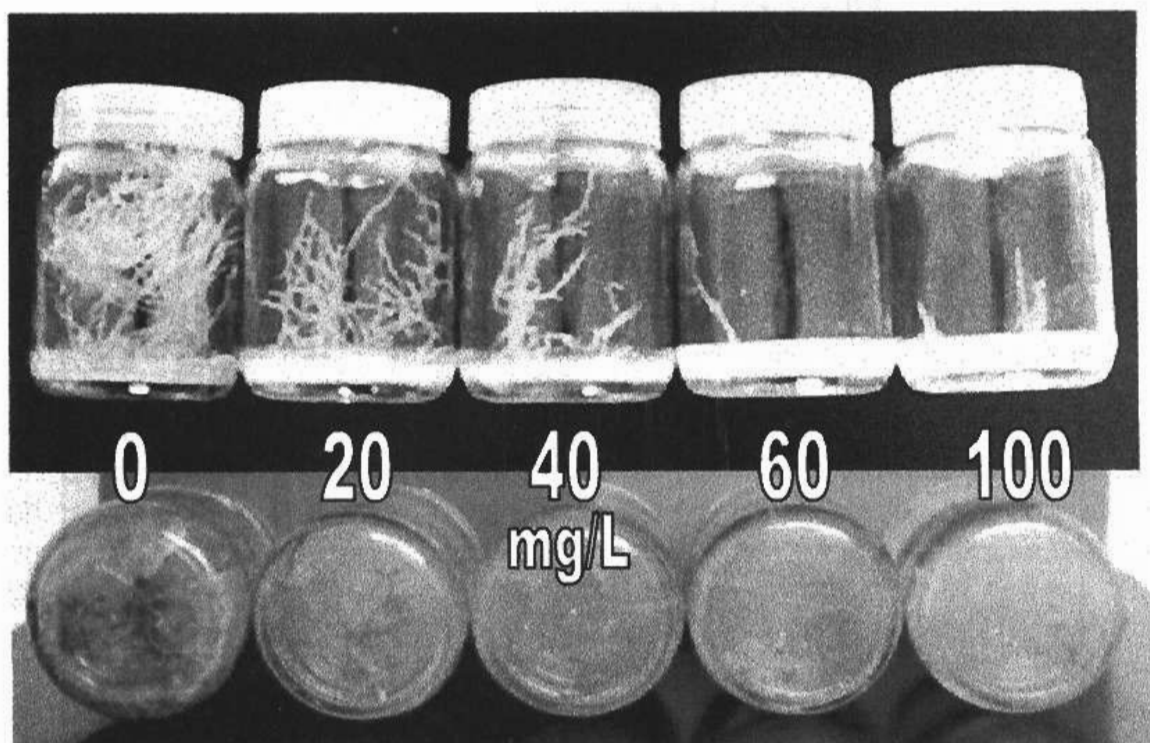


Foto 13. Capacidad de enraizamiento de plantas del cultivar Kennebec en medio de multiplicación con diferentes concentraciones de kanamicina (0, 20, 40, 60 y 100 mg/L)



En los cuadros 11 y 12 se muestran los resultados respecto al número de plantas T y QT obtenidas en cada uno de los módulos. Los datos se arreglaron según el plásmido utilizado para la transformación.

Cuadro 11. Resumen de resultados de módulos con el plásmido pGJ 370

<i>Módulo</i>	<i>Nro.Exp. Inicial</i>	<i>Nro.exp. brotados</i>	<i>Porcentaje de brotación</i>	<i>Tiempo medio de aparición de brotes (días).</i>
1	250	3	1,2 %	97
1'	250	18	7,2 %	91
3	250	4	2,4%	103
Media		8,33	3,6%	97

Cuadro 12. Resumen de resultados de módulos con el plásmido pHAL 73

<i>Módulo</i>	<i>Nro.Exp.Inicial</i>	<i>Nro.exp. brotados</i>	<i>Porcentaje de brotación</i>	<i>Tiempo medio de aparición de brotes.</i>
2	250	10	4,0%	75
2'	250	1	0,4%	35

Como se indica en el cuadro 11, la variabilidad respecto al número de plantas T obtenidas en cada uno de los módulos es muy grande. La variabilidad se explica fundamentalmente por el error experimental, que consta de muchas variables que no han sido evaluadas, como por ejemplo: diferente competencia y determinación de lo explantes (diferentes edades fisiológicas de los explantes, número de repiques de las plantas de partida, nivel hormonal endógeno), ubicación diferencial de los explantes dentro de la placa, composición de los medios de cultivo variable, interacción variable entre los genotipos de la bacteria y la planta, etc.

Si bien los brotes no aparecían en forma sincronizada el tiempo medio de aparición de los mismos en los diferentes módulos dio valores muy similares, con un promedio de 97 días.

En el cuadro 12, que contempla los resultados obtenidos en los módulos transformados con los genes de lisoizima y apAP24, se observa la misma variabilidad.

A partir del análisis de los resultados de los controles, citados en los cuadros 13 y 14, se puede determinar que el ensayo de transformación estuvo bien planteado y que el protocolo fue ajustado. Esto se debe a que los controles positivos (explantes sin infectar y creciendo en medio sin agente de selección) brotaron un 100 %, 98 % y 96 %, según el módulo. En aquellos casos que el valor fue menor (Módulos 1'y 3) se debió a errores en el procedimiento experimental. Igualmente los valores fueron muy cercanos a un 100 %.

Más relevante es el resultado de los controles negativos (explantes sin infectar colocados en medio con agente de selección) donde ningún explante creció, determinando entonces que en los tratamientos no se esperaban escapes falsos positivos. Los controles restantes, realizados para determinar el efecto de *Agrobacterium tumefaciens* sobre el crecimiento, muestran que el hecho de la infección por la bacteria y la existencia de la misma durante el

proceso de crecimiento del explante afectaron su desarrollo. Los porcentajes de brotación de aquellos explantes crecidos en medio sin agente de selección son menores que los obtenidos para los controles positivos. A pesar de esto, en dos de los módulos presentaron valores más altos de brotación, en aquellos que habían sido infectados con la bacteria conteniendo el plásmido de interés.

Cuadro 13. Regeneración en los controles de los módulos con el plásmido pGJ 370

<i>Porcentaje de regeneración de brotes de los controles</i>					
	s/ inf. s/kan (VI)	s/inf. c/kan (III)	Inf A.t. s/kan (V)	Inf A.t. c/kan (II)	inf A.t. plas s/kan (IV)
Módulo 1	100%	0%	53%	0%	100%
Módulo 1'	96%	0%	-	-	88%
Módulo 3	98%	0%	74%	0%	5%**

Se indica entre paréntesis la denominación del tratamiento descrito en el cuadro 8.

Cuadro 14. Regeneración en los controles de los módulos con el plásmido pHAL 73

<i>Porcentaje de regeneración de brotes de los controles</i>					
	s/ inf. s/hyg (VI)	s/inf c/hyg (III)	inf A.t. s/hyg (V)	Inf A.t. c/hyg (II)	Inf A.t. plas s/hyg (IV)
Modulo 2	100%	0%	84%	0%	72%
Modulo 2'	100%	0%	-	-	100%

Se indica entre paréntesis la denominación del tratamiento descrito en el cuadro 8.

En todos los casos en que se colocaron los explantes a crecer en medio con higromicina o kanamicina y que habían sido infectados con la bacteria desarmada, no se detectó crecimiento alguno.

A modo de resumen según lo indica el cuadro 15 se obtuvieron 34 plantas T y 10 plantas QT.

Cuadro 15. Total de Plantas T y QT obtenidas en los Módulos de Transformación

Modulo de Transformación	Plantas T	Plantas QT
1 (Iporá/higromicina)	2	1
1'(Iporá/higromicina)	18	0
2 (Kennebec/kanamicina)	9	s.d.
2'(Kennebec/kanamicina)	1	9
3 (Iporá/kanamicina)	4	s.d.
TOTAL	34	10

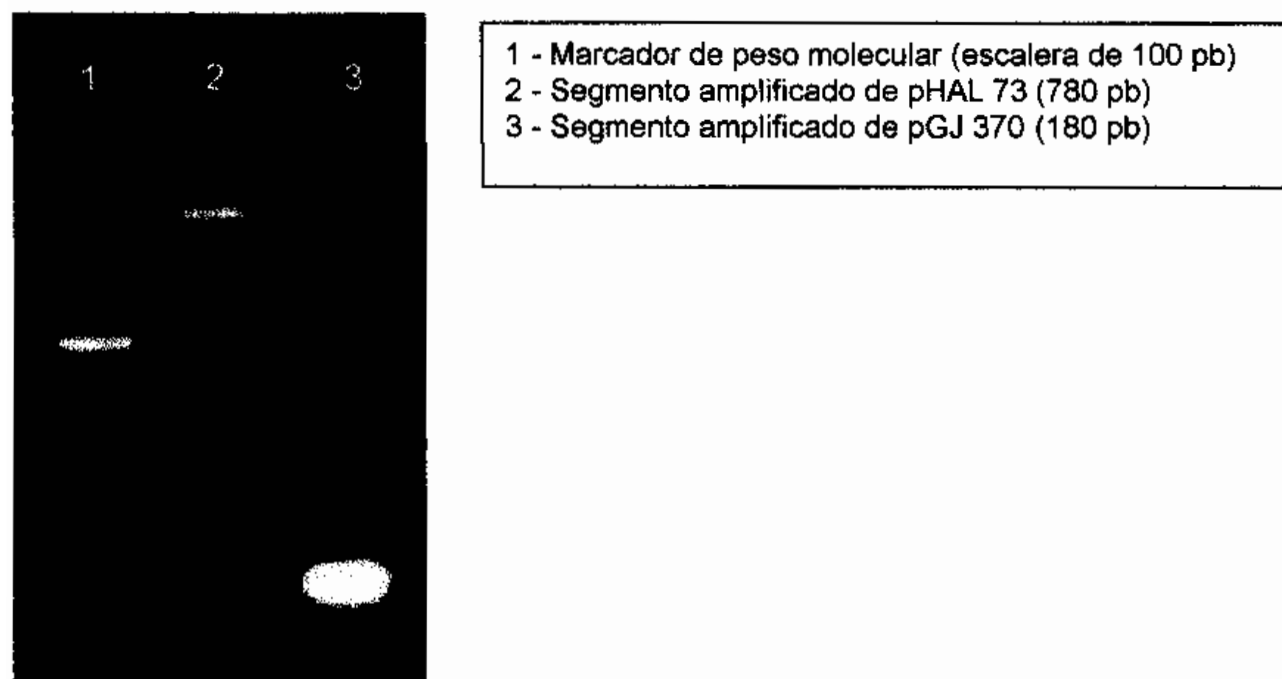
s.d. sin dato

Todas estas plantas fueron evaluadas por PCR.

4.4. ANÁLISIS POR PCR

Antes de evaluar el ADN de las plantas posiblemente transgénicas mediante la técnica de PCR, se realizó la puesta a punto de la misma utilizando como molde el ADN plasmídico, del que se estaba seguro contenía los fragmentos génicos a amplificar. En la foto 14 se observa el resultado de este ensayo. Las bandas amplificadas presentaron los tamaños esperados, 780 pb para el segmento amplificado a partir del plásmido que contenía los genes de Lisozima y apAP24 y 180 pb para la amplificación del segmento del plásmido que contenía los genes de RIP y Quitinasa.

Foto 14. Corrida electroforética con los productos de PCR de los plásmidos PGJ 370 y pHAL 73



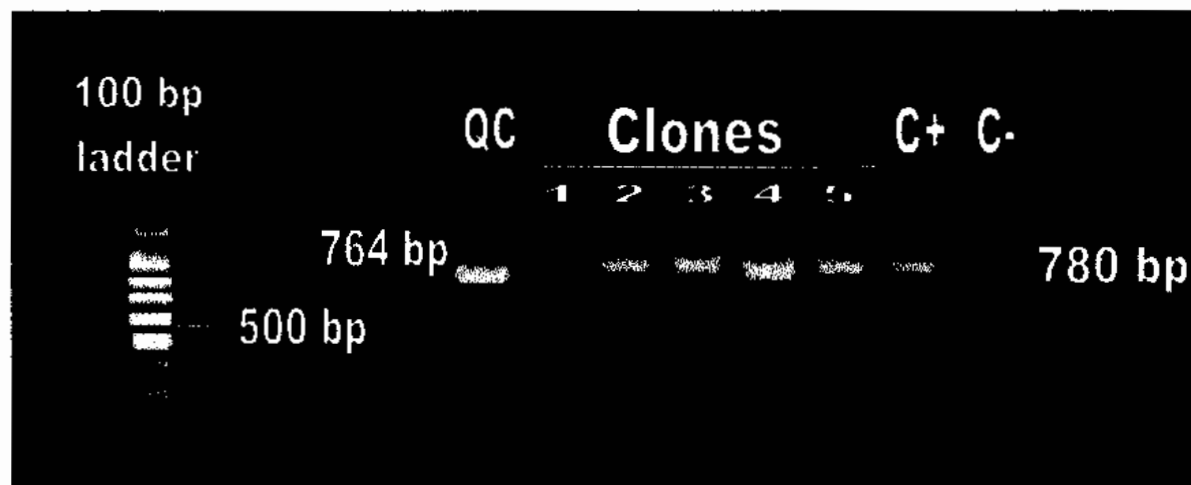
Posteriormente se realizaron los ensayos con las plantas T y QT obtenidas a partir del crecimiento y enraizamiento en medio selectivo, respectivamente.

Se muestra a continuación (Fotos 15 y 16) geles donde se corrieron los productos de amplificación por PCR a partir de ADN de las plantas. Además, en cada gel se incluyó un control negativo (ADN de planta no transgénica sometida al mismo ensayo de PCR), un control positivo (fragmento amplificado a partir del plásmido inicial) y un control de calidad del kit de PCR utilizado (amplificado de un fragmento de un gen de un neuropéptido humano).

En la foto 15 se ve que todas las plantas fueron PCR positivas, mientras que en la foto 16 de las 8 plantas ensayadas sólo 4 lo fueron.

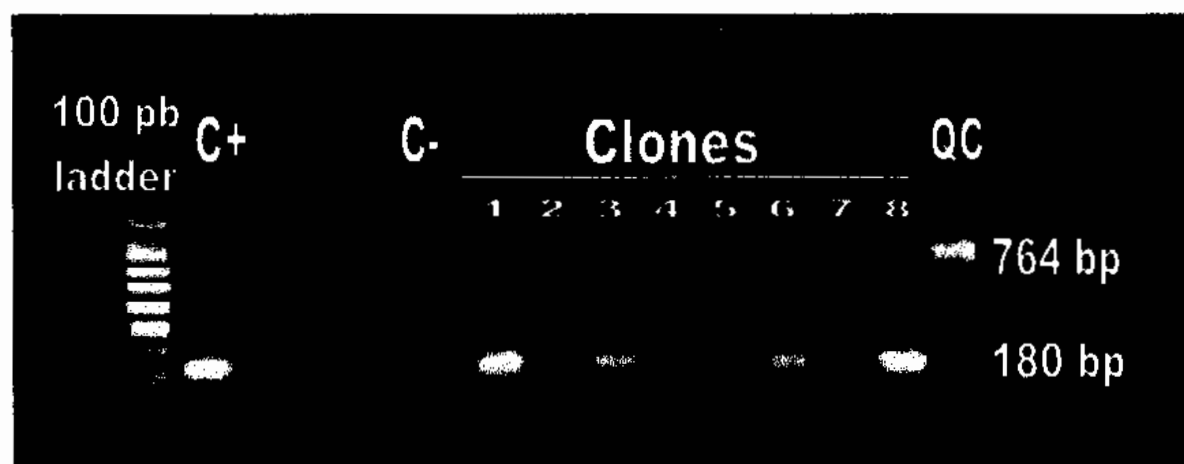
Este análisis por PCR fue realizado en todas las plantas y los resultados se observan en el cuadro 16.

Foto 15. Corrida electroforética con productos de PCR de plantas T de los módulos 2 y 2'.



QC - Control de calidad
 Clones - Plantas T analizadas
 C(+) - Control Positivo
 C(-) - Control Negativo

Foto 16. Corrida electroforética con productos de PCR de plantas T de los módulos 1 y 1'.



QC - Control de calidad
 Clones - Plantas T analizadas
 C(+) - Control Positivo
 C(-) - Control Negativo

Cuadro 16. Número de plantas T, Q, QT y PCR positivas obtenidas.

Modulo	Nro. T	Nro. QT	Nro. PCR +		% PCR+	
			T	QT	T	QT
1	2	1	2	1	100%	100%
1'	18	0	16	-	88%	-
2	9	-	7	-	77%	-
2'	1	9	1	6	100%	66%
3	4	-	4	-	100%	-

La mayoría de las plantas que fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en medio selectivo (plantas T) fueron PCR positivas, existiendo solamente en dos de los módulos escapes a esta presión de selección. Esto pudo deberse a errores experimentales, como por ejemplo el atraso en los momentos de cambio de los medios, lo que pudo disminuir el efecto de la kanamicina y la higromicina, posibilitando el crecimiento de brotes no transformados.

En el Cuadro 16 no se muestra el número de plantas Q obtenidas a partir de los diferentes módulos (plantas infectadas con la bacteria conteniendo el plásmido, pero no seleccionadas por su capacidad de crecer en medio con agente de selección), pero igualmente se analiza a continuación lo sucedido en los módulos 1 y 1' con estas plantas.

La relación Q/QT de los módulos 1 y 1' fue en un principio de 100%, o sea, todos los explantes obtenidos en medio no selectivo (Q), enraizaron en medio selectivo. Dado esta relación, se pensó en la posibilidad de que *A. tumefaciens* transformadas que estuviesen alojadas vascularmente, estuviesen detoxificando la kanamicina permitiendo de esta manera el crecimiento de las plantas. Esto es posible dado que el gen de resistencia a kanamicina es de origen procariota y confiere resistencia a la bacteria portadora.

Para comprobar dicha hipótesis se colocaron segmentos de tallo en medio líquido LB conteniendo 100 mg/L de estreptomina, spectinomicina, rifampicina y kanamicina, en agitación a 28°C durante dos días, para permitir el crecimiento bacteriano. Se constató crecimiento bacteriano a partir del cual se plaqueó a medio LB sólido conteniendo la misma concentración de antibióticos mencionada, obteniendo tres días después colonias que por análisis de PCR confirmaron ser bacterias portadoras del plásmido pGJ 370 - RIP + Qui [nptII].

Se presume entonces que se trata de *A. tumefaciens* cepa LBA 4404 transformada, ya que la presencia del plásmido, detectada por PCR y el

crecimiento de la bacteria en medio altamente inhibitorio, por altas concentraciones de cuatro antibióticos, prácticamente descartan otra posibilidad.

Análisis posteriores deberían llevarse a cabo para confirmar totalmente esta hipótesis, pero es posible que las bacterias sean el motivo de la detoxificación de la kanamicina y el crecimiento de brotes no transformados en medio selectivo. Por esta razón posteriormente se incrementó la presión de selección a 200 mg/L de kanamicina para enraizamiento en el medio de multiplicación, y se agregó 300 mg/L de carbenicilina al medio. De esta forma se obtuvo un solo clon QT (PCR positivo) de los módulos 1 y 1'.

4.5. RELACIÓN ENTRE CAPACIDAD DE ENRAIZAMIENTO EN MEDIO SELECTIVO Y RESULTADO DE PCR

Debido a la importancia de no obtener plantas falsas positivas producto de la selección por el agente selectivo, durante el desarrollo del trabajo se planteó la posibilidad de verificar la existencia de alguna relación entre la capacidad de enraizamiento en medio con el agente de selección y el resultado de PCR. Por esta razón es que se colocaron a crecer algunas de las plantas T y QT en medio de multiplicación de papa, conteniendo higromicina o kanamicina, según el módulo, en las concentraciones previamente determinadas.

Según el resultado de enraizamiento a estas plantas se las clasificó de acuerdo a la escala ya especificada en materiales y métodos. En el cuadro 17 se observa la clasificación y el resultado de PCR de dichas plantas. Estos resultados se agruparon para su análisis (Cuadro 18), determinándose que aquellas plantas clasificadas 0 podían ser consideradas "probablemente PCR negativas" antes de su análisis e igualmente las plantas con los valores 3 y 4 podían considerarse "probablemente positivas". Para el caso de las plantas 1 y 2, si bien su crecimiento en medio selectivo es un buen indicador, el posterior análisis molecular no puede ser saltado. Estos datos no tienen un valor estadístico pero contribuyen a la validación del método de transformación.

Cuadro 17. Enraizamiento en medio selectivo y resultado de PCR.

Clon	Agente selección	Puntaje escala	PCR
5QT5	Higromicina 8 mg/L	0	-
5QT2	Higromicina 8 mg/L	2	+
5QT8	Higromicina 8 mg/L	2	+
5QT1	Higromicina 8 mg/L	1	+
5QT4	Higromicina 8 mg/L	2	+
5QT9	Higromicina 8 mg/L	0	-
5QT7	Higromicina 8 mg/L	1	-
5T1	Higromicina 8 mg/L	3	+
3T7	Higromicina 8 mg/L	4	+
3T5	Higromicina 8 mg/L	2	-
3T6	Higromicina 8 mg/L	4	+
3T9	Higromicina 8 mg/L	3	+
3T11	Higromicina 8 mg/L	3	+
3T10	Higromicina 8 mg/L	2	+
4T8	Kanamicina 100 mg/L	4	+
4T19	Kanamicina 100 mg/L	4	+
4T9	Kanamicina 100 mg/L	3	+
4T10	Kanamicina 100 mg/L	3	+
4T1	Kanamicina 100 mg/L	2	+
4T14	Kanamicina 100 mg/L	3	+
4T2	Kanamicina 100 mg/L	2	-
4T1	Kanamicina 100 mg/L	2	+
4T3	Kanamicina 100 mg/L	3	+
1T2	Kanamicina 100 mg/L	3	+
1T1	Kanamicina 100 mg/L	3	+

Cuadro 18. Relación entre capacidad de enraizar en medio con agente de selección y resultado de PCR.

Escala	Nro clones	Nro PCR+	PCR+/Nºclones
0	2	0	0
1	2	1	0.5
2	8	6	0.75
3	9	9	1.0
4	4	4	1.0
Total necrosados (0)	2	0	0
Total vivos (1,2,3,4)	23	20	0.87

4.6. ACLIMATACIÓN Y OBTENCIÓN DE MINITUBÉRCULOS

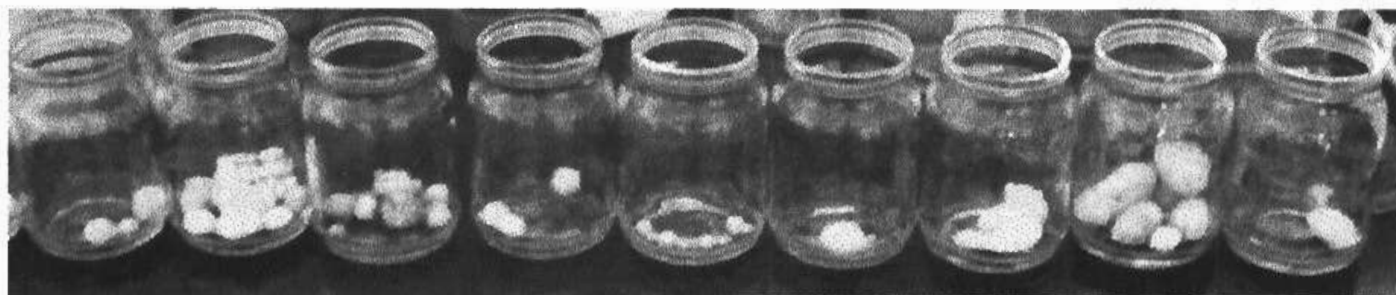
Las plantas *in vitro* que resultaron PCR positivas, se aclimataron en invernáculo, colocándolas en macetas bajo cubierta plástica durante un mes.

Los minitubérculos obtenidos fueron morfológicamente normales, teniendo una brotación adecuada, lo que determina que son un buen material de partida para la implantación de un cultivo a campo.

Se constató también, que el tiempo medio a la brotación de los minitubérculos obtenidos fue acorde a la descrita para el cultivar, indicando que la inserción de los genes foráneos no afectó esta característica.

En la foto 17 se muestra una serie de minitubérculos, obtenidos de la manera anteriormente indicada, de distintos clones positivos.

Foto 17. Minitubérculos obtenidos en invernáculo de clones positivos.



Minitubérculos de clones transgénicos de Kennebec e Iporá, morfológicamente normales. Estas líneas han mantenido las características descritas para ambos cultivares en lo que se refiere a: color de piel y pulpa y dormancia.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se transformaron los cultivares de papa Kennebec e Iporá, mediante el sistema de *Agrobacterium tumefaciens*. El cultivar Kennebec fue transformado con una construcción plasmídica conteniendo genes codificadores de quitinasa y RIP, mientras que el cultivar Iporá fue transformado con esta misma construcción y con otra conteniendo los genes codificadores de lisozima y la osmotina AP24.

Se utilizó un protocolo de transformación que utiliza segmentos internodales de papa como explantes de partida. Estos métodos de transformación, obtienen en promedio un 3% de eficiencia, medido en número de explantes que regeneran plantas transgénicas, sobre el número de explantes utilizados. (com. pers. Silvia Cabral – INGEI; Visser *et al.*, 1989).

La eficiencia promedio en los módulos realizados en este trabajo es de 2,4%, lo que lo ubica dentro del rango obtenido en otros centros de investigación. Si se incluyen las plantas QT PCR positivas aumenta el valor de la eficiencia del proceso, pero debido a que el número de QT obtenidos es muy bajo y que dichas plantas no se comportaron 100 % PCR positivas, en una primera instancia se plantea que la selección de plantas por este medio no es lo recomendable, más aún si se considera las horas de trabajo insumidas en este ensayo.

La eficiencia lograda utilizando hojas o minitubérculos como explantes de partida es mucho más alta, entre un 20 y 50% (com. pers. Fernando Bravo – INGEI; Cecilia Vázquez – INTA), por lo que se debería poner a punto estos métodos de manera de obtener más clones y aumentar la posibilidad de obtener un evento exitoso.

La evaluación de transgénicos mediante el método de amplificación por PCR si bien es adecuada por la posibilidad de realizar análisis de varios materiales simultáneamente, no da un resultado concluyente, ya que un PCR positivo sólo indica que en el material de partida se encuentra aunque sea trazas de la secuencia complementaria a los *primers* utilizados. Estas secuencias pueden ser contaminaciones bacterianas, específicamente de *A. tumefaciens* utilizado para la transformación portando el plásmido vector y por lo tanto la secuencia nucleotídica complementaria a los *primers* (Register III, 1997). Tampoco indica la integración completa del ADN-T, ni el número de copias integradas. Sin embargo, es una muy buena herramienta como primer análisis de posibles transgénicos y para el trabajo se tomará a los clones positivos como transgénicos hasta que se demuestre lo contrario.

Complementariamente se intentó determinar la eficacia del agente de selección como control de posibles escapes. La alta correlación de los clones que enraizaron con el resultado positivo de PCR indica que la selección por enraizamiento es un muy buen indicador de la naturaleza transgénica de los materiales evaluados. Mejor aún es tomar los valores extremos de la escala de enraizamiento (0,3 y 4) franja en la cual no se constató ningún escape.

Cada una de las 37 plantas obtenidas en los módulos realizados es un evento de transformación diferente, ya que los niveles de expresión génica cambian según el punto de inserción del ADN-T en el genoma recipiente, así como el número de copias del gen que han sido introducidas (Jones 1985, citado por Zhu *et al.*, 1994). Es por eso que la evaluación de los transgénicos debe continuar hasta caracterizar los clones obtenidos según: número de copias del gen inserto, nivel de expresión de las nuevas proteínas, nivel de resistencia finalmente obtenido frente a patógenos y comportamiento agronómico.

El número de copias insertas se podría determinar mediante Southern Blot e hibridación con sondas específicas con fragmentos de ADN total digerido con una enzima de restricción que realice un solo corte dentro del inserto. De esta manera se obtienen bandas de distinto tamaño por cada copia inserta, dado que el sitio de corte exterior al ADN-T es dependiente de la zona de inserción.

El nivel de expresión de los nuevos genes se determinaría mediante Western Blot. Para determinar el nivel de expresión se utilizan anticuerpos que detectan las cantidades de cada una de las nuevas proteínas. Este análisis debería realizarse en distintos tejidos de la planta.

El nivel de resistencia se estimaría mediante desafío biológico en invernáculo. Los clones con mejor expresión son sometidos a elevados niveles de inóculo de manera de evaluar su comportamiento sanitario en situaciones extremas.

Finalmente la aptitud agronómica es evaluada por ensayos de campo. El clon evaluado debe mantener el biotipo de la planta madre, sus características productivas y obtener un rendimiento mayor o igual en un sistema de producción tipo.

Este es el trabajo mínimo que se considera necesario para evaluar líneas transgénicas. De esta manera los clones de buen comportamiento, debidamente caracterizados, pueden ingresar a un programa de mejoramiento o liberarse al mercado como cultivares nuevos para producción directa.

El tiempo que demandó la generación de plantas PCR positivas, incluyendo su regeneración completa *in vitro*, su aclimatación a condiciones de invernáculo, y la producción de minitubérculos fue de aproximadamente siete meses. Si bien estos materiales deben ser sometidos a los ensayos ya mencionados, el tiempo total insumido hasta la liberación de un clon como cultivar es menor al tiempo necesario para generar un nuevo cultivar con los métodos tradicionales.

6. CONCLUSIONES

La variabilidad es la base del mejoramiento y el progreso genético. Mediante los procesos biotecnológicos discutidos en este trabajo, se genera variabilidad, menor que en los procesos de recombinación que tienen lugar en la reproducción sexual, pero distinta en el sentido que rompe con barreras de compatibilidad, generando combinaciones genéticas nuevas en la evolución natural de estos genomas.

En pocos meses de trabajo es posible producir un alto número de plantas transgénicas. Este corto tiempo, hace que la técnica de transformación sea muy atractiva para la utilización en el mejoramiento vegetal.

La necesidad de reducir los tiempos para la generación de respuestas no sólo obliga a utilizar nuevas técnicas, sino también a hacerlo de la forma más eficiente posible. En este trabajo se logró ajustar la técnica de transformación a partir de segmentos internodales de papa para dos cultivares diferentes, vía *Agrobacterium tumefaciens*. La eficiencia lograda fue cercana al 3%. Se podrían probar otros protocolos de transformación con el fin de mejorar los valores de eficiencia obtenidos.

Los pasos a seguir en la evaluación de las plantas obtenidas en este trabajo deben realizarse indefectiblemente, de modo de determinar correctamente la eficiencia obtenida. Debido a los alcances de este trabajo no se realizaron las evaluaciones posteriores.

La conclusión más relevante es que se cuenta con la tecnología necesaria para la realización de plantas transgénicas, en este caso específicamente papa, pero en un futuro también de otros cultivos de mayor incidencia en el ámbito nacional. Esto es muy importante dado que en el mundo el mejoramiento asistido por herramientas moleculares se encuentra muy avanzado y cada país debe desarrollar su propia tecnología y variedades ya que los paquetes importados no siempre se adaptan a las necesidades locales. Por esto se incluyó el cultivar Iporá en el ensayo.

La racional utilización de esta tecnología permitirá reducir la cantidad de agroquímicos en el cultivo de papa, mejorando la calidad del producto y reducir los costos de producción.

7. RESUMEN

El cultivo de papa es de relevante importancia alimentaria en el país, la región y el mundo. El mismo es atacado por una serie de patógenos, cuyo acción puede conllevar pérdidas de hasta el 100% del rendimiento del cultivo, siendo el manejo sanitario de principal prioridad en el sistema productivo.

La ingeniería genética es una importante herramienta para la generación de nuevos materiales con mejor comportamiento sanitario, de manera de asegurar mayor rendimiento, además de una reducción en la cantidad de principio activo agregado por hectárea y, por consiguiente, de los costos de producción. Se presenta entonces como una opción para generar una rápida y eficiente respuesta al problema planteado, tanto en éste como en otros cultivos.

Con el fin de obtener plantas transgénicas con mejor nivel sanitario, se transformaron mediante el sistema *Agrobacterium tumefaciens* los cultivares Iporá y Kennebec, ambos de gran importancia en el medio nacional, con construcciones plasmídicas dobles cada una de las cuales consistía en dos genes de acción antipatogénica ambos regulados por el promotor constitutivo CaMV 35S.

Los genes utilizados codifican péptidos de probada actividad antipatogénica. Estos son: quitinasa, enzima lítica de la quitina componente mayoritario de la pared celular fúngica, RIP's (proteína inactivadora de ribosomas) que selectivamente inactiva los ribosomas fúngicos, lisozima de origen aviar, enzima que digiere los enlaces N-acetil murámico y N-acetil glucosamina de la pared celular bacteriana y la osmotina AP24 que por generar un desbalance en el potencial osmótico presenta actividad antibacteriana y antifúngica.

Las combinaciones de estos genes utilizados fueron: quitinasa más RIP, y lisozima más osmotina AP24. En la primera, la acción de estas dos proteínas en conjunto producen un efecto sinérgico potenciando la actividad antifúngica, la última es una construcción que presenta un alto potencial de actividad antibacteriana.

Para determinar la naturaleza transgénica de las plantas obtenidas estas se testearon por PCR con *primers* específicos y por test de enraizamiento en medio selectivo.

Se realizaron cinco módulos de donde se obtuvieron un total de 37 clones PCR positivos, y por lo tanto posiblemente transformados, los cuales

representan un 2,96% de eficiencia lo que concuerda con lo reportado para este método.

Se demostró también la eficacia del testeo por enraizamiento para reconocer los clones transformados, ya que la correlación de las plantas que crecieron de forma normal sobre medio selectivo y las plantas PCR positivas resultó ser alta.

Los clones positivos serán la base para realizar ensayos biológicos y agronómicos con el fin de obtener materiales indistinguibles de los cultivares madre pero con la adición de actividad antipatogénica conferida por los genes de defensa incluidos.

8. SUMMARY

The potato is a very important crop for the country, the region and the world. It is attacked by many pathogens that may cause huge losses of yield if the sanitary management is not properly considered.

The genetic engineering is a very important tool to generate new genotypes with improved resistance levels in order to achieve better yield, reductions of costs and fewer amounts of active ingredients used by hectare. It represents a new approach to generate a quick and efficient answer to the sanitary problem stated above.

In order to get transgenic plants with improved resistance levels, the cultivars Iporá and Kennebec, both very planted in the country, were transformed by the *Agrobacterium tumefaciens* system with two double constructs each of one harbored two genes with proved antipathogenic activity, and both regulated by the constitutive promoter CaMV 35S.

The genes used were: chitinase, a litic enzyme of the chitin, which is one of the main components of the fungic cell wall, RIP's (ribosome inactivating protein) that selectively inactive the fungal ribosomes, avian lisozyme, a enzyme that digest the bounds N-acetyl muramic and N-acetyl glucosamine of the bacterial cell wall, and AP24 osmotin, that creates a osmotic potential that is active against both fungus and bacteria.

Combinations used were chitinase plus RIP's, which acts sinergically against fungal phatogens, and lisozyme, plus AP24 that has a high potential to control bacterial diseases.

Specific PCR and selective rooting in antibiotic media tested transgenic nature of the clones obtained.

Thirty-seven putative transgenic clones were obtained out of five experimental blocks, which gives an efficiency of 2,96%. This value is whitin the range reported to the method.

It was also shown that a high score in the rooting test is highly correlated to the trasngenic nature of the plant. Correlation between plants rotting in selective media and PCR positive clones was high.

Positive clones will be the starting point to perform biological and agronomic assays to select those indistinguishable from the mother cultivar but with improved resistance to pathogens due to the antipathogenic activity conferred by the genes newly included.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. AGRIOS, G.N. 1989. Fitopatología. 3ª reimpression. Mexico. Limusa. 756p
2. ALLEFS, S.J.; FLORACK, D.E.; HOOGENDOORN, C.; STIEKEMA, W.J. 1995. *Erwinia* soft rot resistance of potato cultivars transformed with a gene construct coding for antimicrobial peptide cecropin B is not altered. *American Potato Journal* 72: 8, 437-445
3. BAKER, C.J.; ORLANDI, E.W. 1995. Active oxygen species in plant pathogenesis. *Annual Review Phytopathology* 33: 299-321
4. BENHAMOU, N.; BROGLIE, K.; CHET, I.; BROGLIE, R. 1993. Cytology of infection of 35S-bean chitinase transgenic canola plants by *Rhizoctonia solani*: cytochemical aspects of chitin breakdown *in vivo*. *The Plant Journal* 4(2): 295-305
4. BOMAN, H.G. 1991. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell*, 65: 205-207.
6. BROGLIE, K.; CHET, I.; HOOLIDAY, M.; CRESSMAN, R.; BIDDLE, P.; KNOWLTON, S.; MAUVAIS, C.J.; BROGLIE, R. 1993. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254 1194 - 1197.
7. CHANG, M.; HADWIGER, L.A. Y HOROVITZ, D. 1992. Molecular characterization of a pea B-1,3- glucanase induced by *Fusarium solani* and chitosan challenge. *Plant Molecular Biology* 20: 609-618
8. COLLINGE, D.B.; KRAGH, K.M.; MIKKELSEN, J.D.; NIELSEN, K.K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. 1993. Plant chitinases. *The Plant Journal* 3(1):31 - 40
9. CONSTABEL, C.P.; BERTRAND, C.; BRISSON, N. 1993. Transgenic potato plants overexpressing the pathogenesis-related STH-2 gene unaltered susceptibility to *Phytophthora infestans* and potato virus X. *Plant Molecular Biology* 22:775 - 782

10. CONSTABEL,C.P.; BRISSON,N. 1995. Stigma and Vascular-specific expression of the PR-10 a gene of potato: a novel pattern of expression of a pathogenesis-related gene. *Molecular Plant Microbe Interactions* 8(1): 104-113
11. CORNELISSEN,B.; MELCHERS,L. 1993. Strategies for control of diseases with transgenic plants. *Plant Physiology* 101: 709-712
12. DIXON, R.A.; HARRISON, M.J. 1990 Activation, structure, and organization, of genes involved in microbial defense in plants. *Advances in Genetics* 28: 165-234
13. DRAPER,J. 1997. Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends in plant science* 2(5): 162-165
14. DÜRING,K. 1993. Can lysozymes mediate antibacterial resistance in plants?. *Plant Molecular Biology* 23: 209-214
15. DÜRING,K.; PORSCHE,P.; FLADUNG,M.; LÖRZ,H. 1993. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *The Plant Journal* 4 :587-598.
16. FLORACK,D.; ALLEFS,S.; BOLLEN,R.; BOSCH,D.; VISSER,B.; STIEKEMA,W. 1995. Expression of giant silkworm cecropin B genes in tobacco. *Transgenic Research* 4(2): 132-141
17. GIRGÉS,T.; FERRERAS,R.; IGLESIAS,R.; CITORES,L.; D.E.; TORRE,C.; CARBAJALES,M.L.; JIMÉNEZ,P.; DE BENITO,F.M.; MUÑOZ,R. 1996. Recent advances in the uses and applications of ribosome-inactivating proteins from plants. *Cell. molecular. biology.* 42 (4): 461 - 471.
18. GODIARD,L.; GRANT,M.; DIETRICH,R.A.; KIEDROWSKI,S.; DANGL,J. 1994. Perception and response in plant disease resistance. *Current Opinion in Genetics and Development* 4: 662-671
19. GRISON, R.; GREZES-BESSET, B.; SCHNEIDER, M.; LUCANTE, N.; OLSEN, L.; LEGUAY, J-J.; TOPPAN, A. 1996. Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. *Nature biotechnology* 14: 643-647

20. GUDMUNDSSON, G.H.; LIDHOLM, D.A.; ASLING, B.; GAN, R.; BOMAN, H.G. 1991. The cecropin locus: cloning and expression of a gene cluster encoding three antibacterial peptides in *Hyalophora cecropia*. Journal Biological. Chemistry. 266 (18):11510-11517.
21. HARTLEY, M.R.; CHADDOCK, J.A.; BONNESS, M.S. 1996. The structure and function of ribosome-inactivating proteins. Trends in plant science 1(8): 254 -260
22. HASSAN, M.; SINDEN, S.L.; KOBAYASHI, R.S.; NORDEEN, R.O.; OWENS, L.D. 1993. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) with a gene for an antibacterial protein, cecropin. Acta Horticulturae 336: 127-131
23. HIGHTOWER, R.; BADEN, C.; PENZES, E.; DUNSMUIR, P. 1994. The expression of cecropin peptide in transgenic tobacco does not confer resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Plant Cell Reports 13 (5) 295-299
24. JONGEDIJK, E.; TIGELAAR, H.; VAN ROEKEL, J.S.C.; BRES-VLOEMANS, S.A.; DEKKER, I.; VAN DEN ELZEN, P.J.; CORNELISSEN, B.J.; MELCHERS, L.S. Synergistic activity of chitinases and B-1,3- glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. 1995. Euphytica 85: 173-180.
25. KEEN, N.T. 1992. The molecular biology of disease resistance. Plant. Molecular. Biology. 19: 109-122
26. KELLMANN, J.W.; KLEINOW, T.; ENGELHARDT, K.; PHILIPP, C.; WEGENER, D.; SCHELL, J.; SCHREIER, P.H. 1996. Characterization of two class II chitinase gene from peanut and expression studies in transgenic tobacco plants. Plant Molecular Biology 30: 351-358
27. KINAL, H.; PARK, C.; BERRY, J.O.; KOLTIN, Y.; BRUENN, J.A. 1995. Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic tobacco plants: evidence for a Kex2p pathway in plants. The Plant Cell 7: 677-688
28. LAMB, C.J.; RYALS, J.A.; WARD, E.R.; DIXON, R.A. 1992. Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens. Bio/technology 10: 1436-1445

29. LEE, W.; BREY, P.T. 1995. Isolation and characterization of the lysozyme-encoding gene from the silkworm *Bombyx mori*. *Gene* 161 (2): 199-203
30. LEVORSON, C.H.; CHLAN, C.A. 1997. Plant chitinases consensus sequences. *Plant Mol. Biology* 15 (2) 122-133
30. LIU, D.; RAGHOTHAMA, K.G.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN. 1994. Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proceedings. National. Academic. Science* 91: 1888-1892
31. LODGE, J.K.; KANIEWSKI, W.K.; TURNER, N.E. 1993. Broad -spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proceedings National. Academic Science* 90: 7089-7093
33. LOGEMANN, J.; JACH, G.; TOMMERUP, H.; MUNDY, J.; SCHELL, J. 1992. Expression of barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants. *Bio/technology* 10: 305 - 308
34. MARTINI, N.; EGEN, M.; RUNTZ, I.; STRITTMATTER, G. 1993. Promoter sequences of a potato pathogenesis-related gene mediate transcriptional activation selectively upon fungal infection. *Molecular. General. Genetics*. 236: 179-186
35. MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. 1982. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
36. MAYER, R.T.; MCCOLLUM, T.G.; NIEDZ, R.P.; HEARN, C.J.; MCDONALD, R.E.; BERDIS, E.; DOOSTDAR, H. 1996. Characterization of seven basic endochitinases isolated from cell cultures of *Citrus sinensis* (L.). *Planta* 200 (3): 289-295
37. MELCHERS, L.S.; SELA-BUURLAGE, M.B.; VLOEMANS, S.A.; WOLOSHUK, C.; VAN ROEKEL, J.; PEN, J.; VAN DEN ELZEN, P.; CORNELISSEN, B. 1993. Extracellular targeting of vacuolar tobacco proteins AP24, chitinase and β -1,3-glucanase in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 21:583-593

38. MELCHERS, L.S.; APOTHEKER-DE GROOT, M.; VAN DER KNAAP, J.A.; PONSTEIN, A.S.; SELA-BUURLAGE, M.B.; BOL, J.F.; CORNELISSEN, B.J.; VAN DEN ELZEN, P.J.; LINTHORST, J.M. 1994. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *The plant Journal* 5(4): 469-480
39. MONTANELLI, C.; NASCARI, G. 1991. Introduction of an antibacterial gene in potato (*Solanum tuberosum* L.) using a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Genetics and Breeding*. 45 (4): 307-315
40. MORENO, M.; SEGURA, A.; GARCIA-OLMEDO, F. 1994. Pseudotionin-St1, a potato peptide active against potato pathogens. *European Journal Biochemistry*. 223: 135-139
41. NEUHAUS, J.; FLORES, S.; KEEFE, D.; AHL-GOY, P.; MEINS, F. 1992. The function of vacuolar B -1,3- glucanase investigated by antisense transformation. Susceptibility of transgenic *Nicotiana sylvestris* plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Molecular Biology* 19: 803-813
42. OPPENHEIM, A.B.; CHET, I. 1992. Cloned chitinases in fungal plant-pathogen control strategies. *Tibtech* 10: 392 - 394
43. PARK, C.; BERRY, J.O.; BRUENN, J.A. 1996. High-level secretion of a virally encoded anti-fungal toxin in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 30: 359-366
44. PRESTLE, J.; SCHÖNFELDER, M.; ADAM, G.; MUNDRY, K.W. 1992. Type 1 ribosome-inactivating proteins depurinate plant 25S rRNA without species specificity. *Nucleic Acids Research*. 20: 3179 - 3182
45. REGISTER III, J.C. 1997. Approaches to evaluating the transgenic status of transformed plants. *Tibtech* 15: 141-146
46. REIMMANN, C.; DUDLER, R. 1993. cADN cloning and sequence analysis of a pathogen induced thaumatin-like protein from rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiology*. 101: 1113-1114
47. REINBOTHE, S.; MOLLENHAUER, B.; REINBOTHE, C. 1994. JIPs and RIPs: the regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *The Plant Cell* 6: 1197-1209

48. SAMAC, D.A.; SHAH, D.M. 1994. Effect of chitinase antisense RNA expression on disease susceptibility of Arabidopsis plants. *Plant Molecular Biology* 24:587-596
49. SCHAAF, J.; WALTER, M.H.; HESS, D. 1995. Primary metabolism in plant defense. *Plant Physiology*. 108: 949-960
50. SCHWEIZER, P.; BUCHALA, A.; SILVERMAN, P.; SESKAR, M.; RASKIN, I.; METRAUX, J.-P. 1997. Jasmonate-inducible genes are activated in rice by pathogen attack without a concomitant increase in endogenous jasmonic acid levels. *Plant Physiology*. 114: 79 - 88
51. SELA-BUURLAGE, M.B.; PONSTEIN, A.S.; BRES-VLOEMANS, S.A.; MELCHERS, L.S.; VAN DEN ELZEN, P.J.M.; CORNELISSEN, J.C. 1993. Only specific Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Chitinases and B-1,3-glucanases exhibit Antifungal activity. *Plant Physiology* 101:857-863
52. STASKAWICZ, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J.; ELLIS, J.G.; JONES, J. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268: 661-666
53. STRITTMATTER, G.; JANSSENS, J.; OPSOMER, C.; BOTTERMAN, J. 1995. Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell death. *Biotechnology* 13:1085-1089
54. TAKEMOTO, D.; FURUSE, K.; DOKE, N.; KAWAKITA, K. 1997. Identification of chitinase and osmotin-like protein as actin-binding proteins in suspension-cultured potato cells. *Plant Cell Physiol.* 38(4): 441-448
55. TATTERSALL, D.B.; VAN HEESWIJCK, R.; HOJ, P.B. 1997. Identification and characterization of a fruit-specific thaumatin -like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiology*. 114:759-769.
56. VERA-ESTRELLA, R.; HIGGINS, V.; BLUMWALD, E. 1994. Plant defense response to fungal pathogens. *Plant Physiology*. 106: 97 - 102

57. VISSER, R.G.F.; JACOBSEN, E.; HESSELING-MEINDERS, A.; SCHANS, M.J.; WITHOLT, B.; FEENESTRA, W.J. 1989. Transformation of homozygous diploid potatoes with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. *Plant Molecular Biology*. 12:329-337
58. WOLOSZUK, C.P.; MEULENHOF, J.S.; SELA-BUURLAGE, M.; VAN DEN ELZEN, P.; CORNELISSEN, B.J. 1991. Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 3: 619-128
59. WU, G.; SHORTT, B.; LAWRENCE, L.; LEVINE, E.; FITZSIMMONS, K.; SHAH, D. 1995. Disease Resistance Conferred by Expression of a Gene Encoding peroxide-Generating Glucose Oxidase in Transgenic Potato Plants. *The Plant Cell* 7: 1357-1368
60. ZHU, B.; CHEN, T.; LI, P. 1996. Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. *Planta* 198:70-77
61. ZHU, Q.; MAHER, E.A.; MASOUD, S.; DIXON, R.A.; LAMB, C.J. 1994. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Biotechnology*. 12: 807-812

10. ANEXO

10.1 GEN Y TRADUCCIÓN DE LIZOSIMA AISLADA DE CLARA DE HUEVO DE POLLO.

										7										17																																																	
										caagacccttctctat																																																											
27										37										→										57										67										77										87									
ataaggaagt										tcatttcatt										tggagaggac										acgctgaaat										caccagtctc										tctctacaagat										cccccaac									
99										108										117										126										135										144																			
Met	Arg	Ser	Leu	Leu	Ile	Leu	Val	Leu	Cys	Phe	Leu	Pro	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Lys	Met	Arg	Ser	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Lys	Met	Arg	Ser	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Lys																																	
ATG	AGG	TCT	TTG	CTA	ATC	TTG	GTG	CTT	TGC	TTC	CTG	CCC	CTG	GCT	GCT	CTG	GGG	AAA	ATG	AAG	CGT	CAC	GGA	CTT	GAT	AAC	TAT	ATG	AAG	CGT	CAC	GGA	CTT	GAT	AAC	TAT																																	
156										165										174										183										192										201																			
Val	Phe	Gly	Arg	Cys	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Met	Lys	Arg	His	Gly	Leu	Asp	Asn	Tyr	Val	Lys	Arg	His	Gly	Leu	Asp	Asn	Tyr	Val	Lys	Arg	His	Gly	Leu	Asp	Asn	Tyr																																	
GTC	TTT	GGA	CGA	TGT	GAG	CTG	GCA	GCG	GCT	ATG	AAG	CGT	CAC	GGA	CTT	GAT	AAC	TAT	ATG	AAG	CGT	CAC	GGA	CTT	GAT	AAC	TAT	ATG	AAG	CGT	CAC	GGA	CTT	GAT	AAC	TAT																																	
213										222										231										240										249										258																			
Arg	Gly	Tyr	Ser	Leu	Gly	Asn	Trp	Val	Cys	Val	Ala	Lys	Phe	Glu	Ser	Asn	Phe	Asn	Arg	Gly	Tyr	Ser	Leu	Gly	Asn	Trp	Val	Arg	Gly	Tyr	Ser	Leu	Gly	Asn	Trp	Val																																	
CGG	GGA	TAC	AGC	CTG	GGA	AAC	TGG	GTG	TGT	GTT	GCA	AAA	TTC	GAG	AGT	AAC	TTC	AAC	CGG	GGA	TAC	AGC	CTG	GGA	AAC	TGG	GTG	CGG	GGA	TAC	AGC	CTG	GGA	AAC	TGG	GTG																																	
270										279										288										297										306										315																			
Thr	Gln	Ala	Thr	Asn	Arg	Asn	Thr	Asp	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Gly	Ile	Leu	Gln	Ile	Thr	Gln	Ala	Thr	Asn	Arg	Asn	Thr	Thr	Gln	Ala	Thr	Asn	Arg	Asn	Thr	Asp																																		
ACC	CAG	GCT	ACA	AAC	CGT	AAC	ACC	GAT	GGG	AGT	ACC	GAC	TAC	GGA	ATC	CTA	CAG	ATC	ACC	CAG	GCT	ACA	AAC	CGT	AAC	ACC	ACC	CAG	GCT	ACA	AAC	CGT	AAC	ACC	GAT																																		
327										336										345										354										363										372																			
Asn	Ser	Arg	Trp	Trp	Cys	Asn	Asp	Gly	Arg	Thr	Pro	Gly	Ser	Arg	Asn	Leu	Cys	Asn	Asn	Ser	Arg	Trp	Trp	Cys	Asn	Asp	Asn	Ser	Arg	Trp	Trp	Cys	Asn	Asp	Gly																																		
AAC	AGC	CGC	TGG	TGC	AAC	GAT	GGC	AGG	ACC	CCA	GGC	TCC	AGG	AAC	CTG	TGC	AAC	AAC	AGC	CGC	TGG	TGC	AAC	GAT	GGC	AAC	AGC	CGC	TGG	TGC	AAC	GAT	GGC	AGG																																			
384										393										402										411										420										429																			
Ile	Pro	Cys	Ser	Ala	Leu	Leu	Ser	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Ser	Val	Asn	Cys	Ala	Lys	Ile	Pro	Cys	Ser	Ala	Leu	Leu	Ile	Pro	Cys	Ser	Ala	Leu	Leu	Ser	Asp																																			
ATC	CCG	TGC	TCA	GCC	CTG	CTG	AGC	TCA	GAC	ATA	ACA	GCG	AGC	GTG	AAC	TGC	GCG	AAG	ATC	CCG	TGC	TCA	GCC	CTG	CTG	ATC	CCG	TGC	TCA	GCC	CTG	CTG	AGC	TCA																																			
441										450										459										468										477										486																			
Lys	Ile	Val	Ser	Asp	Gly	Asn	Gly	Met	Ser	Ala	Trp	Val	Ala	Trp	Arg	Asn	Arg	Cys	Lys	Ile	Val	Ser	Asp	Gly	Lys	Ile	Val	Ser	Asp	Gly	Asn	Gly	Met																																				
AAG	ATC	GTC	AGC	GAT	GGA	AAC	GGC	ATG	AGC	GCG	TGG	GTC	GCC	TGG	CGC	AAC	CGC	TGC	AAG	ATC	GTC	AGC	GAT	GGA	AAG	ATC	GTC	AGC	GAT	GGA	AAC	GGC	ATG																																				
498										507										516										525										534																													
Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Gln	Ala	Trp	Ile	Arg	Gly	Cys	Arg	Leu	*	Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Gln	Ala	Trp	Ile																																				
AAG	GGT	ACC	GAC	GTC	CAG	GCG	TGG	ATC	AGA	GGC	TGC	CGG	CTG	TGA	AAG	GGT	ACC	GAC	GTC	AAG	GGT	ACC	GAC	GTC	AAG	GGT	ACC	GAC	GTC	CAG	GCG	TGG	ATC																																				

10.3 ALGUNOS TRANSGÉNICOS LIBERADOS HASTA EL MOMENTO.

Especie	Característica.
Alfalfa	Mejora almacenamiento, Resistencia a SbMV, Machoesterilidad, Tolerancia a phosphinothricina, Resistencia a AMV, Resistencia a kanamicina, Resistencia a Phytophthora, Resistencia Rhizoctonia, Producción de proteínas farmaceuticas, Resistencia a lepidopteros, Producción de enzimas industriales, Resistencia a coleopteros.
Manzana	Resistencia a lepidopteros, Resistencia a fuego bacteriano, Maduración alterada, Resistencia a coleopteros.
Arabidopsis thaliana	Tolerante a clorsulfurón, Tolerante a sulfunylurea
Cebada	Tolerancia a phosphinothricina, Resistencia a BYDV, Producción de proteína termoestable.
Remolacha	Tolerante a glifosato, Tolerante a phosphinothricina, Resistencia a BNYVV
Brassica	Machoesterilidad, Resistencia a lepidopteros, Tolerante a phosphinothricina
Zanahoria	Calidad nuricional alterada, Resistencia a Alternaria
Crisantemo	Metabolismo de pigmentos alterado
Maiz	Resistencia a mancha foliar, Marcador visual, Tolerante a phosphinothricina, Proteína de almacenamiento alterada.
Algodón	Resistencia a lepidoperos, Tolerante a glifosato, Tolerante a bromoxynil, Tolerante a sulfonylurea
Pepino	Resistencia a CMV, PRV, SMV, WMV2, ZYMV.
Berenjena	Resistencia a coleopteros.
Uva	Marcador visual, Resistencia a lepidopteros, Resistencia a AMV, CMV
Lechuga	Resistencia a mildiu, TSWV, LMV, Tolerante a glifosato.
Melón	Resistencia a CMV, ZYMV, PRV, SMV, WMV2, SgMV, Resistencia a phytophthora, Maduración del fruto alterada y retrasada.
Cebolla	Resistencia a Fusarium, Phoma.
Papaya	Resistencia a PRV, PRSV.
Arveja	Almidón reducido.
Petunia	Metabolismo de pigmentos alterado, Resistencia a Erwinia, Phytophthora y enfermedades en general.
Alamo	Marcador selectivo, Tolerante a glifosato, Tolerante a phosphinothricina, Resistencia a insectos

Papa	Resistencia a PLRV, PVX, PVY, Marcador visual, Resistencia a coleopteros y lepidopteros, Niveles de tirosina aumentados, Resistencia a Corynebacterium, Verticilium, Rhizoctonia, Erwinia, Tolerante al frío, Niveles aumentados de carbohidratos, Tolerante a Bromoxynil, 2,4-D, Aumento del numero de semillas, Aumento de niveles de proteínas PR, Metabolismo del almidón alterado, Resistencia a estrés abiotico, metabolismo de auxinas.
Canola	Resistencia a lepidopteros, Aceite alterado, Machoesterilidad, Tolerante a glifosato, Producción de enzimas industriales, Niveles aumentados de lisina, Resistencia a hongos post cosecha, Tolerante a phosphinothricina, Metabolismo de acidos grasos alterado, Machoesterilidad reversible, Producción de polimeros, Tolerante a sulfonilurea, Producción de proteínas farmaceuticas.
Arroz	Tolerante a phosphinothricina, kaanmicina. Resistencia a lepidopteros, Cambios en la composición de la semilla, Tolerante a imidazolinone
Soya	Tolerante a glifosato, phosphinothricina, Proteína de almacenamiento alterada, Marcador visual, Metionina de semilla.
Calabaza	Resistencia a CMV, PRSV, cucumovirus, potyvirus, ZYMV, PRV, mildiu.
Frutilla	Alteración en la maduración, Resistencia a Botrytis, Colletotrichum, Sclerotinia, Tolerante a 2,4-D, Modificación del sabor.
Caña de azucar	Tolerante a phosphinothricina, Resistencia a SrMV
Girasol	Proteína de almacenamiento alterada, Marcador visual, Resistencia a Sclerotinia, coleopteros, CMV, TMV
Boniato	Tolerante a phosphinothricina
Tabaco	Tolerante a bromoxynil, glifosato, sulfonilurea, imidazolinone, clorsulfurón, Resistencia a AMV, TEV, PVY, TVMV, BCTV, Resistencia a lepidopteros, enfermedades fúngicas en general, Resistencia a Rhizoctonia, Phytophthora, Botrytis Secuestro de metales pesados, Maduración del fruto, Resistencia a kanamicina, Aumento de esteroides, Resistencia a nematodos, Producción de proteínas farmaceuticas, Metabolismo de los carotenoides alterado.
Tomate	Tolerante a glifosato, bromoxynil, sulfonilurea, phosphinothricina, Resistencia a TMV, CMV, TSWV, geminivirus, tobamovirus, alteración de maduración del fruto, Resistencia al frio, Resistencia a Phytophthora, Rhizoctonia, Alternaria, Botrytis, Aumento de solidos solubles.
Sandía	Resistencia a WMV2, ZYMV, CMV, PRSV

Trigo	Tolerante a glifosato, phosphinothricina, Color alterado, Tolerante a kanamicina, Proteína de almacenamiento alterada, Resistencia a WSMV, BYDV, enfermedades en general, Aumento de metionina en semilla, Metabolismo de carbohidratos alterados, Resistencia a Fusarium y enfermedades fúngicas en general.
Pimiento	Beta endoglucanasa, Maduración del fruto alterada, Resistencia a CMV, TEV