

## Tesis de Posgrado

# Obtención y caracterización de plantas de papa transgénicas para genes de interés agropecuario

Del Vas, Mariana

1993

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Del Vas, Mariana. (1993). Obtención y caracterización de plantas de papa transgénicas para genes de interés agropecuario. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2567\\_DelVas.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2567_DelVas.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Del Vas, Mariana. "Obtención y caracterización de plantas de papa transgénicas para genes de interés agropecuario". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1993. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2567\\_DelVas.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2567_DelVas.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Obtención y caracterización de plantas de  
papa transgénicas para genes de interés  
agropecuario

Trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias :  
Biológicas

Mariana del Vas

Director: Dr. Horacio Esteban Hopp

Lugar de trabajo: Instituto de Biología Molecular. CICV  
INTA-Castelar

1993

Tesis  
2507  
252

## **Agradecimientos:**

Al Dr. Esteban Hopp quien me enseñó y apoyó durante toda esta etapa de mi formación.

Al Dr. Eduardo Palma, quien dirige el Instituto en donde se llevó a cabo esta tesis, por su entusiasmo, optimismo y apoyo.

A Ruth Heinz, con quien empecé a trabajar en investigación cuando yo era una estudiante que pensaba que todo iba a ser como en los libros; por su paciencia, buen carácter y todo lo que me enseñó.

A Fernanda Ceriani.

A Norberto Iusem, Lela Carrillo, Angel Cataldi y Osvaldo Rosetti; todos ellos investigadores de INTA que me ayudaron mucho.

A mis compañeros de trabajo Fernanda Ceriani, Paula Cramer, Alejandro Tozzini, Sergio Feingold, Laura Moratinos, Dalia Lewi, Susana Marcuchi, Daniela Tosto, Magdalena Rossi, Diego Lijavetzky, Cecilia Vazquez Rovere, Alejandro Escandón, Verónica Saladrigas, Silvio Cravero, Silvia Rossi, Laura Boschioli, Oscar Taboga, Dino Feigelstock, Paula Cohen, Erica Silberstein, Cecilia Tami, Elizabeth Rieder por todo lo que compartí con ellos.

A Fernando Bravo Almonacid y Eduardo Zabaleta, quienes me dieron infinidad de consejos laborales y de los otros.

Al Dr. Eduardo Botto y a la Ing. Agr. Silvina Ceriani, del Instituto de Microbiología Agrícola, Laboratorio de Lucha Biológica. CICA INTA-Castelar, por su excelente trabajo.

A los Ingenieros I. Butzonich y M. Colavitta de la Estación Experimental Agropecuaria INTA-Balcarce, por su excelente trabajo.

Al Dr. Ricardo Miledi por haberme brindado todo lo que necesité para escribir este trabajo de Tesis en su laboratorio del Departamento de Psicobiología de la Universidad de California, Irvine.

A la Srta. Nilda López por su excelente trabajo técnico en la preparación de medios de micropropagación.

Al personal del Instituto de Biología Molecular, INTA-Castelar.

Al CONICET que me otorgó un beca doctoral para la realización de este trabajo.

A mis amigos Guille Gonzalez Burgos, Bea Kanterewicz, Pablo Schwarzbaum, Diego Golombek, Marcelo Rubinstein, Pocho Marengo, Pablo Rabinowicz, Fabi Scornik, Ale Schinder, Ari Escobar, Lidia Szczupak, Gabriela Amodeo, Fernanda Ceriani, Paula Cramer, Negro Lorenzo, Debi Levit, Fabiana Kubke, Rudy Bernabeu, Raca Aloyz, Dani Carpi, Beto Civetta, Eduardo Zabaleta.

A Daniel Calvo.

# Abreviaturas

## **Abreviaturas:**

AIMV: virus del mosaico de la alfalfa.

BYDV: virus del enanismo amarillo de la cebada.

BWYV: virus del amarillamiento de la remolacha.

CMV: virus del mosaico del pepino.

EDTA: ácido etilendiamino tetracético.

GUS: enzima  $\beta$ -glucuronidasa.

kDa: kilodalton.

Km: sulfato de kanamicina.

kpb: kilopares de bases.

LB: medio de Luria- Delbruck.

MOPS: ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico.

NC: no codificante.

nt: nucleótido.

ORF: marco abierto de lectura.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

pb: pares de bases.

PLRV: virus del enrollamiento de la hoja de papa.

SDS: dodecil sulfato de sodio.

TEV: virus del grabado ("etch") del tabaco.

TMV: virus del mosaico del tabaco.

TRIS: hidroximetilaminometano.

X-Glu: ácido 5-bromo-4-cloro- $\beta$ D-Glucurónico.

# Indice

## INTRODUCCION:

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A) EL CULTIVO DE PAPA:                                                                                                                        | 1  |
| B) TRANSFORMACION DE PLANTAS POR <i>AGROBACTERIUM</i><br><i>TUMEFACIENS</i> :                                                                 | 3  |
| B 1) El plásmido Ti:                                                                                                                          | 3  |
| B 2) Colonización genética:                                                                                                                   | 5  |
| B 3) Mecanismos moleculares de la transferencia del T-DNA:                                                                                    | 6  |
| B 3. 1) Genes de virulencia:                                                                                                                  | 6  |
| B 3. 2) Regulación de los genes de virulencia:                                                                                                | 6  |
| B 3. 3) Procesamiento del T-DNA y transferencia:                                                                                              | 8  |
| B 4) Transformación por <i>Agrobacterium</i> :                                                                                                | 10 |
| B 4. 1) Generalidades:                                                                                                                        | 10 |
| B 4. 2) Vectores intermediarios utilizados en la transformación de plantas mediada por <i>Agrobacterium</i> :                                 | 11 |
| B 4. 3) Cocultivo:                                                                                                                            | 14 |
| B 4. 4) Regeneración de las células transformadas:                                                                                            | 15 |
| B 4. 5) Cálculo de la eficiencia de transformación:                                                                                           | 15 |
| B 5) Transformación genética de papa:                                                                                                         | 16 |
| C) OBTENCION DE PLANTAS RESISTENTES A VIRUS:                                                                                                  | 17 |
| C 1) Luteovirus y el Virus del Enrollamiento de la hoja de la papa:                                                                           | 17 |
| C 1. 1) Sintomatología:                                                                                                                       | 18 |
| C 1. 2) Organización genómica:                                                                                                                | 19 |
| C 1. 3) Estrategias de expresión génicas:                                                                                                     | 21 |
| C 2) Resistencia natural a virus:                                                                                                             | 23 |
| C 2. 1) Resistencia de la planta no-huésped:                                                                                                  | 24 |
| C 2. 2) Resistencia adquirida:                                                                                                                | 24 |
| C 2. 3) Resistencia genética de un cultivar:                                                                                                  | 24 |
| C 3) Genética de la resistencia de plantas a virus:                                                                                           | 25 |
| C 4) Protección cruzada clásica:                                                                                                              | 26 |
| C 5) Mejoramiento genético para obtener resistencia a PLRV:                                                                                   | 28 |
| C 6) Obtención de plantas transgénicas resistentes a virus:                                                                                   | 29 |
| C 6. 1) Expresión de la proteína de cápside:                                                                                                  | 30 |
| C 6.2) Expresión de RNA antisentido de cápside:                                                                                               | 34 |
| C 6. 3) Expresión de satélites:                                                                                                               | 34 |
| C 6. 4) Expresión de la replicasa viral:                                                                                                      | 35 |
| C 6. 5) Expresión de la nucleocápside:                                                                                                        | 37 |
| C 7) Objetivo:                                                                                                                                | 38 |
| D) OBTENCIÓN DE PLANTAS DE PAPA RESISTENTES A INSECTOS POR<br>EXPRESIÓN DE LA DELTA-ENTOMOTOXINA DE <i>BACILLUS</i><br><i>THURINGIENSIS</i> : | 39 |
| D 1) Introducción:                                                                                                                            | 39 |
| D 2) La toxina de BT como insecticida biológico:                                                                                              | 40 |



|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| D 3) Plantas insecticidas.....                                  | 40 |
| D 4) Insectos minadores.....                                    | 44 |
| D 5) Objetivo: .....                                            | 45 |
| <b>E) OBTENCIÓN DE PLANTAS DE PAPA RESISTENTES A HERBICIDAS</b> |    |
| POR EXPRESIÓN DEL GEN <i>BAR</i> : .....                        | 46 |
| E 1) Introducción:.....                                         | 46 |
| E 2) Objetivo:.....                                             | 47 |

## MATERIALES Y METODOS:

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1) Reactivos: .....                                                                                                                                         | 48 |
| 2) Genotipos vegetales empleados:.....                                                                                                                      | 48 |
| 3) Transformación de papa:.....                                                                                                                             | 48 |
| 3. 1) Condiciones de crecimiento de las plantas micropropagadas:.....                                                                                       | 48 |
| 3. 2) Transformación de discos de hojas de papa por <i>Agrobacterium</i> : .....                                                                            | 51 |
| 3.3) Regeneración de plantas de papa a partir de tubérculo : .....                                                                                          | 51 |
| 3.4) Cepas de <i>Agrobacterium</i> utilizadas : .....                                                                                                       | 52 |
| 4) Chequeo de las plantas transformadas: .....                                                                                                              | 54 |
| 4.1) Medición de actividad de neomicina fosfotransferasa (NPT II):.....                                                                                     | 54 |
| 4.2) Determinación de la actividad hglucuronidasa (GUS):.....                                                                                               | 55 |
| 4.3) Extracción de DNA: .....                                                                                                                               | 56 |
| 4.4) Restricción de DNA: .....                                                                                                                              | 57 |
| 4.5) Southern blot:.....                                                                                                                                    | 57 |
| 4.6) Extracción de RNA: .....                                                                                                                               | 57 |
| 4.7) Northern blot:.....                                                                                                                                    | 58 |
| 4.8) Amplificación de una región de la toxina de <i>Bacillus thuringiensis</i><br>por PCR para usar como sonda: .....                                       | 59 |
| 4.9) Sondas utilizadas en Northern y Southern:.....                                                                                                         | 59 |
| 4. 10) Hibridación y lavados de Southern y Northern: .....                                                                                                  | 60 |
| 5) Clonado del gen de la cápside del PLRV:.....                                                                                                             | 60 |
| 5.1) Amplificación y clonado del gen de cápside de PLRV:.....                                                                                               | 60 |
| 5.2) Transferencia de colonias a nitrocelulosa:.....                                                                                                        | 63 |
| 5.3) Marcado de DNA e hibridación .....                                                                                                                     | 63 |
| 6) Secuenciación de DNA de doble cadena: .....                                                                                                              | 64 |
| 7) Construcción del plásmido pBicpPLRV y su introducción en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> : .....                                                        | 65 |
| 7.1) Construcción de pBicpPLRV: .....                                                                                                                       | 65 |
| 7.2) Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> : .....                                                                                             | 65 |
| 8 ) Inmunodetección de la proteína expresada por las plantas transgénicas para la<br>porción tóxica de la proteína de <i>Bacillus thuringiensis</i> . ..... | 66 |
| 9) Actividad biológica de las plantas transgénicas para el gen de cápside frente al<br>desafío con áfidos infectados con PLRV. ....                         | 67 |
| 10) Ensayo de sensibilidad de larvas de polilla del tomate a la toxina expresada<br>por Alfa 1 y Alfa 2:.....                                               | 67 |

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 10) Ensayo de resistencia de plantas transgénicas en maceta a fosfinotricina:..... | 68 |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|

## RESULTADOS:

### A: OBTENCION Y EVALUACION DE PLANTAS DE PAPA

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TRANSGENICAS: .....                                                                         | 69 |
| A 1) Puesta a punto de la transformación de <i>Solanum tuberosum</i> cv. Huinkul-MAG: ..... | 69 |
| A 2) Puesta a punto de la determinación de actividad neomicina fosfotransferasa:.....       | 75 |
| A 3) Puesta a punto de la técnica de Northern blot para detectar RNAs mensajeros:.....      | 77 |

### B: OBTENCION DE PLANTAS DE PAPA TRANSGENICAS EXPRESANDO EL GEN DE CAPSIDE DE PLRV: .....

|                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| B 1) Clonado y secuenciación del gen de cápside de PLRV:.....                                                                      | 81 |
| B 1.1) Estrategia general:.....                                                                                                    | 81 |
| B 1. 2) Amplificación y clonado del gen de cápside: .....                                                                          | 82 |
| B 1. 3) Secuenciación del gen de la cápside de PLRV:.....                                                                          | 84 |
| B 2) Construcción de un vector adecuado para la expresión del gen de cápside de PLRV en plantas transgénicas.....                  | 89 |
| B 2. 1) Estrategia general: .....                                                                                                  | 89 |
| B 2. 2) Construcción del plásmido pB1cpPLRV: .....                                                                                 | 90 |
| B 2. 3) Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LB4404 con pB1cpPLRV:.....                                              | 92 |
| B 2. 4) Chequeo de pB1cpPLRV por restricción e hibridación:.....                                                                   | 92 |
| B 3) Obtención de plantas de papa transgénicas para el gen de cápside de PLRV. ....                                                | 94 |
| B 3. 1) Transformación de hojas de Huinkul-MAG con pB1cpPLRV: .....                                                                | 94 |
| B 3. 2) Chequeo de las plantas de papa transgénicas para el gen de cápside de PLRV: .....                                          | 95 |
| B 4) Actividad biológica de las plantas transgénicas para el gen de cápside frente al desafío con áfidos infectados con PLRV:..... | 97 |

### C: OBTENCION DE PLANTAS DE PAPA TRANSGENICAS RESISTENTES A INSECTOS POR EXPRESION DE LA DELTAENDOTOXINA DE

|                                                                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> :.....                                                                                            | 105 |
| C 1) Obtención de plantas transgénicas para el gen <i>bt 884</i> :.....                                                         | 105 |
| C 2) Evaluación de las plantas transgénicas: .....                                                                              | 105 |
| C 2.1) Ensayo de actividad del producto del gen marcador (NPT II) en las plantas transgénicas para el gen <i>bt 884</i> : ..... | 106 |
| C 2.2) Detección del transgén de la entomotoxina y de su transcripto por Northern y Southern: .....                             | 106 |
| C 2.2.1) Amplificación de la porción tóxica del gen <i>bt 2</i> por PCR: .....                                                  | 107 |

|                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| C 2.2.2) Detección del gen <i>ht 884</i> en el genoma de las plantas transgénicas mediante Southern: .....                                         | 107 |
| C 2.2.3) Northern: Detección del mRNA correspondiente al gen <i>ht 884</i> en Alfa 1 y Alfa 2: .....                                               | 108 |
| C 2.2.4) Inmunodot: Detección de la entomotoxina de BT en Alfa 1 y Alfa 2.....                                                                     | 109 |
| C 3) Bioensayo de las plantas transgénicas: Sensibilidad de larvas de polilla del tomate a la ingesta de hojas de las plantas transformadas: ..... | 110 |
| <b>D: OBTENCION DE PLANTAS DE PAPA TRANSGENICAS RESISTENTES</b>                                                                                    |     |
| A HERBICIDAS TOTALES: .....                                                                                                                        | 114 |
| D 1) Obtención de plantas de papa transgénicas para el gen <i>bar</i> : .....                                                                      | 114 |
| D 2) Chequeo in vitro de la resistencia a fosfinotricina: .....                                                                                    | 114 |
| D3) Chequeo in vivo de la resistencia a fosfinotricina: .....                                                                                      | 119 |
| <b>DISCUSION:</b>                                                                                                                                  |     |
| A) Transformación de papa: .....                                                                                                                   | 122 |
| B) Resistencia a PLRV por expresión de proteína o antígeno de cápside:.....                                                                        | 124 |
| B 1) Propuestas para el mecanismo de protección a PLRV: .....                                                                                      | 128 |
| C) Resistencia a insectos por expresión de la delta-entomotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> : .....                                          | 129 |
| D) Plantas resistentes a fosfinotricina por expresión del gen <i>bar</i> : .....                                                                   | 131 |
| CONCLUSIONES.....                                                                                                                                  | 132 |
| BIBLIOGRAFIA.....                                                                                                                                  | 133 |
| RESUMEN.....                                                                                                                                       | 153 |

# Introducción

## **A) EL CULTIVO DE PAPA:**

La papa es el cuarto cultivo en orden de importancia mundial luego del trigo, el maíz y el arroz (Ross 1986). Es un cultivo originado en Sudamérica donde se cultiva desde 200 años antes de Cristo (Scott, 1976). El consumo en la Argentina alcanza los 75 kg *per capita* por año. Se cultivan aproximadamente 100.000 ha (en algunos lugares hasta dos veces al año) no solamente en el sur de la Provincia de Buenos Aires, sino también en Mendoza, Córdoba y Santa Fé para satisfacer esta demanda interna. Algunas regiones (Malargüe, Catamarca, Tafi del Valle) se han especializado no en la producción de papa para consumo, sino en la multiplicación de papa para semilla aprovechando condiciones ecológicas específicas. Las variedades de papa más cultivadas en la Argentina son: Spunta (de origen holandés), Huinkul-MAG (argentina, material utilizado para este proyecto), Kennebec (canadiense) y Ballenera, en el orden mencionado.

El cultivo resulta seriamente afectado por patógenos, insectos y malezas que aumentan los costos de producción, reducen el rendimiento y la calidad y obligan al uso de agroquímicos que contaminan el ambiente y afectan al ecosistema.

Entre las enfermedades económicamente más importantes se encuentran las virosis.

Debido a que los perjuicios ocasionados por las enfermedades virales en papa se producen en la infección secundaria y los síntomas en la infección primaria son suaves y por lo tanto difíciles de detectar, estas enfermedades están ampliamente distribuidas en las zonas donde se cultiva papa.

Las infecciones virales producen pérdidas económicas significativas de dos formas:

- a) directas, a través de una disminución del rendimiento
- b) indirectas, a través de un incremento en los costos de producción de papa-semilla libre de virus y limitaciones en la exportación de material enfermo.

Estas últimas se deben a que las papas se multiplican clonalmente sembrando tubérculos o trozos de tubérculos. Este método de propagación favorece la transmisión y diseminación de los patógenos almacenados. Actualmente el control es muy costoso pues se basa fundamentalmente en la siembra de material sano (fiscalizado y certificado) y en prevenir la introducción de virus de fuentes externas (Johansen y col. 1984). La producción y distribución de material vegetal libre de virus forma, por lo tanto, la base de las medidas de control. El costo de producción que agrega este método de control puede estimarse si se tiene en cuenta que la producción y multiplicación de papa-semilla de sanidad controlada es una actividad específica que por sí sola alcanza valores de u\$s 25 millones por año en la Argentina.

Una solución para disminuir los costos de este control es la utilización de variedades resistentes. El mejoramiento por incorporación de genes de resistencia ha sido intentado para la mayoría de los virus de importancia económica. Sin embargo, la obtención de nuevos cultivares se ve dificultada por la complicada genética de la papa (es un tetraploide), la dificultad de algunos cruzamientos interespecíficos con las especies que poseen los genes de resistencia y el tiempo que llevan los retrocruzamientos. La adopción de las nuevas variedades mejoradas, por otra parte, no es fácil debido a que los genes de resistencia suelen estar ligados a otros que confieren características indeseables y, fundamentalmente, que tanto el productor como los procesos industriales son muy conservativos y se apegan mucho a ciertos cultivares tradicionales (que son en realidad híbridos que combinan características deseables en forma epistática, de modo tal que se pierden en los cruzamientos y resulta muy difícil reconstruir nuevamente el híbrido original).

Las técnicas de ingeniería genética como la transferencia de DNA mediada por *Agrobacterium tumefaciens* demostraron ser de gran utilidad para introducir genes de interés sin alterar el fondo genético de los cultivares preferidos por el agricultor.

## **B) TRANSFORMACION DE PLANTAS POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*:**

### **B 1) El plásmido Ti:**

Más de 80 años atrás, Smith y Townsend (1907) publicaron un artículo en donde presentaron evidencias de que la bacteria hoy llamada *Agrobacterium tumefaciens* es el agente causal de la agalla de corona, enfermedad neoplásica, ampliamente distribuida.

A partir de allí, un gran número de científicos focalizaron su atención en este microorganismo y estudiaron los mecanismos moleculares del proceso de inducción de la agalla de corona.

Un avance clave se produjo hace unos 18 años, cuando se descubrió que las cepas virulentas de *A. tumefaciens* poseían un megaplásmido que contenía genes involucrados en la inducción de la agalla (Zaenen y col. 1974). Debido a su rol en la inducción de tumores en plantas, este plásmido fue llamado Ti (inductor de tumores).

Las células de las agallas de corona son tumorales, es decir que son capaces de proliferar autónomamente en la ausencia de las fitohormonas (auxinas y citoquininas) requeridas para el crecimiento de las células de plantas normales. Otra característica de estas células es que producen y excretan derivados de azúcares y aminoácidos que no son sintetizados por las células normales (Tempé y col. 1982). Estos compuestos específicos de tumor son llamados opinas. Uno de los primeros compuestos caracterizados fue la octopina, un producto formado por la condensación de arginina con ácido pirúvico. El tipo de opina formado por las células de las agallas de corona dependen de la cepa infecciosa de *Agrobacterium*. Así, las distintas cepas pueden ser clasificadas, según el tipo de opinas que produzcan los tumores causados por ellas, como cepas del tipo octopina, nopalina, succinamopina o leucinopina.

El hecho de que las células de la agalla de corona difieran de las normales en estas dos características, motivó la búsqueda de DNA de *Agrobacterias* en las células de la agalla. Usando el método de Southern, se encontró que las cepas con plásmidos del tipo de octopina, eran excepcionales ya que dos segmentos del plásmido Ti se transferían a las células de manera independiente. Uno de estos pedazos, el T<sub>L</sub> DNA resultó ser oncogénico para la célula. El otro segmento, el T<sub>R</sub> no tenía propiedades oncogénicas. T<sub>R</sub> estaba invariablemente presente en las células de la agalla de corona producidas por plásmidos del tipo octopina. En todos los casos el T-DNA se hallaba en el genoma nuclear de las células, y nunca ausente o en organelas. Se encontró que el T-DNA corresponde a un segmento preciso del plásmido Ti, y que no ocurren permutaciones en su integración en el genoma de la planta. La secuenciación de las regiones T de distintos plásmidos Ti demostró que estas regiones están bordeadas por una repetición directa de 24 pb. Como ninguna línea tumoral contenía secuencias originalmente por afuera de estas

repeticiones directas, fue lógico asumir que estas regiones repetidas funcionaban como señales de reconocimiento para el aparato de transferencia.

El T-DNA contiene una serie de genes que se expresan en las células transformadas. Estos genes son reconocidos por factores de transcripción de la planta. Mediante análisis de secuencia se demostró que, efectivamente, estos genes bacterianos tienen señales de expresión eucariotas, como por ejemplo secuencias consenso del tipo TATA "box" para la iniciación de la transcripción y AATAAA involucradas con la terminación de la traducción y la poliadenilación. Además de estas secuencias comunes los genes codificados en el T-DNA tienen secuencias regulatorias específicas que difieren de gen en gen y que hacen que su nivel de expresión sea controlable por compuestos específicos de tejidos o señales específicas como las fitohormonas. A pesar de esto, la expresión está también influida por las secuencias cromosómicas vecinas. Este efecto de posición puede incluso producir un silenciamiento completo de los genes. Las bases moleculares de este fenómeno son desconocidas pero se cree tienen que ver con la estructura de la cromatina en el sitio de inserción. Han habido intentos para corregir los efectos de posición en plantas. Se han aislado regiones cromosómicas de anclaje al esqueleto nuclear ("nuclear scaffold attachment regions") de plantas (Hall y col. 1991) y recientemente se demostró que el DNA que contiene estas regiones puede corregir los efectos de posición de genes reporteros en plantas transgénicas (Breyne y col. 1992).

La expresión de los genes del T-DNA está, además, influida por la metilación del DNA, dado que el tratamiento de líneas en donde estos genes no se expresan con agentes demetilantes como la 5-azacitidina pueden recuperar la expresión génica (van Slooten y col. 1984).

La integración del T-DNA ocurre al azar en el genoma, por recombinación ilegítima en zonas cortas de homología y es acompañada por lesiones pequeñas (de entre 29 y 73 pb) en el sitio de inserción. Las regiones transcripcionalmente activas son "preferidas" debido a que son más accesibles a la invasión por DNA exógeno debido a la desorganización de los nucleosomas y otras estructuras de la cromatina (Zambriski, 1992).

En el T-DNA hay genes involucrados con la síntesis de opinas y con el crecimiento en ausencia de fitohormonas. Por mutagénesis en plásmidos de octopina se vio que en la región  $T_R$  había genes responsables de la producción de agropina y mannopina mientras que un gen de la región  $T_L$  era necesario para la formación de octopina.

Mutaciones en 3 loci de la región  $T_L$  dieron lugar a cambios en la oncogenicidad. Dos de estos genes fueron llamados genes *aux* y el tercero *cyt*. Los mutantes *aux* inducen tumores "tallosos". Más tarde se los llamó *tms* (por "tumor morphology shoot") o *shi* (por "shoot inhibition"). La expresión de los genes *aux* en *E. coli* reveló que juntos mediaban una vía de síntesis de la auxina ácido indolacético (AIA). La proteína codificada por el gen *aux1* es una mono-oxigenasa capaz de convertir triptófano en indolacetamida (IAM), por lo que ahora se llama *iaaM* a este gen



(Thomashow y col. 1986). La enzima codificada por el gen *aux2* tiene actividad hidrolasa y es capaz de convertir IAM en AIA. Ahora se lo llama gen *iaaH* (Schröder y col. 1984). Esta vía de síntesis de AIA no ocurre normalmente en plantas.

El mutante *cyt* formaba tumores "raizosos". Más tarde se lo llamó gen *tmr* (por "tumor morphology root") o *roi* (por "root inhibition"). La expresión del gen *cyt* en *E. coli* demostró que la proteína codificada por este gen era la isopentenil-transferasa, (Barry y col. 1984), enzima capaz de catalizar la formación de citoquinina isopentenil-AMP a partir de isopentenil-pirofosfato y AMP. Es por eso que al gen *cyt* se lo llama actualmente *ipt*.

La sobreproducción de una auxina y de una citoquinina es la responsable de la proliferación de las células de la agalla de corona.

Además de los genes mencionados, la región T<sub>L</sub> de los plásmidos de octopina contiene algunos genes de función desconocida. La inactivación de estos genes no afecta la oncogenicidad de la bacteria.

Uno de estos genes, el *δ<sup>h</sup>* tiene un efecto oncogénico solo en ciertas especies, aun en el caso en que no estén presentes otros genes del T-DNA. Otro de estos genes, el 5 codifica para una enzima capaz de formar ácido indol-láctico, que es un inhibidor de la respuesta a auxinas y por lo tanto un modulador de los efectos de un exceso de auxina (Hooykaas y col. 1992).

Las regiones T de los plásmidos Ti de succinamopina, nopalina y leucinopina llevan genes *ipt*, *iaaH* e *iaaM* relacionados con aquellas de los plásmidos tipo octopina.

## **B 2) Colonización genética:**

El proceso de inducción de la agallas de corona consiste en un número de pasos discretos y definidos:

Tanto para permitir la entrada de las bacterias como para que se induzca el sistema de virulencia de las mismas, es necesaria la herida de la planta (Braun y col. 1947) (ver sección C 3. 2). Las bacterias multiplican en la savia y se pegan a las paredes de las células en la herida (Lippincott y col. 1969). A continuación el T-DNA es transferido y expresado en las células de la planta aun antes de la integración (Janssen y col. 1989), luego de la cual, los niveles de expresión del T-DNA son mantenidos a un nivel estable dependiendo del lugar de inserción. Debido a las continuas divisiones desencadenadas por los altos niveles de auxinas y citoquininas aparecen los típicos tumores (agallas de corona) que consisten en una mezcla de células transformadas (conteniendo T-DNA) y normales (van Slogteren y col. 1983).

Los genes del catabolismo de opinas están localizados en el plásmido Ti. Las opinas actúan induciendo los genes que las catabolizan y activando el sistema de transferencia conjugativa del

plásmido Ti (Klapwijk y col. 1978; Tempé y col. 1982). Como consecuencia, este plásmido está ampliamente distribuido en la naturaleza.

Como las Agrobacterias inducen a las células de la planta a producir compuestos que únicamente ellas son capaces de catabolizar y lo hacen por medio de ingeniería genética, este proceso ha sido llamado colonización genética.

### **B 3) Mecanismos moleculares de la transferencia del T-DNA:**

#### **B 3. 1) Genes de virulencia:**

Por medio de análisis genéticos se demostró que además de los genes *onc* (*ipt*, *iaaM* e *iaaH*) presentes en el T-DNA hay una gran cantidad de genes involucrados en la tumogenicidad que están ubicados en el cromosoma de *Agrobacterium sp.* (genes *chv*) o en un segmento de 40 Kb llamada región de virulencia (genes *vir*) del plásmido Ti. Por introducción del T-DNA en células de plantas por transferencia directa, se encontró que el T-DNA por sí mismo es suficiente para provocar la transformación de células normales a células tumorales (Krens y col. 1985). Esta fue la primer evidencia que los genes *chv* y *vir* no cumplían un rol esencial en la oncogenicidad sino que determinaban el aparato necesario para la transferencia *in vivo* del T-DNA de *Agrobacterium* a la célula de la planta.

ChvA y ChvB son necesarios para que las Agrobacterias se peguen a las células de la pared de la planta. El gen *chvB* codifica para una proteína de 235 kDa involucrada con la formación de  $\beta$ -1,2 glucano cíclico mientras que hay evidencias de que *chvA* determina una proteína de transporte del  $\beta$ -1,2 glucano al periplasma. Mutaciones en otro gen, el *pscA* o *exoC* también dan lugar a bacterias que no producen beta-1,2 glucano. Esto podría indicar un rol del beta-1,2 glucano en la fijación de la bacteria a la pared celular. Sin embargo la adición de  $\beta$ -1,2 glucano a estos mutantes no restaura la formación de tumores. Recientemente se demostró que los mutantes *chv* carecen de la proteína rhamnosina que podría estar involucrada con la fijación a la pared celular, dado que la adición de esta proteína a estos mutantes restaura parcialmente la habilidad de inducir tumores (Hooykaas y col. 1992).

La región *vir* de los plásmidos de octopina contiene 24 genes distribuidos en 8 operones llamados *vir A* - *vir H* que están corregulados, y por lo tanto forman un regulón. Se ha establecido la secuencia completa de la región *vir* de los plásmidos de nopalina y de octopina (Hooykaas y col. 1992).

#### **B 3. 2) Regulación de los genes de virulencia:**

Con la excepción de los genes *vir A* y *vir G* los operones *vir* no son transcritos durante el crecimiento vegetativo normal (Stachel y col. 1986a). Una de las etapas más tempranas en el proceso de inducción de tumores, consiste en la activación coordinada del sistema de virulencia cuando una bacteria esta cerca de tejidos vegetales heridos y sensa los factores exudados por las células. Los genes *chv* se expresan constitutivamente. Los genes *vir*, en cambio, permanecen silenciosos hasta que son inducidos por ciertos factores de la planta identificados por Stachel como compuestos fenólicos llamados acetosiringona y alfa-hidroacetosiringona (Stachel y col. 1985). Estos compuestos se liberan del tejido de la planta herido. Otros compuestos fenólicos liberados son precursores de la síntesis de lignina como el ácido y el alcohol sinapínico (Melchers y col. 1989; Song y col. 1991a). Se vió que flavonoides conocidos como inductores *nod* en *Rhizobium* pueden actuar también como inductores *vir* (Zerback y col. 1989).

Distintos fenoles substituidos son responsables de la inducción de los genes *vir* en diferentes especies o tejidos dentro de un misma especie. Por ej. la  $\alpha$ -acetociringona es el inductor más importante producido por Solanáceas como tabaco, tomate y papa. En otras especies los ácidos benzoico o cinámico son los inductores de estos mismos genes (Song y col. 1991a; Spencer y col. 1991). Las células de trigo en suspensión liberan etilferulato como inductor (Messens y col. 1990). Algunas otras plantas producen compuestos inhibidores de la inducción *vir* (Sahi y col. 1990). La inducción del sistema *vir* puede ser cuantificada utilizando cepas indicadoras que llevan un promotor de un gen *vir* ligado a un gen indicador como el *lac Z* (codifica para la  $\beta$  galactosidasa) de *E. coli*. La actividad de esta enzima es fácilmente medible utilizando substratos como el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -d-galactopiranosido (X-gal) que libera un compuesto coloreado luego de la acción de esta enzima. Usando esta estrategia, se vió que para obtener una optima inducción de los genes *vir*, se deben cumplir ciertas condiciones:

- a) El pH del medio debe ser entre 5 y 6.
- b) La temperatura debe ser entre 20 y 30 °C.
- c) Se debe evitar la presencia de extracto de levadura en el medio.
- d) Debe haber un alto contenidos de azúcar en el medio. Este requisito es especialmente importante cuando escasean los compuestos fenólicos antes mencionados. El inositol (Song y col. 1991b) y azúcares no catabolizables como la d-glucosa y la 6-deoxi-d-glucosa tienen efectos estimulatorios sobre la inducción de estos genes (Shimoda y col. 1990).

El nivel máximo de estimulación del sistema *vir*, también varía para las diferentes cepas de *Agrobacterium*.

En presencia de compuestos fenólicos, dos proteínas codificadas en la región de virulencia, Vir A y Vir G, median la activación de todos los demás genes *vir*. Por análisis de secuencias se vió que los genes *virA* y *virG* tenían homología con sistemas regulatorios de dos componentes como por ej. *envZ-ompR*, *ntrB-ntrC*, *dctB-dctD* (Nixon y col. 1986). En este sistema de dos

componentes la proteína tipo Vir A sensa señales específicas (en el caso de Vir A compuestos fenólicos), y Vir G es una proteína capaz de unirse a DNA.

Estudios realizados en otros sistemas similares, mostraron que la proteína sensora puede fosforilarse y, luego ser capaz de fosforilar a la proteína acompañante. La proteína Vir A está presente en la membrana interna de la bacteria; por lo tanto está en la ubicación teóricamente apropiada para sensar los compuestos fenólicos directamente. Se analizó la topología de Vir A en más detalle haciendo fusiones con la proteína PhoA (fosfatasa alcalina) de *E. coli*. Esta enzima se activa luego de atravesar la membrana interna de la bacteria. Como se obtuvo actividad de fosfatasa alcalina fusionando PhoA con la zona predicha como dominio periplásmico de VirA, estos experimentos sustentaron un modelo por el cual la proteína Vir A tiene un extremo amino terminal citoplasmático, una región alfa hélice transmembrana hidrofóbica, un dominio periplásmico, un segundo dominio hidrofóbico de  $\alpha$ -hélice transmembrana y un largo dominio C-terminal citoplasmático. Inesperadamente se encontró que el receptor para acetosiringonas no estaba en el dominio periplásmico sino en el segundo dominio transmembrana de Vir A. Como las acetosiringonas son compuestos lipofílicos, podrían atravesar fácilmente la membrana interna de la bacteria. Dentro de este dominio transmembrana se encontraron zonas ricas en cisteína y serina que están presentes en receptores de mamíferos que también se unen a compuestos fenólicos (Fraser 1989). Con respecto al dominio C-terminal citoplasmático, se encontraron aquí homologías con varias proteínas sensoras. Este dominio puede actuar como autoquinasa, fosforilándose a sí mismo en un residuo histidina conservado. La proteína fosforilada es capaz de transferir su fosfato a un residuo aspartato conservado en la proteína Vir G *in vitro* (Jin y col. 1990). Es probable que esta fosforilación de Vir G estimule su unión a los promotores de los genes *vir* en el núcleo, como dímero o multímero (Pazour y col. 1990). La proteína Vir G tiene un bolsillo ácido donde ocurre la fosforilación, similarmente a lo que ocurre en la proteína Che Y de *E. coli*. El extremo C-terminal es capaz de unirse al DNA. (Hooykaas y col. 1992).

### B 3. 3) Procesamiento del T-DNA y transferencia:

Luego de la inducción del sistema *vir*, se pueden detectar en *Agrobacterium* moléculas de simple cadena llamadas hebras T que representan la hebra de abajo de la región T del plásmido Ti (Stachel y col. 1986b). Con menor frecuencia se encuentran hebras T de doble cadena (Steck y col. 1989). La formación de ambos tipos de moléculas depende de la actividad de dos proteínas VirD1 y VirD2 que están codificadas por el operón *virD* de la región *vir* (Yanofsky y col. 1986). Estas proteínas juntas tienen actividad endonucleasa capaz de cortar una hebra en los bordes repetidos del T-DNA. Estos cortes actúan como punto de partida para la síntesis de DNA (en

dirección 5' 3'). La hebra de simple cadena se libera por desplazamiento. Alternativamente estos cortes pueden ser usados por sistemas de recombinación para disociar la región T (en forma de doble cadena) con baja frecuencia. Hace tiempo se observó que la delección del borde derecho abolía completamente la transferencia (Ooms y col. 1982), mientras que la delección o mutación del izquierdo sólo causaba una disminución en la frecuencia de la transferencia (Hille y col. 1983). Esta polaridad en el sistema concuerda con la posibilidad de la formación de la hebra T por desplazamiento luego de una síntesis de 5' a 3' desde el borde derecho al borde izquierdo. Ante la ausencia del borde derecho, la síntesis no podría comenzar mientras que el proceso de terminación podría ocurrir, aunque no esté el borde izquierdo. Para la formación de moléculas de doble cadena por recombinación, ambos bordes serían igualmente importantes. Por lo tanto la recombinación aparentemente no está involucrada con la formación de intermediarios de T-DNA.

La siguiente pregunta a contestar fue por qué la región a la izquierda del borde izquierdo no se transfiere con alta eficiencia a las células de plantas. Se encontró que los bordes izquierdos son mucho menos eficientes para actuar como sitios de iniciación de la síntesis de DNA. La diferencia en la funcionalidad de los bordes izquierdo y derecho no se debe a pequeños cambios en las secuencias de los bordes repetidos sino a la presencia de un "enhancer" cercano al borde derecho. A este "enhancer" de la transferencia del T-DNA se lo llama "overdrive". Como todo "enhancer" funciona en ambas orientaciones y a diferentes posiciones y distancias del borde derecho. La delección de este "enhancer" causa una disminución drástica de la virulencia. Se halló que la proteína VirC1 se une específicamente a este "enhancer" (Hooykaas y col. 1992).

Las moléculas de T-DNA de simple cadena no entran desnudas al citoplasma de la célula vegetal, sino que tienen a la proteína VirD2 covalentemente unida al extremo 5', haciéndolo menos vulnerable al ataque por exonucleasas (Dürrenberger y col. 1989). Además, esta proteína podría actuar como piloto dirigiendo al T-DNA al núcleo. La proteína VirE2 es una proteína capaz de unirse cooperativamente a DNA de simple cadena, cubriendo al T-DNA formando filamentos de nucleoproteína (Citovsky y col. 1989). Sin embargo nunca se hallaron estos complejos en citoplasmas de las células de plantas.

El resto de las proteínas vir no están involucradas ni en la regulación de la expresión ni en la formación de la hebra T. De ellas, sólo las codificadas por el operón B son esenciales para la virulencia. El locus *virB* contiene 11 genes. La mayoría de las proteínas codificadas por estos genes están localizadas en membrana. Varios autores sugirieron que podrían formar una estructura a través de la cual el T-DNA ingresaría a la célula (Ward y col. 1990). El gen *virB11* tiene un sitio de unión al ATP, y la proteína tiene actividad ATPasa. Por lo tanto podría estar involucrado en proveer la energía necesaria para la transferencia (Hooykaas y col. 1992).

Los plásmidos de octopina y de nopalina tienen genes *vir* accesorios que son específicos para cada uno de ellos y afectan el rango de huésped para la formación de tumores. En los plásmidos de octopina estos son *virF* y *virH*, y en los plásmidos de nopalina es el gen *tzs*. Este último gen codifica para una enzima involucrada en la producción de una citoquinina, la trans-zeatina (Beatty y col. 1984). El operón *virH* contiene dos genes que codifican para proteínas similares a las enzimas de citocromo P450 (Kanemoto y col. 1989). Estas proteínas tendrían un rol en la detoxificación de ciertos compuestos vegetales que afectan el crecimiento de *Agrobacterium*. El operón *virF* codifica para una proteína de 23 kDa que no tiene homología con ningún gen secuenciado hasta el momento (Melchers y col. 1990).

#### **B 4) Transformación por *Agrobacterium*:**

##### **B 4. 1) Generalidades.**

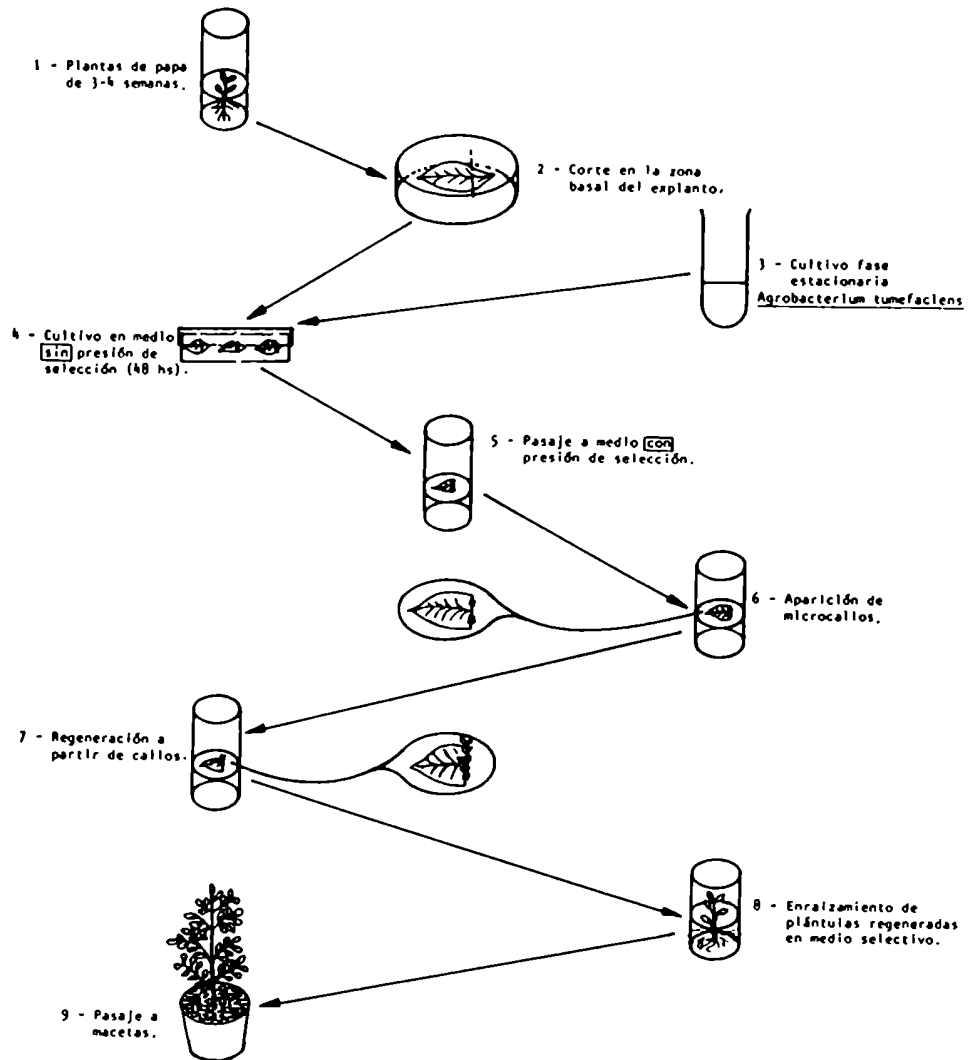
A partir de 1983, cuando Fraley y col. informaron la obtención de plantas de tabaco y petunia transgénicas, ha habido una cantidad de trabajos detallando la transferencia de genes foráneos a una cantidad creciente de especies de plantas.

El sistema derivado de *Agrobacterium tumefaciens* ha sido utilizado para la transformación de varias dicotiledóneas como tabaco, papa, petunia, tomate, etc. Existen especies que no son susceptibles a la infección y posterior transformación mediada por *Agrobacterium*. Según Potrykus, la característica crítica para que una especie sea transformada por *Agrobacterium*, es el tipo de respuesta a heridas desarrollado por la planta (Potrykus 1991). Así, algunas monocotiledóneas que responden a las heridas con proliferación y dediferenciación de células en la región dañada como *Asparagus* (monocotiledónea) pudieron ser transformadas.

Inversamente, dicotiledóneas que responden con muerte celular en las zona herida son refractarias a la transformación. Las dificultades para utilizar los sistemas derivados de *Agrobacterium* en la transformación de cereales, condujeron al desarrollo de técnicas de transformación basadas en la transferencia directa de genes (Klein y col. 1987). En algunos casos (Bidney y col. 1992), lo más efectivo fue una combinación de ambos tipos de técnicas (transformación por *Agrobacterium* de tejido previamente bombardeado).

A continuación se describen los vectores, las cepas y los explantos que se utilizan en el sistema de transformación mediante *Agrobacterium*, y luego se hace una breve descripción de las etapas del método, las que se esquematizan en la siguiente figura.

Figura 1:



Esquema del método de transformación utilizado.

**B 4. 2) Vectores intermediarios utilizados en la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*:**

Debido a su gran tamaño (200 kpb), los plásmidos Ti son difíciles de manipular *in vitro* por las técnicas de DNA recombinante. Consecuentemente se desarrollaron vectores intermediarios, en

los que se hacen todas las manipulaciones genéticas (clonado del gen de interés y del gen marcador de selección bajo el control de promotores y terminadores adecuados, etc.). Luego estos genes son transferidos al plásmido Ti de *Agrobacterium*, mediante conjugación o métodos directos.

Todos los vectores de transformación tienen características comunes impuestas por los requerimientos de *Agrobacterium*:

- a) Como ya se mencionó, el T-DNA está delimitado por repeticiones directas imperfectas de 25 pares de bases. No se requiere ningún otro elemento en *cis* para causar la escisión y transferencia del T-DNA. Un vector de transformación debe, por lo tanto incluir al menos un borde, o ser capaz de cointegrar en otro plásmido Ti de manera de quedar acotado por dos bordes.
- b) Todos los vectores llevan un marcador de selección en bacterias esencial para la introducción del vector en *Agrobacterium*. Un marcador de selección es un gen que codifica para una proteína capaz de inactivar un determinado agente selectivo.
- c) Todos incluyen también, un marcador de selección en plantas, para permitir sólo el crecimiento de aquellas células transformadas. Los marcadores de selección se basan en la sensibilidad de las células de plantas a antibióticos y herbicidas. La expresión de genes que codifican para enzimas capaces de detoxificar tales compuestos en las células, las hacen resistentes. Se construyeron genes quiméricos en donde la secuencia codificante de una enzima detoxificante está bajo el control de señales de expresión en plantas (promotores 35S, 19 S, NOS, OCS etc., terminadores NOS, etc.). Uno de los marcadores más ampliamente utilizados es el gen de la enzima bacteriana neomicina fosfo transferasa II (NPT II Bevan y col. 1983). Esta enzima fosforila aminoglucósidos como kanamicina, neomicina y G 418, inactivándolos. Otros marcadores de selección útiles en plantas son el gen que codifica para una fosfotransferasa que confiere resistencia a higromicina (van den Elzen y col. 1985), un alelo del gen que codifica para la dihidrofolatoreductasa de ratón, que es 200 veces menos afín al metotrexate que el gen salvaje (Eichholtz y col. 1987). Otro marcador de selección utilizado es el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* que confiere resistencia a fosfinotricina, presente en los herbicidas comerciales Basta® y Bialaphos® (De Block y col. 1987). Ver sección E 1.

Un buen agente selectivo debe arrestar el crecimiento, o matar a las células vegetales lentamente, ya que las células no transformadas muertas, liberan al medio una variedad de compuestos tóxicos que impiden el crecimiento y/o diferenciación de las células transformadas.

Algunos vectores incluyen también un gen indicador ("reporter"), es decir un gen que codifica para una enzima que no está presente en la planta y cuya actividad es fácilmente medible. Es deseable, además que la actividad del gen indicador se mantenga cuando está fusionado a otra proteína en su extremo amino terminal, para permitir el estudio de la traducción y del



procesamiento durante el transporte de proteínas. Es conveniente que la enzima indicadora sea detectable en ensayos histoquímicos para localizar la actividad en tipos celulares particulares. Se han usado más de seis genes indicadores en estudios de plantas superiores (Jefferson 1987 b). Estos incluyen la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* (gen *lacZ*), la cloramfenicol acetil transferasa (CAT), la neomicina fosfotransferasa (APH3'II, NPT II), la nopalina sintetasa (NOS), la octopina sintetasa (OCS) y la luciferasa de luciérnaga.

Dado que en casi todos los tejidos de plantas hay galactosidasas, el gen *lacZ* no es un buen indicador en plantas. Los problemas asociados con la actividad endógena, fueron solucionados usando los genes que codifican para la nopalina sintetasa y la octopina sintetasa codificadas en el plásmido Ti. Sin embargo las ensayos de actividad de estas dos enzimas son difíciles de cuantificar y, además la octopina sintetasa no tolera fusiones amino terminales. Los genes indicadores más usados pasaron a ser entonces los genes que codifican para las enzimas bacterianas cloramfenicol acetil transferasa y neomicina fosfo transferasa. Los ensayos para estas dos enzimas son relativamente difíciles, costosos y sufren de actividades endógenas variables en plantas (generalmente causadas por enzimas de amplia especificidad de sustrato). En cuanto a la enzima luciferasa, es lábil y difícil de ensayar con exactitud.

[En 1987a) y b) Jefferson, describió el uso del gen *uid A* que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) de *E. coli* como gen indicador. Esta enzima cataliza la hidrólisis de una cantidad de glucurónidos. Sus sustratos consisten en ácido D-glucurónico conjugado a través de una unión  $\beta$ -O-glicosídica con virtualmente cualquier aglicona. Debido a la robustez de la enzima, a la simplicidad de su ensayo y a la variedad de sustratos disponibles, el gen *uid A* es el indicador más usado en la actualidad. Se trata de una enzima estable. Tolerla la presencia de varios detergentes y condiciones iónicas. No requiere cofactores. Actúa a cualquier pH fisiológico. No hay actividad  $\beta$ glucuronidasa en plantas superiores. Además la enzima puede tolerar grandes adiciones amino-terminales. No obstante estar el gen bajo el control de promotores de plantas, hay observaciones no publicadas que indican que puede haber transcripción de este gen a partir de promotores bacterianos del plásmido Ti de *Agrobacterium*. Para solucionar este inconveniente, Vancanneyt y col. (1990), interrumpieron el gen *uid A* con un intrón (segundo intrón del gen ST-LSI de la papa) que contiene codones de terminación en los tres marcos de lectura posibles, de manera de suprimir la expresión a partir de agrobacterias (las que no pueden procesar el intrón). Las plantas transgénicas eliminan el intrón y expresan el gen *uid A*. Es decir que al detectar actividad GUS podemos asegurar que se trata de expresión de la  $\beta$ glucuronidasa en las células de la planta transformada y no de expresión a partir de las bacterias que se usaron para transformar, cuyo crecimiento es controlado pero no eliminado por el antibiótico cefotaxime.

Por las razones expuestas se decidió el uso de un vector que contiene el gen *uid A* interrumpido por un intrón como gen indicador para los experimentos de puesta a punto de la transformación de papa por el sistema de *Agrobacterium*.

Existen dos tipos de vectores: los de cointegración y los binarios.

Los vectores de cointegración fueron desarrollados por Van Haute y col. en 1983. Poseen una zona de homología con el plásmido Ti residente en *Agrobacterium*. El plásmido intermediario es transferido a *Agrobacterium*, donde no puede replicar. Por un único evento de entrecruzamiento en la zona de homología, el gen de interés (llevado en el plásmido intermediario) se integra en el plásmido Ti y queda acotado por los bordes de 25 pb requeridos para la subsiguiente transferencia del T-DNA a la planta, durante el cocultivo. Debido al requerimiento de homología, cada vector es capaz de integrarse en uno o pocos plásmido Ti diferentes, lo que le quita versatilidad al sistema. Sin embargo, luego de la cointegración, el plásmido es estable en *Agrobacterium*. En el vector pGV3850, los genes *onc* del plásmido C58 fueron reemplazados por secuencias de pBR322. Así, cualquier plásmido derivado de pBR322 puede cointegrar en pGV3850.

Los vectores binarios fueron desarrollados por An y col. en 1985. Contienen orígenes de replicación de un plásmido de alto rango de huésped, de manera que pueden replicar autónomamente tanto en *E. Coli* como en virtualmente todas las cepas de *Agrobacterium*. Para que ocurra la transferencia de DNA, la cepa de *Agrobacterium* receptora debe contener un plásmido Ti que aporte las funciones *vir* en *cis*. Estos vectores transforman *Agrobacterium* con una alta frecuencia, dado que no se requiere cointegración para su mantenimiento en *Agrobacterium*: el 10% de los exconjugantes de la cepa receptora contienen el vector binario. Esto significa de un 100% a 4 o 6 órdenes de magnitud más que la tasa de formación del cointegrado. Además, no hace falta confirmar la integración correcta por Southern, como en el caso de los vectores de cointegración.

Los plásmidos Ti y Ri salvajes son capaces de transferir a una célula de la planta genes que codifican para enzimas que intervienen en la síntesis de auxinas y citoquininas. Obviamente, las células transformadas que produzcan altos niveles de hormonas van a ser incapaces de regenerar y dar lugar a plantas enteras. Por lo tanto, los plásmidos Ti y Ri usados para transformar son desarmados, es decir se les quitan los genes *onc* responsables del fenotipo tumoral.

#### B 4. 3) Cocultivo:

Se hiere el explanto a transformar con un bisturí y se lo coloca en un medio de cultivo, durante un tiempo variable, con *Agrobacterium*. Durante esta etapa se inducen los genes *vir* del plásmido Ti o Ri de *Agrobacterium*, las bacterias se fijan a las células de la planta (especialmente sobre el

borde herido del explanto), y ocurre la transferencia del T-DNA, tal como ya se describió en detalle en las secciones previas. El paso clave de esta etapa es lograr una buena inducción de los genes *vir*, mediante un medio de cultivo apropiado.

Algunos de los protocolos de transformación descritos usan una capa de células alimentadoras de tabaco o de la misma especie que se desea transformar durante la etapa del cocultivo.

#### B 4. 4) Regeneración de las células transformadas:

Una vez finalizado el cocultivo, los explantos se transfieren a medio de regeneración selectivo. Este medio contiene cefotaxime para controlar el crecimiento de *Agrobacterium*, el antibiótico adecuado para seleccionar aquellas células transformadas, y las hormonas necesarias para inducir la regeneración de estas células.

Esta etapa es el cuello de botella de todo el proceso: el entorno para la regeneración es poco favorable, ya que las células no transformadas que se van muriendo, liberan compuestos tóxicos (generalmente fenoles) que inhiben la regeneración.

#### B 4. 5) Cálculo de la eficiencia de transformación:

Hay una gran ambigüedad con respecto a la manera en que se calcula la eficiencia de transformación. El problema principal es que en general no se explicita la manera en que se separan los brotes regenerantes del explanto inicial. Esto puede hacerse: a) a medida que van apareciendo los brotes a lo largo del tiempo o b) una primera y última vez.

Una misma célula transformada puede dar lugar a dos o más brotes sucesivamente. Estos brotes son idénticos entre sí (son clones). Si se separan los brotes según a) y se calcula la eficiencia de transformación como el porcentaje de plantas obtenidas capaces de enraizar en medio selectivo con respecto al número total de explantos que fueron originalmente cocultivados con *Agrobacterium tumefaciens*, estaríamos cometiendo una sobreestimación en el cálculo de la eficiencia de transformación, ya que lo importante es el número de plantas que se obtienen resultantes de eventos de transformación independientes. La llamaremos eficiencia de transformación en sentido amplio (EfA).

Separar los brotes una única vez (según b), es complicado metodológicamente, ya que para que el cálculo sea preciso hay que esperar a que todas las células transformadas tengan oportunidad de regenerar. Por consiguiente los brotes que regeneraron primero dificultarán la separación de los distintos brotes entre sí.

Una alternativa es calcular la eficiencia como el porcentaje de los explantos originales que dieron lugar a plantas que enraizan en medio selectivo con respecto al número de explantos que

fueron cocultivados con *Agrobacterium tumefaciens*. En este caso estaríamos cometiendo una subestimación en el cálculo de la eficiencia de transformación, ya que en muchos casos hay certeza de que se obtienen varios individuos independientes a partir de un único explanto puesto que se diferencian a partir de microcallos evidentemente separados entre sí. La llamaremos eficiencia de transformación en sentido estricto (EfE).

#### **B 5) Transformación genética de papa:**

La susceptibilidad de papa a *Agrobacterium* y el uso de este sistema para la transformación genética fue publicada por Ooms y col. en 1983. Este grupo logró transformar papa (cv. Maris Bard) con una cepa oncogénica de *Agrobacterium tumefaciens* (es decir una cepa que contenía los genes *onc* responsables del crecimiento tumoral). Las plantas obtenidas fueron anormales morfológicamente. Analizaron la producción de opinas por parte de las mismas.

Recién en 1988 Stiekema y col. transformaron rodajas de tubérculos (cv. Binje y Désirée) con una cepa no oncogénica, con una eficiencia del 1%. Para ello necesitaron de una capa de células alimentadoras de papa durante el cocultivo y la regeneración requirió de un paso por la etapa de callo. En el mismo año Sheerman y col. transformaron los cultivares Pentland Dell y Désirée con eficiencias de entre un 4,8 y un 16%. En este caso la regeneración lograda fue directa, es decir no se pasó por callo; usaron una capa de células alimentadoras pero de tabaco. El mismo protocolo no fue efectivo para los cultivares Maris Bard y Maris Piper. En 1989, Ishida y col. lograron la transformación de tubérculos de Russet Burbank y Lemhi Russet crecidos *in vitro*. No aclararon la eficiencia de transformación lograda y obtuvieron un número de escapes (es decir plantas no transformadas que regeneraron en este medio) extremadamente alto.

En 1988 De Block y col. adaptaron la técnica de transformación de discos de hojas descrita por Horsch y col. en 1985 para tabaco, para los cultivares Binje y Désirée de papa. No aclararon la eficiencia de transformación lograda. En el mismo año, Tavazza y col. obtuvieron plantas transgénicas de Désirée con una eficiencia del 23%. Usaron una capa de células alimentadoras de papa. Finalmente en 1989 Wenzler y col. obtuvieron eficiencias de transformación variables de 9% para el cultivar Superior, 20% para Désirée y del 400 al 500% para la línea FL1607 (en este último caso obtuvieron entre 4 y 5 tallos por explanto en medio selectivo). No aclaran cómo definen eficiencia de transformación, pero, aparentemente usan la definición en sentido amplio, ya que por lo menos en el caso de FL1607, contaron todos los tallos que regeneraron en medio selectivo, aún los provenientes de un mismo explanto. El protocolo no fue efectivo para la transformación de Russet Burbank.

## **C) OBTENCION DE PLANTAS RESISTENTES A VIRUS:**

### **C 1) Luteovirus y el Virus del Enrollamiento de la hoja de la papa:**

El virus del enrollamiento de la hoja (PLRV) produce una de las enfermedades más severas y antiguamente conocidas de la papa (Rich, 1983). No solamente provoca una marcada disminución del rendimiento, sino que causa necrosis del tubérculo. Entre las enfermedades virales de la papa, la causada por el PLRV es, tal vez, la de mayor importancia económica, por los efectos devastadores cuando se produce una infección severa. Los rendimientos de las plantas infectadas por PLRV pueden verse reducidos hasta un 50%. Se estima que en el mundo la infección con este virus provoca un 10% de disminución en el rendimiento, lo cual equivale a una pérdida de  $20 \times 10^6$  toneladas de papa por año (van der Wilk y col. 1991). Estos datos implican una subestimación dado que los perjuicios podrían ser mayores si no se utilizaran prácticas de control como el uso de semilla sana. Como ya se comentó, la producción de papa semilla sana tiene una influencia significativa en el costo de producción cercano al 25 % en Argentina y puede llegar hasta un 40 % en países como Brasil, lo cual refleja un perjuicio indirecto por aumento en los costos de producción.

El PLRV es un virus icosaédrico pequeño (de 25 nm de diámetro) perteneciente al grupo de los Luteovirus. Posee una única molécula de RNA de polaridad positiva y una sola subunidad polipeptídica en la cubierta. Las partículas virales están confinadas al floema de las plantas infectadas. Se han encontrado RNAs subgenómicos en células infectadas pero se conoce poco acerca de la biología molecular de este virus (Mayo y col. 1989).

Los Luteovirus fueron reconocidos como grupo de virus de plantas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus recién en 1975 (Shepherd y col.). No obstante, las enfermedades producidas por este grupo fueron observadas mucho tiempo antes. La naturaleza viral del enanismo amarillo de la cebada (BYDV) y del amarillamiento de la remolacha (BWYV) se reconocen respectivamente desde 1951 y 1960 (Rochow y col. 1981). El nombre de este grupo deriva del latín *Luteus* que significa amarillo, debido a que todos los miembros originales de este grupo producían amarillamiento en sus huéspedes. Originalmente la clasificación de los Luteovirus se hizo en base al rango de huésped. A medida que se empieza a disponer de información derivada de reacción con antiseros, hibridación con sondas de cDNA y fundamentalmente de las secuencias nucleotídicas de los genomas de los distintos aislamientos, las relaciones entre estos virus están siendo reevaluadas. Actualmente el grupo consta de 10 miembros y 14 posibles miembros (Waterhouse y col. 1988). Son específicos de tejido ya que sólo replican en el floema de las plantas huéspedes. Se los encuentra en los vasos cribosos, en las células acompañantes y ocasionalmente en las células del parénquima del floema. No pueden ser

transmitidos mecánicamente ni tampoco a través de semilla botánica. En la naturaleza se transmiten a través de infección persistente (circulativa no propagativa) de áfidos vectores (Duffus y col. 1977). Artificialmente pueden transmitirse, además, mediante injertos. No hay evidencias de replicación en los vectores (Eskandari y col. 1979). La mayoría de los Luteovirus tienen un rango de huésped limitado exceptuando unos pocos que tienen un amplio rango de huésped (virus del amarillamiento de la remolacha).

Este grupo de virus ataca a una gran variedad de cultivos. Su control es difícil debido a la relación con sus vectores y a la frecuente infección de malezas y pastos perennes que actúan como fuente de inóculo a campo.

En algunos casos el rango de huésped limitado del virus se debe a un rango de huésped limitado del vector. Por ejemplo el virus del enrojecimiento de la hoja de zanahoria y su vector tienen ambos un rango de huésped limitado. En otros casos se debe al rango de huésped limitado del virus en sí. Por ej. el PLRV tiene un rango de huésped limitado mientras que su vector, *Myzus persicae* tiene un rango muy amplio.

La evolución de los Luteovirus involucra una tricotomía: el virus, la planta y el vector. Cada Luteovirus es transmitido eficientemente por una o pocas especies de áfidos. Este es un factor fundamental en la evolución de los Luteovirus. Un virus introducido en un huésped nuevo (no el huésped natural del vector) debe ser capaz de multiplicar en el nuevo huésped así como también debe poder ser transmitido por un nuevo áfido que se alimente en ese nuevo huésped antes de poder evolucionar independientemente. En huéspedes perennes, el virus puede evolucionar durante un tiempo considerable dentro del huésped antes de necesitar ser transmitido por otro áfido que se alimente de ese nuevo huésped. En huéspedes anuales, el tiempo de evolución dentro de esa planta está limitado ya que los Luteovirus no se transmiten por las semillas. La separación en huéspedes distintos permite, entonces, la evolución independiente tan efectivamente como la separación geográfica.

### C 1.1) Sintomatología:

A primera vista, los síntomas en plantas infectadas por Luteovirus son más vagos, generales y menos útiles para diagnóstico que los síntomas en plantas infectadas por otros virus. Hay una disminución en el crecimiento o desarrollo de las plantas infectadas; las hojas pueden tornarse amarillas o rojas y curvas y quebradizas (vidriosas). Los síntomas varían según la especie, la variedad, la edad y la condición fisiológica de la planta la momento de la infección.

En la figura 2 se muestran los síntomas causados por el virus del enrollamiento de la hoja de papa sobre una planta de papa del cultivar Huinkul-MAG con infección primaria.

### Figura 2:



Dos plantas de papa del cultivar Huinkul-MAG infectada (a la izquierda) y sin infectar (a la derecha) con PLRV.

#### C 1. 2) Organización genómica:

La determinación de la secuencia nucleotídica completa de tres miembros del grupo de los Luteovirus (BYDV-PAV, Miller y col. 1988; PLRV, Mayo y col. 1989; Van del Wilk y col. 1989; Kawchuck y col. 1989; BWYV, Veidt y col. 1988) ha aumentado la comprensión de la organización genómica y estrategias de expresión de los Luteovirus.

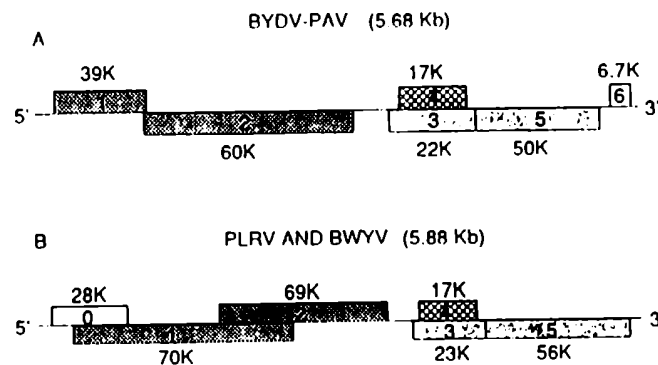
Todos los miembros del grupo tienen un genoma compuesto por una molécula de RNA de simple cadena y polaridad positiva, de entre 5,5 y 6 kpb. Poseen una proteína (VPg) unida al extremo 5'. No presentan poliadenilación ni estructuras del tipo tRNA en el extremo 3' (Tacke y col. 1989). Hay pocos nucleótidos no codificantes y una gran superposición de los distintos marcos abiertos de lectura (ORFs).

La comparación entre las secuencias de los distintos Luteovirus, sugiere al menos dos tipos principales de organización genómica: el representado por PLRV y BWYV, y el representado por BYDV-PAV. No obstante, estos dos grupos comparten una serie de características que los ubican dentro de los Luteovirus:

- \* ORFs 1 y 2 superpuestos.
- \* ORF 4 enteramente dentro de ORF 3.
- \* ORF 5 separado del ORF 3 que lo precede por un codón de terminación ámbar.

La organización general de estos dos grupos se muestra en la figura 3.

**Figura 3:**



Organización genómica de Luteovirus. Los ORFs con el mismo número representan genes correspondientes en los dos subgrupos.

BYDV: virus del enanismo amarillo de la cebada; PLRV: virus del enrollamiento de la hoja de papa; BWYV: virus del amarillamiento de la remolacha

A continuación se detallarán brevemente las funciones de los distintos ORFs de Luteovirus así como también las experimentos que condujeron a su descubrimiento:

**ORFs 1 y 2:** Los primeros dos marcos de lectura de BYDV-PAV y del virus del enanismo de la soja (SDV) y sus contrapartes de BWYV, PLRV y el virus del enrojecimiento de la hoja de zanahoria codifican para dos polipéptidos de la RNA polimerasa-RNA dependiente. Esta identificación se basa en la presencia de una secuencia consenso de aminoácidos presente en otras polimerasas virales: GXXXTXXXN(X)20-40GDD en el ORF 2. Se propuso que el ORF 2 es expresado luego de un cambio de fase traduccional en el codón de terminación de lectura ("stop") del ORF 1 (Mayo y col. 1989; Miller y col. 1988; Veidt y col. 1988).

**ORF 3:** Comparando la secuencia de aminoácidos de fragmentos de viriones disociados y la secuencia deducida a partir de la secuencia nucleotídica se demostró que éste marco de lectura codifica para la cápside en BYDV-PAV. Este hallazgo fue confirmado por detección serológica de una proteína de fusión codificada por un fragmento del ORF 3 y el gen *lacZ* de *E.coli* usando anticuerpos contra viriones de BYDV-PAV purificados. Las proteínas de cápside en PLRV, BWYV y el virus del enanismo de la soja, fueron identificadas por homología con BYDV y confirmadas por técnicas similares a las descritas para este virus.

**ORF 4:** EL ORF 4 está completamente dentro del ORF 3 en otro marco de lectura. Basándose en el tamaño de la proteína VPg aislada de BYDV se propuso que codifica para VPg. En el caso de PLRV, se reportó que la proteína VPg tiene 7 kDa y se libera a partir de un precursor de 17 kDa codificado por el ORF 4 (Van der Wilk y col. 1989).



ORF 5: Todas las proteínas de cápsides de Luteovirus secuenciados hasta el momento finalizan en un codón de terminación ámbar, seguido por el ORF 5 que está en el mismo marco de lectura y que podría codificar para una proteína de entre 50 y 56 kDa. La traducción con modificación del marco de lectura ("readthrough") del codón de terminación daría lugar a una proteína poco abundante de alto peso molecular. Durante un tiempo se confundió a esta proteína con un multímero de proteína de cápside, ya que anticuerpos producidos contra viriones completos de BYDV-PAV y contra una proteína de fusión de ORF 3 en el vector de expresión en bacterias pGEX, reconocían tanto a la banda de 22 kDa de cápside como una banda de 60 kDa. Sin embargo, anticuerpos preparados contra una proteína de fusión del ORF 5 y la glutatión transferasa reaccionaban sólo con la banda de alto peso molecular. Se demostró así que la banda de 60 kDa estaba compuesta por la proteína de cápside (22 kDa) y la proteína codificada por el ORF 5 (50 kDa). El tamaño menor que el esperado (60 kDa en vez de 72 kDa) puede atribuirse a una migración anómala de la proteína en geles de poliacrilamida (tiene una porción rica en prolínas) o a modificaciones postraduccionales. El hallazgo de que antisuero contra la proteína de 50 kDa precipita viriones purificados junto con experimentos en los que la proteína es removida de la superficie del virión por digestión con tripsina, demuestran que esta proteína está en la superficie de la partícula viral. Se ha propuesto que está involucrada en la especificidad de la transmisión por áfidos (Waterhouse y col. 1989) actuando a nivel de transporte de los virus desde la hemolinfa a los ductos salivales. Una hipótesis alternativa es que interviene en el ensamblaje de las partículas virales.

ORF 6 y 0: En el subgrupo de PLRV - BWYV hay un ORF que se superpone con el ORF 1, llamado ORF 0. Codifica para una proteína de 28 kDa. La función de esta proteína es desconocida, pero se sugirió que codifica para una proteasa que cliva el producto de 17 kDa del ORF 4 dando lugar a una VPg funcional más pequeña (Van der Wilk y col. 1989). En el BYDV-PAV hay un sexto ORF que codificaría para un producto de 6,7 kDa.

### C 1. 3) Estrategias de expresión génicas:

La organización del genoma de los Luteovirus sugiere una multitud de diferentes estrategias de expresión génica.

Usando RNA de PLRV en experimentos de traducción *in vitro*, se demostró la existencia de dos proteínas, una predominante de 28 kDa correspondiente al ORF 0 y otra minoritaria de 70 kDa correspondiente al ORF 1. Esto sugiere que la banda de 70 kDa resulta de un número limitado de ribosomas que recorren el RNA desde el extremo 5', pasan el sitio de iniciación del ORF de 28 kDa e inician la traducción en el AUG del ORF 1 de 70 kDa. Esto es inusual, ya que la mayoría de los RNAs virales se expresan de manera monocistónica con ribosomas recorriendo el RNA

desde el extremo 5' hasta el primer AUG. Si embargo existen otros ejemplos de **iniciación interna** en el mismo RNA (Kozak y col. 1986). En estos casos el primer AUG está dentro de un contexto subóptimo que permite que algunos ribosomas inicien la traducción, mientras que otros siguen de largo y comienzan la traducción en el segundo AUG que encuentran. Ninguno de los sitios de iniciación propuestos corresponde con las secuencias consenso descriptas para plantas o animales.

La expresión de un producto de fusión entre los ORFs 1 y 2 por **cambio de fase traduccional** es un mecanismo comúnmente propuesto para Luteovirus. Las evidencias para sostener esta hipótesis son:

- a) El sitio de iniciación del ORF que está hacia 3' (en este caso el ORF 2) está a una distancia considerable río abajo del AUG del ORF que está en el extremo 5' (en este caso ORF 1). Esta distancia es de 300, 216 y 95 nt para PLRV, BWYV y BYDV-PAV respectivamente.
- b) En PLRV y BWYV hay una homología más alta en el extremo 5' del ORF 2, es decir en la zona superpuesta con ORF 1 que en el resto del ORF 1, sugiriendo que el cambio de fase traduccional ocurre en el extremo 5' de la zona superpuesta.
- c) La estructura secundaria que rodea el sitio donde ocurre el cambio de fase comparte propiedades encontradas en RNAs de virus donde se sabe que existe este mecanismo. Ej. Coronavirus (Brierley y col. 1989) y Retrovirus (Jacks y col. 1988).

Como muchos otros virus a RNA, se cree que la expresión de los ORFs de la mitad 3' del genoma ocurre mediante **RNAs subgenómicos**. La corta (202 nt-116 nt) región no traducible río abajo del ORF 2 tiene homología con regiones promotoras de subgenómicos de virus a RNA de plantas y animales. Mayo y col. (1989), identificaron dos zonas de homología entre BYDV-PAV, PLRV y BWYV. Esta región común contiene secuencias UA repetidas seguidas por AAGA. Tanto PLRV como BYDV-PAV producen subgenómicos largos de aproximadamente 3-3,5 Kb. Comienzan, tentativamente, río arriba del comienzo del ORF 3 y se extienden hasta el extremo 3' del genoma viral. BYDV-PAV podría tener un segundo subgenómico de 0,8 Kb para expresar el ORF 6.

En otros virus de plantas, los RNAs subgenómicos son producidos por iniciación interna sobre una copia negativa del genoma viral. Se ha propuesto que la replicasa viral reconoce secuencias promotoras internas presentes en la cadena negativa e inicia la síntesis de un RNA subgenómico positivo. Si se coloca el fragmento de 121 nt de la región río arriba del sitio de iniciación del ORF 3 de BYDV-PAV bajo el control del promotor 35 S y fusionado con el gen GUS, de manera que la transcripción a partir de este promotor resulte en RNA de polaridad negativa, y, con esta construcción se transforman protoplastos, no hay actividad GUS detectable. Si esta construcción es co-introducida con viriones de BYDV-PAV o con RNA de BYDV-PAV transcrito *in vitro*, hay actividad GUS. Esto sugiere que el fragmento de 121 nt es suficiente

para actuar como promotor del subgenómico. Presumiblemente la replicasa viral reconoce la región promotora del subgenómico en el transcripto de polaridad negativa transcripto a partir del promotor de 35S y dirige la síntesis de mRNA de polaridad positiva (Martín y col. 1990).

El subgenómico actúa como mensajero para la expresión de 3 productos génicos. El ORF 3 es el que está en el extremo 5' del subgenómico. El ORF 4 se expresa a partir del subgenómico, por un mecanismo similar al descrito para la expresión de los ORFs 0 y 1. La expresión del ORF 5 ocurre por traducción modificada del marco de lectura ("readthrough") del codón de terminación ámbar que separa los ORFs 3 y 5. Hay una serie de evidencias para ello:

a) Estudios de transcripción y traducción *in vitro* usando clones de cDNA de BWYV

conteniendo el codon ámbar de terminación dieron lugar a un polipéptido del tamaño esperado para el producto de fusión (Veidt y col. 1988).

b) ORFs 3 y 5 de PLRV, BYDV-PAV y BWYV están en el mismo marco de lectura, separados por el codón de terminación ámbar y comparten el mismo motivo: CCAAUAGGU alrededor del codón de terminación.

c) Este motivo comparte características con otros codones donde se sabe ocurre el saltado del codón de terminación en otros virus (Bouzoubaa y col. 1986; Goelet y col. 1982; Miller y col. 1988).

Los extremos 3' de BYDV-PAV, PLRV y BWYV tienen poca homología entre sí y, por analogía con lo que ocurre en otros virus, se supone que esta región contiene las secuencias necesarias para dirigir la síntesis de RNA genómico de polaridad negativa. Esta región no está bien caracterizada aún.

## **C 2) Resistencia natural a virus:**

Las enfermedades virales causan serias pérdidas en el rendimiento y en la calidad de muchos cultivos. Los mecanismos de control tradicionalmente utilizados incluyen el uso de semillas libres de virus (certificación de semillas), la propagación vegetativa (técnicas de cultivo de tejidos), la restricción al movimiento del patógeno a áreas nuevas (cuarentena), la rotación de cultivos, el control de malezas huéspedes de virus, la prevención de la transmisión viral por vectores, la cura de la enfermedad por quimioterapia, termoterapia o cultivo de meristemas, y el uso de cultivares resistentes (mejoramiento genético). Este último sistema es, indudablemente, el más deseable pero no siempre posible (Fraser 1990).

La mayoría de los estudios de la relación hospedante patógeno en plantas se hicieron con hongos y bacterias. Uno de los logros más importantes de la genética en este terreno fue el desentrañamiento de las interacciones gen a gen entre loci de resistencia/susceptibilidad en la planta y los correspondientes de virulencia/avirulencia en el patógeno (Flor 1956). En muchos

casos la resistencia y la avirulencia son caracteres dominantes sobre la susceptibilidad y la virulencia, respectivamente, aunque hay excepciones.

A continuación se incluye una breve descripción de los distintos tipos de resistencia, con el objeto de aclarar parte de la terminología que se manejará (indicada en negritas) y señalar el tipo de resistencia genética que se estudiará a lo largo de este trabajo.

#### C 2. 1) Resistencia de la planta no-huésped:

La resistencia de una planta no-huésped a un determinado virus es una característica de especie. Ninguno de los miembros de una determinada especie muestran síntomas y no hay multiplicación viral luego de la inoculación con un determinado virus. Esto puede deberse a que la especie no contiene funciones de susceptibilidad requeridas por el virus. Por ejemplo las plantas no huéspedes no sintetizan una subunidad de la replicasa viral (que sí está presente en las plantas huéspedes) de manera que no se puede formar una replicasa funcional (Mouches y col. 1984). Algunas especies no huéspedes, sin embargo, permiten la replicación del virus en protoplastos inoculados (Paje-Manalo y col. 1989), lo que indicaría que otro mecanismo sería el responsable de la resistencia. En otros casos, la multiplicación viral ocurre en una única o en pocas células, cercanas al lugar de inoculación. A estas infecciones se las llama **subliminales** (Cheo y col. 1971; Sulzinski y col. 1982). En estos dos últimos casos la resistencia operaría en contra del transporte de célula a célula.

#### C 2. 2) Resistencia adquirida:

Una planta normalmente susceptible o resistente, puede tener un nivel de resistencia adicional conferido por una inoculación previa o por un tratamiento químico. Un ejemplo de este tipo de resistencia es la producida por una reacción de **hipersensibilidad** de la planta por formación de lesiones locales en el sitio de inoculación (Fraser 1985). Este tipo de resistencia es en general no específica: una infección por un virus puede inducir resistencia frente a hongos, bacterias u otros virus.

En contraste, la **protección cruzada** resultante de una infección sistémica previa es altamente específica (Urban y col. 1990). Este tema se tratará en detalle más adelante.

Ninguno de estos tipos de "resistencia" parecen estar bajo el control de sistemas genéticos simples en el huésped.

#### C 2. 3) Resistencia genética de un cultivar:

Un cultivar genéticamente resistente contiene uno o varios genes que le confieren resistencia frente a un virus ante el cual la especie como un todo es susceptible. Este tipo de resistencia puede ser sobrepasada por cepas virulentas del virus. La reacción del huésped está asimismo afectada por la **tolerancia**, que también puede estar controlada genéticamente. La tolerancia es la resistencia a la aparición de síntomas o pérdidas en el rendimiento, más que a la multiplicación viral (Edwards y col. 1988), y no debe ser confundida con la resistencia genética de la cual nos vamos a referir en lo sucesivo.

### **C 3) Genética de la resistencia de plantas a virus:**

Las etapas críticas en la interacción planta-virus son los eventos de reconocimiento entre moléculas codificadas por el hospedante y el patógeno, la transducción de la señal y la inducción de la respuesta.

Bald y Tinsley (1967 a, b y c) propusieron un modelo en el cual el **reconocimiento** específico trae como consecuencia la **susceptibilidad** y la multiplicación viral. La resistencia se debe a la falta de factores imprescindibles para la multiplicación viral en el huésped, o a la presencia de factores defectivos en su rol en la multiplicación viral, pero efectivos en su rol en el metabolismo de la planta, cualquiera sea este rol. Este tipo de resistencia involucra un mecanismo negativo, y es probablemente recesiva. Conduciría a inmunidad completa si la función de susceptibilidad del huésped está ausente por completo. La posibilidad de que el virus mute y sobrepase este tipo de resistencia sería, por lo tanto, baja.

En contraste se ha propuesto que el evento de **reconocimiento** es el determinante de la **resistencia**. Este caso involucra la participación de una función codificada por el virus y de otra codificada por el gen de resistencia del huésped, con la consecuente inhibición de la multiplicación o de la distribución del virus. Este modelo corresponde a un tipo de mecanismo positivo. La respuesta del huésped puede ser directa (si el producto del gen de resistencia del huésped es de por sí un inhibidor). En este caso la resistencia sería constitutiva. Alternativamente el producto codificado por el huésped podría no ser un inhibidor, pero ser capaz de desencadenar una respuesta que conduzca a resistencia en el huésped. Esta respuesta podría involucrar varios genes. Se trata de una respuesta indirecta. En ambas variantes de este mecanismo positivo, la resistencia debería ser dominante o dominante incompleta (dependiente de la dosis génica), y el virus podría adquirir virulencia con una modificación en el factor de manera que retenga su función en la patogénesis viral pero ya no participe en el evento de reconocimiento.

Esta mutación es más probable que aquella que haga que el virus se independice de una función codificada por el patógeno como se requería en el primer modelo. La predicción es entonces que la virulencia debería ser más común en los casos de genes de resistencia que codifiquen para un

inhibidor positivo (dominante o dominante incompleto) que en los de genes de resistencia negativos (recesivos).

En muchos casos la resistencia a virus de plantas está bajo un control genético simple, involucrando un único locus. En otros casos se han detectado dos o más genes independientes. Generalmente los análisis genéticos de estos casos han sido simples, y la resistencia o la susceptibilidad han segregado mendelianamente, e indicado relaciones de dominancia claras entre los distintos alelos.

En otros casos se han propuesto interacciones génicas más complejas, que pueden ser de distintos tipos:

a) Dominancia incompleta (dependencia del dosaje génico). La resistencia puede parecer como completamente dominante o recesiva en base a la severidad de los síntomas pero puede mostrar un efecto dependiente de la dosis génica cuando se mide multiplicación viral. Esto ha ocurrido en el caso del gen *Tm-1* de tomate para resistencia al virus del mosaico del tabaco (TMV) (aparentemente dominante) (Fraser y col. 1980) y el gen *hc-1* de poroto de resistencia al virus del mosaico común del poroto (aparentemente recesivo) (Day 1984).

b) Resistencia controlada por varios genes. Inevitablemente las tasas de segregación son complejas. Siempre que se obtienen tasas de segregación complejas hay una tendencia a invocar a este tipo de fenómeno para explicarlas. Este bien puede ser el caso, pero se debe tener especial cautela en dos puntos: 1) la evaluación de los efectos del ambiente y 2) la consideración de las características directas de la resistencia y no de los síntomas, ya que la evaluación de la resistencia/susceptibilidad a partir de los síntomas introduce un grado mayor de complejidad al análisis genético.

Hay varios casos en los que la resistencia está bajo un control génico complejo (Drijfhout 1978) o donde hay genes modificadores del huésped o donde el fondo genético del huésped es importante (Catherall y col. 1966).

Hay ejemplos, además, en los que un gen parece conferir resistencia a varios virus. Claramente aquellos genes que afectan el comportamiento de un vector son miembros "pasivos" de este grupo. Los casos interesantes son aquellos que involucran mecanismos de resistencia que operan contra varios virus en una misma planta. La mayoría de los ejemplos disponibles involucran a los Potyvirus. Así, la resistencia de *Capsicum annum* al virus Y de la papa (PVY) y al virus del grabado ("etch") del tabaco (TEV) parece ser conferida por un único gen, mientras que el gen *mo* de arveja confiere resistencia al virus del mosaico amarillo del poroto (BYMV) y al virus del mosaico de la sandía (Fraser, 1990).

#### **C 4) Protección cruzada clásica:**

El término fue propuesto por McKinney en 1929. Este investigador descubrió que la infección con una cepa de un virus confería resistencia frente a la infección subsiguiente con una cepa igual o cercanamente relacionada. Durante muchos años los agricultores han inoculado sus plantas con cepas "suaves" de virus para retrasar o prevenir los síntomas de la infección y/o prevenir la infección por cepas virulentas.

Sin embargo, distintos aislamientos de un mismo virus varían en el grado de protección cruzada que provocan, y entre aislamientos de ciertos virus no se demostró protección cruzada. La protección entre determinados pares de aislamientos puede no ser recíproca y algunos aislamientos de un mismo virus no confieren protección cruzada en ningún sentido mientras que otros aislamientos del mismo virus sí la confieren. Dado que hay una fuerte evidencia de que la célula vegetal debe ser infectada para ser protegida, alguna de estas situaciones pueden reflejar el grado en que distintos virus varían en su capacidad para infectar las células de una planta. El nivel de resistencia obtenida por protección cruzada es variable. Si las concentraciones de inóculo se aumentan de 100 a 1000 veces (con respecto al inóculo necesario para infectar a una planta sana) las plantas protegidas se superinfectan. A campo, las plantas no suelen verse expuestas a concentraciones tan altas de inóculo y la superinfección ocurre muy raramente. Como la protección cruzada depende de la concentración del inóculo y reduce el número de lesiones locales luego de la inoculación, está claro que suprime la infección inicial. Sin embargo, la reducción en el contenido viral sistémico observada bastante tiempo después de la infección inicial también implicaría una supresión en la replicación y transporte viral.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la protección cruzada, la mayoría de los cuales focalizan la atención sobre el RNA viral o sobre la cápside viral como factores mediadores de este fenómeno. Gibbs propuso en 1969 que un exceso de replicasa del virus protector podría unirse pero no transcribir al RNA genómico del virus desafiante. Según esta teoría nunca ocurriría superinfección, y de hecho ocurre. En 1974 Ross propuso que la replicasa del virus desafiante podría no ser lo suficientemente selectiva y copiar el RNA viral del virus protector debido a su mayor abundancia. El grado de protección estaría dado, por lo tanto, por el grado de afinidad entre la replicasa del virus desafiante y el RNA viral del virus protector. Se encontró que virus relacionados podían utilizar la misma replicasa. En 1984 Palukaitis y Zaitlin propusieron que la protección frente a la infección por virus a RNA se debe a la hibridización entre el RNA - desafiante y el RNA +, en exceso del virus protector. En apoyo a esta teoría se halló protección cruzada con viroides los que no están encapsidados y no codifican para ninguna proteína conocida.

Con respecto a las teorías que involucran a la proteína de cápside, de Zoeten y Fulton propusieron en 1975 que el RNA desafiante es reencapsidado por el exceso de proteína de cápside del virus protector. No hay evidencias experimentales que apoyen esta hipótesis. Más

adelante Sherwood y Fulton (1982) encontraron que la infección de *Nicotiana sylvestris* con una cepa de TMV no confería protección frente a una subsiguiente infección con RNA de TMV o con partículas de TMV tratadas con bentonita (que provoca el desnudamiento parcial). Lo mismo ocurría si el RNA era encapsidado con proteínas de un virus no relacionado. Esto sugirió que la proteína de cápside del virus desafiante es la que determina la especificidad de la reacción. Propusieron entonces que la protección cruzada se debe a un bloqueo en el desnudamiento de la cápside del virus desafiante.

En 1984 Wilson y col. demostraron que partículas de TMV relajadas por tratamiento con alto pH eran buenos templados para la traducción *in vitro*. En 1986 Wilson y Watkins observaron que al añadir proteína de cápside en grandes concentraciones, esta reacción se bloqueaba. Propusieron entonces un mecanismo por el cual la traducción del RNA viral del virus desafiante se ve impedida por la reencapsidación con la proteína de cápside del virus protector. Sin embargo en otros sistemas, se obtuvo protección no solo frente a virus completo sino también frente a RNA viral, por lo que algún otro mecanismo podría estar involucrado.

Todas las hipótesis planteadas hasta el momento involucran la supresión de la infección inicial. También hay evidencias de mecanismos que involucran la supresión de la invasión viral. Dodds y col. (1976) encontraron un caso de protección cruzada en que la cepa desafiante del Virus del Mosaico del Coliflor (CMV) replicaba normalmente pero estaba confinada a la hoja inoculada. En resumen, a pesar de que se han propuesto y encontrado evidencias para muchos mecanismos diferentes, ninguno de ellos explica todos los datos experimentales. Es probable que existan diferentes mecanismos en distintos sistemas virus-huésped.

La protección cruzada se ha usado en muchas instancias para controlar enfermedades virales. Sin embargo presenta varias dificultades: las cepas protectoras pueden ser difíciles de aislar o producir, pueden causar pérdidas en el rendimiento, daño en otros cultivos, no conferir protección contra todas las cepas que se encuentran a campo, mutar en variantes virulentas, aumentar la susceptibilidad frente a patógenos no virales, o permitir la selección en favor de cepas más dañinas. Además, la planta es susceptible hasta que se completa la infección sistémica con la cepa protectora y la aplicación de la cepa protectora puede ser difícil o costosa, especialmente en el caso de cultivos anuales.

#### **C 5) Mejoramiento genético para obtener resistencia a PLRV:**

Las fuentes de resistencia a PLRV no son abundantes y no se encontraron genes mayores. Debido a esto, los programas de mejoramiento para resistencia a PLRV han tratado de seleccionar un tipo de resistencia poligénica, que se expresa como resistencia cuantitativa a la



infección y que es difícil de medir. La selección de un carácter controlado poligénicamente en papa presenta grandes dificultades adicionales dado la naturaleza tetraploide de la papa. Sin embargo algunos cultivares de papa reaccionan a la infección por PLRV desarrollando necrosis sistémica, la que está controlada por un único gen dominante y modificada por genes menores (Ross y col. 1986). Más adelante, Barker y col. (1990) encontraron que la progenie resultante de cruzamientos recíprocos entre un cultivar resistente (G7445) y uno susceptible (Maris Piper) a PLRV se parecía a uno de los padres en una proporción 1:1, que es la esperada si la multiplicación viral estuviera controlada por un gen mayor o un grupo de genes ligados. La concentración de PLRV (cuantificada por ELISA) en el cultivar resistente fue de 60 ng virus/gr de hoja, mientras que en el cultivar susceptible fue de 1200 ng/gr de hoja. En base a éste y otros estudios (Barker y col. 1985, 1986, 1987), Barker propuso que la resistencia a PLRV tendría tres componentes principales: la resistencia a la multiplicación viral, la resistencia a la infección y la inhibición del movimiento del virus desde el follaje a los tubérculos.

#### **C 6) Obtención de plantas transgénicas resistentes a virus:**

Las técnicas de ingeniería genética permiten la transferencia de genes capaces de conferir resistencia al fondo genético de los cultivares apreciados por el productor sin modificación del mismo. El uso de la misma para la introducción de resistencia a virosis en plantas es reciente y prometedora. Hamilton (1980) fue uno de los primeros investigadores en proponer que la expresión de secuencias virales en plantas transgénicas podría ser un método para proteger a las plantas contra las infecciones virales. Otros investigadores aportaron ideas más refinadas acerca de qué secuencias podrían potenciar la protección (Sequeira y col. 1984; Beachy y col. 1985; Sanford y col. 1985). Sobre la base de los modelos de protección cruzada propuestos por de Zoeten y col. (1975), y Sherwood y col. (1982), Sequeira (1984) sugirió que la expresión de la proteína de la cápside viral podría resultar en protección. En 1985 Beachy expuso el uso potencial de genes que expresen secuencias virales antisentido y, en el mismo año, Stanford y col. sugirieron que la replicasa de un virus protector podría unirse a un sitio específico del virus desafiante impidiendo a su propia replicasa unirse al mismo sitio y por lo tanto la replicación del virus desafiante. Varios autores (Powell-Abell y col. 1986, Hemenway y col. 1988, Cuozzo y col. 1988) confirieron resistencia genética a plantas susceptibles a virus interfiriendo con la replicación del patógeno o con su diseminación. Los primeros autores sintetizaron una secuencia de cDNA del virus del mosaico del tabaco codificante para la proteína de cubierta del virus. Una vez incorporada esta secuencia al genoma de plantas de tabaco mediante un plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, el gen quimérico fue capaz de dirigir la síntesis de proteína de

cápside en las plantas transgénicas. Cuando estas plantas fueron desafiadas inoculando con viriones intactos se observó resistencia.

En el caso del virus del enrollamiento de la hoja de la papa, la introducción de un gen de cápside quimérico resultó en plantas con resistencia a esta virosis. Sin embargo, un análisis detallado no permitió la detección de proteína de cápside mediante métodos inmunológicos muy sensibles, aunque sí la transcripción del gen en mRNA que codifica para esta proteína (Kawchuk y col. 1990 y 1991 y van der Wilk y col. 1991).

Para la obtención de plantas transgénicas resistentes a virus se han utilizado varias estrategias distintas, las que se describen a continuación:

#### C 6. 1) Expresión de la proteína de cápside.

Desde 1986 han habido un gran número de publicaciones describiendo protección mediada por expresión de genes codificantes para la proteína de cápside, incluyendo el caso de PLRV, en paralelo con el desarrollo de esta tesis (Beachy y col. 1990). En la tabla 1 se mencionan algunas de ellas.

Tabla 1:

| gen de cápside quimérico | especie | virus | referencia                  |
|--------------------------|---------|-------|-----------------------------|
| P35S:AIMV:NOS            | tabaco  | AIMV  | Tumer y col. 1987           |
| P35S:AIMV:NOS            | tabaco  | AIMV  | Van Dun y col. 1987 b)      |
| P35S:AIMV:NOS            | tomate  | AIMV  | Tumer y col. 1987           |
| P19S:AIMV:CaMV           | tabaco  | AIMV  | Loesch-Fries y col. 1987 a) |
| P19S:AIMV:CaMV           | tabaco  | AIMV  | Loesch-Fries y col. 1987 b) |
| P35S:AIMV:T-DNA ORI-25   | tabaco  | AIMV  | Halk y col. 1989            |
| P35S:AIMV:T-DNA ORI-25   | alfalfa | AIMV  | Hill y col. 1991            |
| P35:CMVrbcS-E9           | tabaco  | CMV   | Cuozzo y col. 1988          |
| P35:PVX:rbcS-E9          | tabaco  | PVX   | Hemenway y col. 1988        |

| gen de cápside quimérico | especie | virus             | referencia                 |
|--------------------------|---------|-------------------|----------------------------|
| cP35:PVX:rbcS-I:9        | papa    | PVX               | Lawson y col. 1990         |
| P35S:PVX:NOS             | papa    | PVX               | Hockema y col. 1989        |
| cP35:PVY:rbcS-I:9        | papa    | PVY               | Lawson y col. 1990         |
| 2xP35S:PLRV:NOS          | papa    | PLRV              | Kawchuk y col. 1990 y 1991 |
| P35S:PLRV:NOS            | papa    | PLRV              | van der Wilk y col. 1991   |
| P35S:PLRV:NOS            | papa    | PLRV              | Barker y col. 1992         |
| P35S:PRV:3' UTS de CaMV  | tabaco  | PRV               | Ling y col. 1991           |
| P35S:PRV:3' UTS de CaMV  | papaya  | PRV               | Fitch y col. 1992          |
| P35S:SMV:NOS             | tabaco  | SMV               | Stark y col. 1989          |
| P35:TSV:NOS              | tabaco  | TSV               | Van Dun y col. 1988 a)     |
| P35S:TEV:3'UTS de CaMV   | tabaco  | TSV               | Lindbo y col. 1992         |
| P35S:SMV:NOS             | tabaco  | TEV, PVY          | Stark y col. 1989          |
| P35S:TRV:NOS             | tabaco  | TRV, PEBV         | Van Dun y col. 1988 b)     |
| P35:TMV:NOS              | tabaco  | TMV               | Powell-Abel y col. 1986    |
| P35:TMV:NOS              | tabaco  | ToMV              | Nelson y col. 1987         |
| P35:TMV:NOS              | tabaco  | ORSV, PMMV, TMGMV | Nejidat y col. 1990        |
| P35:TMV:NOS              | tomate  | TMV, ToMV         | Nelson y col. 1988         |

CaMV: virus del mosaico del coliflor, PRV: virus del manchado anillado ("ringspot") de la papaya, SMV: virus del mosaico de la soja, TSV: virus del rayado ("streak") del tabaco, TRV: virus "rattle" del tabaco, PEBV: virus del amarronamiento temprano de la arveja, ToMV: virus del mosaico del tomate, ORSV: "odontoglossum ring spot virus", PMMV: "pepper mild mottle virus", TMGMV: "tobacco mild green mosaic virus".

P35S: promotor del transcripto de 35S de CaMV; 2xP35S: promotor doble 35S; cP35S: promotor 35S con un enhancer.

NOS: terminador de la nopalina sintetasa; rbcS-I:9: terminador de la proteína rubisco; 3'UTS: region 3' no traducida del CaMV; T-DNA ORI:25: terminador del ORI 25.

La resistencia mediada por expresión de la proteína de la cápside se manifiesta de varias maneras:

a) En de las plantas que expresan la proteína de la cápside (CP+), hay menos sitios de infección en las hojas inoculadas. Para TMV, Nelson (1987) obtuvo entre 95 y 98 % menos lesiones en plantas de tabaco CP+ inoculadas que en plantas de tabaco CP-. Lo mismo se observó en plantas que expresan las cápsides del virus del mosaico de la alfalfa (AIMV) o del virus X de la papa (PVX) (Loesch-Fries y col. 1987 b) y Hemerway y col. 1988).

b) En las plantas CP+ hay una reducción en la tasa de desarrollo de la infección sistémica. A pesar de que las hojas inoculadas resultan infectadas, en las plantas CP+ hay menos casos de infección sistémica. Es decir que existe un retraso en el movimiento del virus desde la hoja inoculada hacia las hojas por encima del sitio de inoculación.

\* En las plantas CP+ hay menos acumulación de virus que en las plantas CP-. Nelson y col. (1987), informaron que las hojas de plantas de tabaco CP+ inoculadas con TMV contenían un 30% menos de virus que las plantas CP-. Las plantas transgénicas que expresan las cápsides del virus del mosaico del pepino (CMV), PVX o PVY no acumulan o acumulan significativamente menos virus que los controles CP- (Cuozzo y col. 1988; Hemenway y col. 1988; Lawson y col. 1990).

Estas tres manifestaciones de resistencia pueden ser, en la mayoría de los casos pero no siempre, superadas por concentraciones crecientes de virus. Cuando se inocularon plantas que expresan la cápside de TMV con 0,4 µg/ml de TMV se observó un retraso de 10 días en la aparición de los síntomas con respecto con los controles CP-, los que desarrollan síntomas cuando fueron inoculados con 0,01 µg/ml. Este retraso se redujo a 1 o 2 días cuando el inóculo fue de 2 µg/ml. Además con inóculos mayores se redujo el número de plantas que escapan a la infección (Powell-Abel y col. 1986). La resistencia de las plantas que expresan las cápsides de AIMV (Tumer y col. 1987), PVX (Hemenway y col. 1988; Lawson y col. 1990), PVY (Lawson y col. 1990; Stark y col. 1989) y virus del grabado del tabaco (TEV) (Stark y col. 1989), en cambio, fue cercana a la inmunidad, aun a altas concentraciones de inóculo (50 µg/ml).

En general, las plantas que expresan mayores niveles de proteína de cápside viral, presentan mayores niveles de protección. Esto ocurre en TMV (Powell-Abel y col. 1986), AIMV (Tumer y col. 1987; Loesch-Fries y col. 1987b; Van Dun y col. 1987b); CMV (Cuozzo y col. 1988) y PVX (Hemenway y col. 1988). Utilizando construcciones que carecían de ATG y que por lo tanto producían transcriptos pero no proteína de cápside, se demostró que en los casos de TMV (Powell-Abel y col. 1986) y AIMV (Van Dun y col. 1988a) la resistencia frente a la infección con los virus respectivos dependía de la proteína de cápside y no del transcripto.

La línea 303 de papa obtenida por Lawson y col. (1990), en cambio, es inmune a la infección por PVX y PVY (tanto por inoculación mecánica como por áfidos vectores) y contiene menores niveles de proteína de ambas cápsides que otras líneas menos resistentes.

Las plantas transgénicas que expresan las cápsides de PVX (Hemenway y col. 1988) o del virus S de la papa (MacKenzie y col. 1990) son resistentes al desafío tanto con virus como con RNA viral. Esto no ocurre en TMV (Nelson y col. 1987), AIMV (Loesch-Fries y col. 1987b; Van Dun y col. 1987 a) y TSV (Van Dun y col. 1988 b) en donde la resistencia es superada por la inoculación de RNA viral.

La efectividad de la resistencia mediada por la proteína de cápside, ha sido muy bien documentada. No obstante, aún no se ha dilucidado, en todos los casos, el mecanismo que media este fenómeno.

La reducción del número de lesiones en los sitios iniciales de infección observada en las hojas inoculadas de las plantas protegidas indica que la proteína de cápside endógena bloquea la infección viral en una etapa temprana. El hecho de que la protección en plantas que expresan la cápside de TMV y AIMV sea sobrepasada por la inoculación con los RNAs virales correspondientes, sugiere que la proteína de cápside endógena inhibe la infección viral impidiendo el desnudamiento del virus o el "uptake" del virus desafiante, tal como se propuso para explicar la protección cruzada. Para investigar esta posibilidad Registrer y Beachy (1988) analizaron la protección en protoplastos de plantas que expresaban la cápside de TMV.

Observaron una reducción en la acumulación de virus y de RNA viral, por lo que los protoplastos resultaron protegidos. Esta protección fue sobrepasada cuando los protoplastos fueron inoculados por RNA de TMV. Estos datos sugirieron que la infección estaba bloqueada con anterioridad o fue bloqueada durante la replicación viral. Para examinar la posibilidad de que la proteína de cápside endógena inhiba el desnudamiento del virus desafiante, los mismos autores inocularon protoplastos con viriones de TMV relajados por incubación a pH 8. Los protoplastos de plantas CP+ no resultaron protegidos. Estos datos apoyan la hipótesis de que la proteína de cápside endógena inhibe el desnudamiento del virus, ya sea mediante la unión directa al virus o mediante la unión a un sitio de desnudamiento del virus en la célula.

Como se mencionó, en el caso de PVX la protección no es sobrepasada por la inoculación con RNA viral. Las diferencias entre TMV y PVX pueden deberse a que los mecanismos de ensamblaje y/o desnudamiento son distintos en estos dos virus. El ensamblaje de TMV procede bidireccionalmente, pero al principio ocurre desde 3' a 5' a partir de un sitio de origen de ensamblado (OAS) que está ubicado en el extremo 3' del RNA viral. Si bien el mecanismo de ensamblaje de PVX no es bien conocido, para otro virus de la misma familia (el virus del mosaico de la papaya) se demostró que el ensamblaje ocurre de 5' a 3' a partir de un OAS ubicado en el extremo 5' del virus. El desnudamiento ocurre de 5' a 3' para TMV y de 3' a 5' para PVX.

El retraso o la falta de infección sistémica en las plantas CP+ con respecto a las CP-, sugiere otro tipo de mecanismo de acción más tardía. El retraso podría deberse a una interferencia con: la distribución de virus de célula a célula en el tejido inoculado, el egreso del virus de la hoja inoculada al tejido vascular, el movimiento a través del tejido vascular, el ingreso a hojas por encima del sitio de inoculación y/o la infección de otros tejidos sanos. Wisniewski y col. (1990) observaron que la distribución de TMV en la hoja inoculada de plantas CP+ fue igual que en las

plantas CP-. Sin embargo la distribución del virus a tejidos distantes se redujo significativamente en las plantas CP+.

#### C 6.2) Expresión de RNA antisentido de cápside:

Se ha informado protección mediada por RNA antisentido de proteína de cápside en PVX (Hemenway y col. 1988), CMV (Cuozzo y col. 1988), TMV (Powell-Abel y col. 1986), PLRV (Kawchuck y col. 1990), y TEV (Lindbo y col. 1992). El caso de PLRV se analizará por separado más adelante.

Hemenway y col. obtuvieron plantas de tabaco que expresaban RNA antisentido de cápside de PVX, las que resultaron protegidas a inóculos de 0,05 µg PVX/ml. Observaron una reducción en el desarrollo de los síntomas y en la acumulación de virus. A pesar de ello, la acumulación de virus fue mayor que en el caso de transgénicas para el gen de cápside (de un 20% y de un 1% con respecto al virus que se acumulaba en las plantas control, respectivamente). Además, estas plantas, no fueron protegidas frente a inóculos de 0,5 µg PVX/ml (las plantas que expresaban el gen de cápside fueron resistentes a este inóculo).

Similarmente Cuozzo y col., (1988) obtuvieron plantas de tabaco que expresaban niveles altos de transcripto antisentido de la cápside de CMV. Estas plantas sólo fueron protegidas frente a bajos niveles de inóculo.

En plantas transgénicas para el antisentido de TEV, Lindbo y col. (1992) observaron un retraso en la aparición de los síntomas así como también una disminución en la severidad de los mismos. Este grupo avanzó en el estudio del tema, ya que encontró que el virus era incapaz de multiplicarse en protoplastos derivados de estas plantas infectados con RNA viral por electroporación.

Hay varias propuestas acerca del mecanismo responsable de la protección observada con esta estrategia, ninguna de ellas confirmada. Una posibilidad es que se formen híbridos RNA/RNA entre el RNA antisentido que se expresa constitutivamente en las plantas transgénicas y RNA del virus, que impidan la traducción y por lo tanto la multiplicación viral, y/o el ensamblaje de los viriones. Otra alternativa es que el RNA antisentido compita con factores virales (como por ej la replicasa) o del huésped, por la unión a zonas determinadas del RNA viral.

Ambas propuestas explicarían la falta de protección frente a inóculos virales altos.

#### C 6. 3) Expresión de satélites.

Se obtuvieron plantas de tabaco transgénicas que expresaban los cDNAs correspondientes a los RNA satélites de CMV (Harrison y col. 1987) y TobRV (virus del manchado anillado,

"ringspot", del tabaco ) (Gerlach y col. 1987) bajo el control del promotor del transcripto de 35S del virus del mosaico del coliflor. Las plantas transgénicas no mostraron síntomas al ser infectadas por CMV o TobRV respectivamente. Si bien la hoja inoculada presentó lesiones necróticas, no hubo infección sistémica y la multiplicación viral, cuantificada por Northern blot fue como mínimo un 80% (generalmente un 95%) menor que en las plantas control para CMV. Estas plantas no resultaron protegidas al ser infectadas por virus no relacionados como el virus del mosaico de la alfalfa, pero sí hubo una supresión de los síntomas (aunque no fue acompañada por una disminución en la multiplicación viral) cuando las plantas fueron infectadas con un virus relacionado: el TAV ("aspermyvirus" del tomate ).

No se determinó aún el mecanismo por el cual la expresión del RNA satélite reduce la replicación del virus parasitado y/o la severidad de los síntomas. Una posibilidad es que los satélites y los virus parasitados compitan por la maquinaria celular necesaria para la replicación. Otra propuesta es que el RNA satélite tenga actividad de ribozima responsable de la reducción de la multiplicación del virus parasitado por un mecanismo no descrito.

Esta estrategia tiene la ventaja sobre la diseminación de CMV conteniendo RNAs satélites que se practica en China, de que las pérdidas en el rendimiento ocurren luego de la infección natural y por lo tanto serán menores que aquellas en plantas no transgénicas. Del mismo modo, el RNA satélite será transmisible sólo después de una infección natural.

El uso de este sistema para controlar la infección viral es limitado ya que hay pocos virus que tienen satélites. Además, una posible desventaja de la transformación con cDNA satélite es que a pesar de que el RNA satélite es benigno en la planta huésped, podría ser virulento en otras especies o podría mutar a una forma virulenta en la planta huésped, ya que los satélites benignos y los virulentos difieren en unos pocos nucleótidos. Por último, en los casos en que se reducen los síntomas pero no la multiplicación viral, la protección por satélites no impedirá la diseminación del virus (Harrison y col. 1987).

#### C 6. 4) Expresión de la replicasa viral.

Se conoce con detalle la organización genómica del virus del mosaico del tabaco (TMV). Sin embargo todavía no se ha determinado la naturaleza exacta de la replicasa, enzima responsable de la síntesis de RNA genómico y subgenómico. Generalmente se acepta que este virus codifica para 4 proteínas; dos de ellas se traducen a partir del RNA viral y las otras dos a partir de sendos RNAs subgenómicos. El extremo 5' del RNA genómico codifica para dos proteínas de 126 y 183 kDa, que se consideran parte de la replicasa viral (Golemboski y col. 1990). Estas dos proteínas se inician en el mismo sitio y la más larga se produce por cambio de fase de lectura ("readthrough") del codón de terminación de la más corta. Golemboski y col. (1990) sostienen

que hay además otra proteína de 54 kDa que está codificada en la parte del gen de la proteína de 183 kDa que no se comparte con la proteína de 126 kDa (desde la posición 3472 hasta la 4919). La principal evidencia de la existencia de esta proteína es el descubrimiento de un tercer subgenómico llamado I RNA cuyo extremo 5' fue mapeado en la posición 3405. Este subgenómico contiene un marco abierto de lectura para una proteína de 54 kDa que comenzaría en un codón de iniciación en la posición 3495. Sin embargo no se halló a esta proteína en tejidos infectados. Con el objeto de atribuir una función a esta proteína de 54 kDa, Golemboski y col. (1990) obtuvieron plantas de tabaco transgénicas que expresaban esta proteína de la cepa U1 de TMV. Las plantas transgénicas no presentaron síntomas ni permitieron la multiplicación viral, cuando fueron desafiadas con inóculos de 500 µg/ml de la misma cepa de TMV o 300 µg/ml de RNA viral (los más altos testados). No se detectó a la proteína en las plantas transgénicas. No se observó resistencia frente a la infección con las cepas U2 o L de TMV o frente a la infección por CMV. Experimentos preliminares con plantas transgénicas que expresaban un antimensajero de esta proteína, no mostraron resistencia. Si bien en este trabajo no se hicieron experimentos comparativos, en reportes anteriores Powell-Abel y col. (1986), encontraron que 4 de 7 plantas transgénicas para la cápside de TMV mostraban signos de infección cuando eran inoculadas con 0,5 µg/ml de TMV. Esta fue la primer evidencia de que una proteína no estructural podía conferir resistencia a la multiplicación viral.

Recientemente Braun y col. (1992) informaron que plantas transgénicas para el gen de la replicasa de PVX eran resistentes a la infección por ese virus. Se cree que el ORF 1 codifica para la replicasa viral ya que contiene varios dominios conservados que están presentes en otras RNA polimerasas RNA dependientes. En este trabajo se encontró que tanto las plantas que expresaban el ORF 1 completo como las que expresaban la secuencia 5' NC y los primeros 674 codones del ORF 1 eran altamente resistentes a la infección por PVX. Plantas que expresaban el tercer y cuarto cuarto del ORF 1, que contenían un motivo de unión a NTP y un motivo Gly-Asp-Asp que participa en la función catalítica de la replicasa respectivamente, no fueron protegidas frente a la infección por PVX. Las plantas resistentes presentaron menor número de lesiones locales y una menor acumulación de virus en la hoja inoculada y en las hojas que estaban por encima del sitio de inoculación. La planta más resistente por expresión del ORF 1 fue significativamente más resistente en cuanto a reducción del número de lesiones y multiplicación viral que la planta más resistente por expresión de proteína de cápside, usando tanto PVX (5 µg/ml) como RNA PVX (5 µg/ml) como inóculo viral. No hubo correlación entre los niveles de expresión y el grado de protección. Este proceso, si bien es conocido es poco comprendido (Lawson y col. 1990). Al igual que en el trabajo anterior, no se pudo detectar la proteína. Dado que el mRNA del ORF 1 es estable y que este RNA una vez traducido *in vitro* produce un polipéptido del tamaño correcto, los autores suponen que la proteína está presente pero en niveles por debajo del límite



de detección (0,002% de las proteínas extraíbles totales). También existe la posibilidad de que la proteína no sea estable en las plantas transgénicas (por la falta de alguna proteína viral o una secuencia estabilizadora en el genoma viral, o debido a una respuesta en el huésped que reduzca los niveles de esta proteína). Es importante determinar si la proteína (aún en concentraciones bajas) o el RNA son responsables de la resistencia.

Para asegurar la existencia del huésped y del patógeno, tanto las plantas como los virus que las infectan tienen varios mecanismos biológicos para controlar o regular el grado de la infección. Por ejemplo el bacteriófago R17CP autorregula la expresión de la replicasa uniéndose al templado y por lo tanto impidiendo la subsiguiente traducción de esta proteína (Bernardi y col. 1972). Kiho y col. (1984) observaron un control similar en su estudio de una cepa atenuada de TMV. La infección con esta cepa protege frente a infecciones posteriores de TMV. El virus atenuado se replica normalmente durante 4 días y luego su replicación se detiene. A este fenómeno se lo llamo autorregulación y se propone que es debido a la sobreproducción de la replicasa de 183 kDa. Basándose en esto, Braun y col. (1992), propusieron que la expresión constitutiva del ORF 1 de PVX en plantas transgénicas podría interferir con la infección viral por alguno de los siguientes mecanismos:

- \* Una concentración anormalmente alta de la proteína codificada por el ORF 1 podría contrarrestar a un inhibidor de autorregulación.
- \* La proteína codificada por el ORF 1 podría unirse al RNA viral e inhibir o la transcripción de otro gen viral o el empaquetamiento del RNA viral.
- \* La sobreproducción de esta proteína podría titular factores del huésped que normalmente participan en el complejo de replicación viral. También existe la posibilidad de que la replicasa que expresan estas plantas no sea la forma más activa posible (el clon usado tiene una infectividad del 0,2% con respecto a la del RNA viral completo).
- \* Se podrían formar híbridos RNA-RNA entre el RNA codificado en el transgén y el RNA viral negativo que afecten dramáticamente la replicación. En este caso la molécula responsable de conferir resistencia a PVX es el RNA y no la proteína codificada por el ORF 1.

#### C 6. 5) Expresión de la nucleocápside:

El virus del marchitamiento moteado del tomate pertenece al grupo de los Tospovirus. De manera similar a los Bunyavirus animales posee una envoltura lipídica con espículas de glicoproteínas protruyentes. Su genoma es tripartito de polaridad negativa. Recientemente dos grupos (Gielen y col. 1991; MacKenzie y col. 1992) obtuvieron plantas de tabaco transgénicas que expresaban la nucleoproteína viral bajo el control del promotor de 35S. Usando una construcción en la que el ATG y el marco de lectura del gen de la nucleoproteína estaban

alterados por mutagénesis dirigida, de Haan y col. (1992), demostraron que la resistencia se debe a la presencia de RNA (+) de la nucleoproteína y no a la nucleoproteína por sí misma. Las plantas fueron resistentes a la inoculación mediada por el vector natural más importante, *Frankliniella occidentalis* (Perg). No mostraron resistencia a otros tospovirus que comparten, sin embargo, un 80% de homología nucleotídica. Los autores propusieron que la multiplicación viral estaría impedida por interacción RNA-RNA. Alternativamente (o además) el RNA antisentido podría competir por factores virales o del huésped, como por ejemplo factores requeridos para la replicación viral.

### **C 7) Objetivo:**

Obtención de plantas de papa de un cultivar de uso local (Huinkul-MAG) resistentes a la infección por el virus del enrollamiento de la hoja (PLRV) por expresión de la proteína de cápside viral.

Para ello es necesario poner a punto la técnica de transformación de papa por *Agrobacterium tumefaciens* para este cultivar y, por otro lado, clonar el gen de cápside de PLRV y construir un vector adecuado para la transformación.

## **D) OBTENCIÓN DE PLANTAS DE PAPA RESISTENTES A INSECTOS POR EXPRESIÓN DE LA DELTA-ENTOMOTOXINA DE *BACILLUS THURINGIENSIS*:**

### **D 1) Introducción:**

La agricultura moderna utiliza una amplia variedad de insecticidas, la mayoría de los cuales son sintetizados químicamente. Desde hace aproximadamente 35 años se utilizan además bioinsecticidas comerciales basados en la toxina producida por *Bacillus thuringiensis*. La actividad insecticida de estos compuestos reside en cuerpos de inclusión cristalinos que se producen durante la esporulación de la bacteria, compuestos de proteínas llamadas delta entomotoxinas, que son tóxicas para una gran variedad de insectos. Los cristales se disuelven en las condiciones alcalinas del intestino del insecto liberándose proteínas de entre 27 y 140 kDa que a su vez son clivadas por proteasas intestinales dando lugar a fragmentos tóxicos pequeños. Estos fragmentos se unen a sitios receptores altamente específicos en el epitelio intestinal, generando poros. Se rompe el balance osmótico y se produce lisis celular.

Entre las ventajas de las toxinas de BT sobre los insecticidas químicos se encuentran;

- 1) Son altamente específicos, por lo que mediante su uso se pueden controlar determinadas plagas sin afectar a otras especies.
- 2) Su bajo costo de desarrollo.
- 3) Su carencia de efectos perjudiciales sobre otros animales (mamíferos , aves), sobre los operarios en el campo, los consumidores y el medio ambiente.
- 4) No es necesario un período de carencia permitiendo su uso poco antes de la cosecha.

La aplicación de estos productos comerciales tiene sin embargo dos características que limitan su uso:

- 1) Son inestables a campo por lo que son necesarios varios tratamientos al año. Asimismo no se pueden almacenar durante largo tiempo.
- 2) Dependiendo del tipo de plaga que se desee controlar, pueden no ser efectivos aún contra insectos sensibles a la toxina. Tal es el caso de las polillas del tomate y de la papa (*Scabipalpuloides absoluta* (Meyrick) y *Phthorimaea operculella* (Zeller)) que son microlepidópteros minadores. Dado que se alimentan de mesófilo, y que las esporas de la bacteria quedan sobre la epidermis (el producto no tiene poder de penetración), las larvas no las ingieren y, por lo tanto, no son afectadas.
- 3) El uso de estos bioinsecticidas es un problema en países como Japón donde la liberación masiva de esporas es una amenaza para la industria textil que se vale del gusano de la seda, que es sensible a BT.

4) La presencia de esporas en las formulaciones es un inconveniente para la comercialización de los productos basados en bacterias recombinantes dado que introducen consideraciones adicionales en cuanto a la seguridad ambiental.

Como contrapartida, la producción de plantas transgénicas que expresen la toxina de *Bacillus thuringiensis* es una alternativa válida e interesante para obtener plantas resistentes a insectos.

## **D 2) La toxina de BT como insecticida biológico.**

Históricamente, las cepas de BT han sido clasificadas en base al antígeno flagelar (o antígeno H) de las células vegetativas en 34 subespecies. Recientemente las toxinas de BT se han clasificado por su estructura, antigenicidad y espectro de actividad insecticida en los grupos: Cry I, Cry II, Cry III y CryIV, específicos contra Lepidópteros, Lepidópteros y Dípteros, Coleópteros y Dípteros respectivamente.

El dominio tóxico ha sido localizado en la mitad amino terminal de la protoxina. Así, el gen *bt2* de *Bacillus thuringiensis* subesp. Berliner 1715, codifica para 1155 aminoácidos; el fragmento más pequeño capaz de retener completamente la toxicidad corresponde a los primeros 607 aminoácidos (Vaeck y col. 1987). Lambert y col. (1992) estiman que hay alrededor de 4000 cepas de BT aisladas, la mayoría de las cuales forman parte de colecciones privadas. Muchos de estos aislamientos producen varias toxinas diferentes.

Se estima que las ventas de insecticidas ascienden a unos 6 billones de dólares anuales en el mundo. Los productos basados en BT dan cuenta de 100 millones anuales (o sea aproximadamente el 1,6% del total). El 57,2% de estos u\$s 100 millones corresponden a Norteamérica, el 24% a Asia oriental y el 8,1 % a Centro y Sudamérica (Lambert y col. 1992). Estos productos comerciales se aplican a razón de 10 a 50 gr/acre ( $10^{20}$  molec/acre) y son 300 veces más potentes que los piretroides sintéticos ( $3 \times 10^{22}$  molec/acre) y 80.000 veces más que los organofosforados ( $8 \times 10^{24}$  molec/acre).

La primer toxina de BT fue clonada en 1981 a partir de la subespecie *kurstaki* HD-1-Dipel por Schnepf y col. (1981).

## **D 3) Plantas insecticidas.**

La primer planta transgénica para el gen de la toxina de *Bacillus thuringiensis* fue obtenida por Vaeck y col en 1987. A partir de allí, se han obtenido plantas de tomate (Fischhoff y col 1987; Barton y col 1987; Delannay y col. 1989), algodón (Perlak y col. 1990; Wilson y col. 1992) y papa (Peferoen y col. 1990) resistentes a insectos como gusano del capullo, taladrador europeo del maíz y escarabajo de la papa de Colorado.

En los primeros trabajos, se intentó expresar el gen que codifica para la toxina de BT completo. Vaeck y col. (1987), hallaron que la expresión la proteína completa era 10 veces menor que la expresión del fragmento tóxico solamente (los primeros 607 aminoácidos). Barton y col. (1987), observaron que callos que expresaban la toxina completa, se tornaban necróticos y morfan, por lo que concluyeron que la expresión de la endotoxina de BT era letal a las células de la planta. Todos los trabajos posteriores trabajaron entonces con el gen de la toxina truncado.

Las principales plagas del algodón (*Heliothis zea*: gusano del capullo de algodón o gusano de la fruta de tomate; *Heliothis virescens*: gusano de los brotes de tabaco; *Pectinophora gossypiella*: lagarta rosada), son menos sensibles a la toxina de BT que otras plagas. Esto trajo como consecuencia que se hicieran varios intentos para mejorar los niveles de expresión de la toxina de BT en este cultivo. Perlak y col. (1990) introdujeron mutaciones en el gen de manera de modificar el uso de codones de este gen bacteriano y hacerlo así más parecido al uso de codones en plantas. También introdujeron cambios en regiones con presunto rol regulatorio y en regiones de manera tal de eliminar estructuras secundarias del mRNA.

En la tabla 2 se listan los trabajos publicados hasta el momento.

Tabla 2:

| autores        | especie trasnf. | especie controlada                                                                           | construcción utilizada                                  |
|----------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Vaeck 1987     | tabaco          | <i>Manduca sexta</i>                                                                         | PTR2': gen truncado de subesp. Berliner 1715.           |
| Barton 1987    | tabaco          | <i>Heliotis zea</i><br><i>Heliotis virescens</i><br><i>Spodoptera exigua</i>                 | P35S: gen truncado* de subesp. Kurstaki.                |
| Fischhoff 1987 | tomate          | <i>Manduca sexta</i><br><i>Heliotis virescens</i><br><i>Heliotis zea</i>                     | P35S: gen truncado* de subesp. Kurstaki.                |
| Delannay 1989  | tomate a campo  | <i>Manduca sexta</i><br><i>Heliotis zea</i><br><i>Keiferia lycopersicella</i>                | MAS: gen truncado* de subesp. Kurstaki.                 |
| Perlak 1990    | algodón         | <i>Trichoplusia ni</i><br><i>Spodoptera exigua</i><br><i>Heliotis zea</i>                    | P35S: gen truncado* y modificado** de subesp. Kurstaki. |
| Peferoen 1990  | papa            | <i>Manduca sexta</i><br><i>Phyhorimaea operculella</i>                                       | PTR2': gen truncado* de subesp. Kurstaki.               |
| Wilson 1992    | algodón a campo | <i>Pectinophora gossypiella</i><br><i>Bucculatrix thurberiella</i><br><i>Estigmene acrea</i> | P35S: gen truncado* y modificado** de subesp. Kurstaki. |
| Koziel 1993    | maíz a campo    | <i>Ostrinia nubilalis</i>                                                                    | P35S: gen truncado* y modificado** de subesp. Kurstaki. |

P35S: promotor del transcripto de 35S del virus del mosaico del coliflor.

MAS: promotor de la manopina sintetasa.

PTR2': promotor del gen 2' de TR DNA.

\* Incluye la porción N-terminal tóxica: entre los aa 1 y 612, 610 ó 645 según el caso.

\*\* Las modificaciones no afectaron la secuencia de aa. Incluyeron alteraciones en el uso de codones, cambios en regiones con presunto rol regulatorio y en regiones de manera tal de eliminar estructuras secundarias del mRNA.

Ventajas del sistema:

- a) Protección en zonas donde el insecticida no llega como raíces, tubérculos, hojas poco accesibles, brotes surgidos luego de la aplicación del insecticida.
- b) La toxina está siempre presente en el cultivo; el agricultor se independiza de los costos de fumigación (que en casos como el algodón donde se requieren varios tratamientos por cosecha estos costos igualan al costo del insecticida en sí), y de tener que relevar el campo para determinar el momento apropiado para fumigar.

Entre las limitaciones del sistema se encuentran:

- 1) Lograr niveles de expresión suficientes para matar rápidamente a las larvas. La búsqueda y caracterización de nuevos promotores ayudará a superar este inconveniente.
- 2) Posibilidad de que la selección de insectos resistentes se vea facilitada por una mayor presión selectiva que hasta el presente.
- 3) Restricciones en la liberación de organismos modificados por ingeniería genética al ambiente. En muchos países es lenta y engorrosa. Muchos países carecen de legislación.

La selección de insectos resistentes a insecticidas es uno de los más grandes problemas de la agricultura. En la actualidad existen más de 500 especies de insectos resistentes a insecticidas sintéticos. Durante mucho tiempo se pensó que la posibilidad de que aparezcan insectos resistentes a la toxina de BT era remota. En ese tiempo se creía que el mecanismo de acción de la toxina era más complicado de lo que en realidad es. Hoy se sabe que el modo de acción de BT provee varios puntos en los cuales cambios fisiológicos o de comportamiento podrían dar lugar a resistencia. Se han identificado 8 especies que adquirieron resistencia a BT. En *Plodia interpunctella* y *Plutella xylostella* la resistencia se debe a cambios en la afinidad de los sitios de unión de la toxina en el intestino del insecto. En otros casos no se determinaron las causas de la resistencia pero podrían deberse a cambios en el pH intestinal o en enzimas que afecten la disolución y activación del cristal en fragmentos tóxicos más pequeños.

Dado el lento desarrollo de insecticidas sintéticos la administración cuidadosa de las toxinas de BT es muy importante.

La administración de la resistencia es un esfuerzo para prevenir o retrasar la adaptación de insectos a insecticidas o a los mecanismos de defensa de las plantas. Puede verse como administración de un recurso genético igual que otros recursos renovables como el suelo, agua, minerales o bosques, salvo que el objeto de la conservación son los genes o alelos de susceptibilidad.

El desarrollo de plantas transgénicas es una nueva manera de presentar la toxina a las larvas de los insectos. Tiene mucho en común con el control de plagas a través de métodos de cruzamiento tradicionales para desarrollar plantas resistentes. A pesar de que éste es un método aceptado para

proteger cultivos de insectos, se necesitan desarrollar estrategias adecuadas para conservar y prolongar los beneficios de tales plantas resistentes.

Las estrategias propuestas ( McGaughey y col. 1992) incluyen:

- 1) Rotación entre toxinas de BT y otras toxinas, insecticidas o estrategias de control. Este enfoque apunta a la restauración de la susceptibilidad cuando la presión de selección es discontinua; asume que la adquisición de resistencia conlleva un costo adaptativo y que en cuanto se reduzca la presión de selección, habrá una reversión hacia susceptibilidad.
- 2) Uso de mezcla de toxinas. En general la resistencia es más durable. El uso de mezclas no es necesariamente mejor que el uso secuencial de dos toxinas o la mezcla de individuos que expresan dos toxinas distintas (una cada uno) o la rotación entre plantas que expresan distintas toxinas. La resistencia cruzada entre distintas toxinas de BT podría reducir la factibilidad de que la mezcla de toxinas logre retrasar la aparición de resistencia a la toxina. Sin embargo se han detectado varios casos en los que hay heterogeneidad en los sitios de unión de las distintas toxinas al intestino de diferentes especies de insectos. En estos casos, el uso de mezclas de toxinas, sería una herramienta eficiente.
- 3) Desarrollo y mantenimiento de refugios para asegurar la supervivencia de los insectos susceptibles. La mezcla de plantas transgénicas resistentes con plantas susceptibles es una alternativa para insectos poco móviles.

#### **D 4) Insectos minadores.**

Las especies de polillas que afectan a la papa pertenecen a la familia Gelechiidae (Lepidóptera). De las tres especies que se conocen, *Phthorimaea operculella* (Zeller) es de distribución cosmopolita; *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick) está circunscrita a los países del sur de América del Sur y *Scrobipalopsis solanivora* (Povolny) ha sido reportada en Guatemala y Costa Rica.

*Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick) ataca principalmente a tomate (polilla del tomate) y constituye uno de los problemas fitosanitarios más serios de este cultivo en Chile (Ripa 1981; Larraín y col. 1986) y Argentina. Desde 1981 se detectó también en Brasil (Moraes y col. 1982). Los adultos colocan los huevos individualmente tanto en el haz como en el envés de la hoja. Al eclosionar, las larvas se introducen en la hoja elaborando galerías que se extienden en área y longitud a medida que el insecto se alimenta y crece. En un comienzo se nota una pequeña mancha que se alarga conformando a menudo minas del tipo "serpentina". Con el tiempo siguen agrandándose hasta abarcar gran parte del folíolo: se forman así minas del tipo "lacunar". En los ataques intensos todo el tejido parenquimático de la hoja puede desaparecer, quedando



sólo restos de nervadura, de ambas epidermis (superior e inferior) y acumulaciones de excrementos, especialmente en los orificios de entrada y salida de la galería (Vargas 1970). En ensayos a campo, Ripa (1981) observó que los productos comerciales Biotrol Xk® y Biotrol plus®, que contienen esporas de la subespecie Berliner de BT no tuvieron efecto significativo sobre larvas de *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick) que infectaron plantas de tomate. También en ensayos a campo, Moore (1984) demostró que la aplicación de el producto comercial Dipel®, que contiene esporas de la subespecie Kurstaki IID-Dipel de *Bacillus thuringiensis*, no presentaba efectos significativos en cuanto al daño foliar producido y al número de larvas de *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick) encontradas en plantas de tomate.

#### **D 5) Objetivo:**

El objetivo de esta parte es demostrar que la expresión de la toxina de *Bacillus thuringiensis* (BT) es un método efectivo para controlar la infección de papa con larvas de la polilla del tomate, *Scrobipalpuloides absoluta*, (Meyrick), que causa serias pérdidas económicas en tomate. Debido al hábito alimenticio de la larva y al modo de acción de los insecticidas como el Dipel® basados en BT, este Lepidóptero minador de hoja, no puede ser controlado por este tipo de productos muy usados para controlar otros insectos (especialmente Lepidópteros).

## **E) OBTENCIÓN DE PLANTAS DE PAPA RESISTENTES A HERBICIDAS POR EXPRESIÓN DEL GEN *BAR*:**

### **E 1) Introducción:**

El uso de herbicidas para reducir las pérdidas en el rendimiento de cultivos debido al crecimiento de malezas, es una práctica común en la agricultura. Como consecuencia, hay una continua búsqueda de herbicidas nuevos que sean inocuos para los animales, el hombre y el medio ambiente.

La dificultad reside en que en general los herbicidas son totales, es decir "no distinguen" entre malezas y el cultivo deseado. La obtención de plantas transgénicas resistentes a herbicidas, se mostró como una herramienta útil en la solución de este problema.

Hay 3 estrategias principales para la obtención de plantas resistentes a herbicidas:

- a) Plantas transgénicas que expresen formas mutadas de la proteína blanco del herbicida, de manera que esta proteína siga activa para realizar su función específica pero sea insensible al herbicida. De esta manera se han obtenido plantas productoras de una forma alterada de la enzima acetolactato sintetasa, las que resultaron resistentes a sulfonilurea e imidazolinona (Chaleff y col. 1985; Shaner y col. 1985). Otro ejemplo del uso de esta estrategia es la obtención de plantas de tabaco transgénicas para una forma mutada del gen *aro A* (que codifica para una enzima que interviene en la síntesis de aa aromáticos), que mostraron ser tolerantes al herbicida glifosato (que se vende comercialmente como Roundup®) (Comai y col. 1985).
- b) Plantas transgénicas que sobreproduzcan la proteína blanco del herbicida. Se ha demostrado que la sobreproducción de la enzima codificada por el gen *aro A* confiere tolerancia al glifosato a plantas de petunia (Shah y col. 1986).
- c) Plantas transgénicas que expresen una enzima capaz de inactivar al herbicida.

Fosfinotricina y Bialaphos son herbicidas totales de gran potencia con perspectivas de ser ampliamente utilizados.

La fosfinotricina (PPT) es un análogo del ácido L-glutámico y, por lo tanto, es un fuerte inhibidor de la glutamina sintetasa (GS). Esta enzima juega un rol central en la asimilación de amonio y en la regulación del metabolismo del nitrógeno en plantas. Es la única enzima capaz de detoxificar el amonio liberado por la reducción de nitratos, degradación de aminoácidos, fijación simbiótica de N<sub>2</sub> y fotorespiración. La inhibición de la GS por la fosfinotricina causa una rápida acumulación de amonio, lo cual conduce a la muerte celular. La fosfinotricina es sintetizada químicamente y se vende comercialmente como "Basta®", Hoechst AG., Alemania.

El Bialaphos consiste en PPT unido a dos residuos de L-alanina. Estos residuos son removidos por peptidasas endógenas, liberándose PPT. Es producido por *Streptomyces hygroscopicus* por fermentación. Se vende comercialmente como "Herbiace@", Meiji Seika Ltd., Japón.

Normalmente se aplican entre 2,5 y 7,5 l/ha de estos productos para el control de malezas a campo (De Block y col. 1987).

*Streptomyces hygroscopicus* produce varios antibióticos además de Bialaphos. Esta bacteria ha desarrollado una serie de mecanismos para evitar la toxicidad de sus propios productos. Entre ellos está la producción de fosfinotricina acetil transferasa (PAT), enzima que acetila el grupo amino libre de la fosfinotricina, inactivándola. El gen *bar* que codifica para esta enzima fue clonado por primera vez por Murakami y col. en 1986. Su utilización en plantas pertenece a la estrategia c) de las antes mencionadas.

Hasta el momento se han obtenido plantas de tabaco y papa (De Greef y col. 1989), alfalfa (D'Halluin y col. 1990) y remolacha (D'Halluin y col. 1992) resistentes a fosfinotricina por expresión del gen *bar*.

Como ya se mencionó, hay una continua búsqueda de marcadores de selección útiles en plantas. Si se desea introducir más de un gen en una planta, lo más simple es hacer una retransformación de una planta ya transformada. Esto obviamente requiere el uso de dos marcadores de selección independientes. La fosfinotricina acetil transferasa codificada por el gen *bar* ha sido usada como marcador de selección en protoplastos de papa de los cultivares europeos Bintje y Désirée (De Block y col. 1987). Un objetivo adicional de la obtención de plantas de papa del cultivar Huinkul-MAG transgénicas para el gen *bar* es la evaluación de esta enzima como marcadora de selección en este cultivar de interés.

## **E 2) Objetivo:**

Con el objeto de poner a punto la utilización de marcadores de selección alternativos a los aminoglucósidos para la transformación de cultivares locales de papa y por la importancia *per se* de obtener plantas resistentes a herbicidas en un cultivo de características intensivas con problemas de malezas como es la papa se transformaron plantas con un gen capaz de conferir resistencia al herbicida total fosfinotricina.

# Materiales y Métodos

### **1) Reactivos:**

Salvo indicación todos los reactivos fueron de Sigma Chemical Co., Aldrich, Fluka o Gibco-BRL. Las enzimas de modificación del DNA, de New England Biolabs, Gibco-BRL, Promega Biotech o de LKB-Pharmacia. Las membranas de nitrocelulosa (BA 83) ó de Nylon (Nytran 0.45), de Schleicher & Schuell. Los radioisótopos, de New England Nuclear.

### **2) Genotipos vegetales empleados:**

Las plantas de *Solanum tuberosum* cv. Huinkul-MAG y Spunta fueron suministradas por el Ing. Agr. Osvaldo Lucarini *in vitro* y fueron micropropagados como se indica. Huinkul-MAG es un cultivar desarrollado por lo que fue después el programa de mejoramiento del INTA-Balcarce. Se trata de una papa redondeada que fue muy cultivada en el pasado y aún es la segunda en importancia en Argentina. Es apreciada por su mayor calidad respecto al cultivar Spunta. Este último es de origen holandés y es el de mayor importancia en la Argentina. El cultivar Alpha es el de mayor importancia en México y fue suministrado por la Dra. Aileen O'Connor (CINVESTAV-Irapuato, México).

Las plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas con el vector pMON9749 fueron suministradas por el Dr. Luis Herrera Estrella (CINVESTAV-Irapuato, México).

Las plantas de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi fueron suministradas por la Dra. Silvia Cabral, INGBI-CONICET.

Los tubérculos de *Solanum tuberosum* cv. Spunta fueron suministrados por la empresa Diagnósticos Vegetales, Mar del Plata, y por el Ing. I. Butzonitch, INTA-Balcarce.

### **3) Transformación de papa:**

#### **3. 1) Condiciones de crecimiento de las plantas micropropagadas:**

El cultivar Huinkul-MAG de *Solanum tuberosum* se micropropagó en el medio PS (Tendille y col. 1974) cuya composición se detalla en la tabla 3, suplementado con las vitaminas de Murashige-Skoog (MS, Murashige-Skoog 1962). Se utilizaron tubos de vidrio de 2,5 cm de diámetro y 15 cm de largo. Se cultivaron en cámaras de crfa reguladas a 22 °C bajo un fotoperíodo de 16 hs luz (5000 lux) - 8 hs oscuridad.

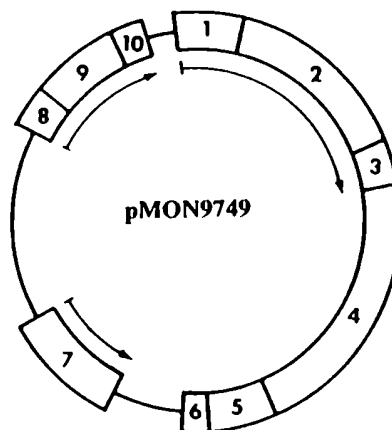
Los cultivares Alpha y Spunta de *Solanum tuberosum* se micropropagaron en el medio MSS (Murashige-Skoog con sacarosa, ver tabla 3) suplementado con las vitaminas de MS, en las mismas condiciones que las plantas del cultivar Huinkul-MAG.

La variedad Xanthi de *Nicotiana tabacum* se micropropagó en medio MSS suplementado con las vitaminas MS, en Magentas® de Sigma. Las plantas se cultivaron en un cuarto de cultivo a 25 °C, sometidas a un fotoperfodo de 16 hs luz-8 hs oscuridad.

Las plantas de tabaco transformadas con el vector pMON9749 se micropropagaron en Magentas® de Sigma en medio MSS, suplementado con vitaminas MS y cefotaxime 500 µg/ml, ampicilina 100 µg/ml y kanamicina 100 µg/ml, bajo las mismas condiciones que el tabaco sin transformar.

El mapa del vector pMON9749 se muestra en la siguiente figura.

Figura 4:



1) Promotor del transcripto 35S del virus del mosaico del coliflor (P35S). 2) gen *uid A* (codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa). 3) terminador. 4) zona de homología con el plásmido Ti. 5) origen de replicación de pBR322. 6) borde derecho. 7) gen que codifica para la espectinomicina / estreptomycin adenosil transferasa (confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycin) del transposón Tn7. 8) Promotor NOS (nopalina sintetasa). 9) gen *neo* (codifica para la neomicina fosfotransferasa). 10) terminador NOS.

**Tabla 3:**

| COMPUESTO                            | PS ( mg/l ) | MSS (mg/l)  |
|--------------------------------------|-------------|-------------|
| <b>*Macroclementos</b>               |             |             |
| NH <sub>4</sub> N03                  | 536         | 1650        |
| KN03                                 | 2690        | 1900        |
| KH <sub>2</sub> P04                  | 274         | 170         |
| MgS04. 7H <sub>2</sub> O             | 419         | 370         |
| MgS04 (anhidro)                      | no contiene | 180,7       |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | no contiene | 440         |
| KCl                                  | 350         | no contiene |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>    | 300         | no contiene |

| COMPUESTO                               | PS ( mg/l ) | MSS (mg/l) |
|-----------------------------------------|-------------|------------|
| <b>*Microelementos:</b>                 |             |            |
| H <sub>3</sub> B03                      | 6,2         | 6,2        |
| MnS04. H <sub>2</sub> O                 | 22,3        | 16,9       |
| ZnS04. 7H <sub>2</sub> O                | 8,6         | 8,6        |
| KI                                      | 0,83        | 0,83       |
| Na <sub>2</sub> Mo04. 2H <sub>2</sub> O | 0,25        | 0,25       |
| CuS04. 5H <sub>2</sub> O                | 0,025       | 0,025      |
| CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O   | 0,025       | 0,025      |

|                                         |    |      |
|-----------------------------------------|----|------|
| <b>*Fe-EDTA:</b>                        |    |      |
| Na <sub>2</sub> EDTA. 2H <sub>2</sub> O | 37 | 37,3 |
| FeS04. 2H <sub>2</sub> O                | 28 | 27,8 |

|                  |        |        |
|------------------|--------|--------|
| <b>*Sacarosa</b> | 10 g/l | 20 g/l |
| <b>*Agar</b>     | 6 g/l  | 6 g/l  |

La composición de las vitaminas MS (500 x) es la siguiente:

|               |          |
|---------------|----------|
| Piridoxina    | 250 mg/l |
| Tiamina       | 50 mg/l  |
| Ac nicotínico | 250 mg/l |

### **3. 2) Transformación de discos de hojas de papa por *Agrobacterium*:**

El protocolo utilizado es una modificación del de Rocha - Sosa y col. (1989), según se describe en del Vas y col. (1992).

Las hojas a transformar se obtuvieron de plantas de 4 semanas de edad. Las plantas deben tener buen aspecto general y hojas verde oscuro totalmente extendidas.

Se hirieron las hojas haciendo un corte perpendicular al pecíolo con un bisturí afilado. Se colocaron aproximadamente 14 explantos con el envés hacia arriba en una caja de Petri que contiene 10 ml de medio P líquido con sacarosa 2%.

Se inició el cocultivo, agregando 30 µl de un cultivo de *Agrobacterium* en fase logarítmica tardía. Se incubó a 22 °C, a baja intensidad de luz, durante dos días.

Se colocaron los explantos, por separado, en tubos con sales de MS, glucosa 1% en el caso del cv. Huinkul-MAG ó 1,6% en el caso de los cultivares Alpha ó Spunta, ágar 0,6%, cefotaxime 300 µg/ml, zeatina 2 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml, pH 5,7. Se subcultivaron los explantos en medio fresco cada semana. Al cabo de un mes se redujo la concentración de cefotaxime a 150 µg/ml.

Las hormonas y los antibióticos se añadieron al medio luego de autoclavarlo. La zeatina se disolvió en dimetilsulfóxido.

Cuando se diferenciaron brotes de unos 0,5 cm de alto, se los separó del explanto inicial con bisturí y se los transfirió, individualmente, a tubos con el medio P de micropropagación (en el caso del cv. Huinkul-MAG) o al medio MS de micropropagación (en el caso de los cultivares Alpha ó Spunta). En todos los casos el medio contuvo 150 µg/ml de cefotaxime para evitar la proliferación no deseada de *Agrobacterium* y 50 µg/ml de kanamicina como medio selectivo para plantas transformadas.

### **3.3) Regeneración de plantas de papa a partir de tubérculo :**

Este protocolo es una adaptación del publicado por Hoekema y col. en 1989. Se utilizaron mini tubérculos libres de virus obtenidos en invernadero. Se lavaron exhaustivamente con cepillo y detergente. Se pelaron. Se trataron con alcohol 70% durante un minuto (este tratamiento



favorece la entrada posterior de la lavandina), y luego con hipoclorito de sodio 1,2% y Tween-20 0,1% durante 35 min. Se hicieron 4 lavados de media hora cada uno con un gran volumen de agua estéril. Con la ayuda de un sacabocados de 9 mm de diámetro, se retiró la parte central del tubérculo y se la cortó en rodajas de unos 2 mm de espesor. Se colocaron las rodajas en un medio que contiene las sales y vitaminas de MS, sacarosa 3%, ágar 5,5 g/l pH 5,8, suplementado con dos hormonas, una auxina (ácido indolacético, AIA) y una citoquinina (zeatina). Las concentraciones con las que se trabajó se detallan en Resultados. Se transfirieron los brotes regenerados a un medio de enraizamiento cuya composición se detalla a continuación.

#### Medio de enraizamiento:

\* Macroelementos del medio de Murashige-Skoog diluidos al medio.

\* Vitaminas (mg/l):

|                   |          |
|-------------------|----------|
| Inositol          | 100      |
| Pantotenato de Ca | 1        |
| Biotina           | 0,01     |
| Ac. Nicotínico    | 1        |
| Piridoxina        | 1        |
| Tiamina           | 1        |
| Sacarosa          | 10 gr/l. |
| pH 5,8.           |          |

#### **3.4) Cepas de *Agrobacterium* utilizadas :**

1) Para la puesta a punto de la transformación de Huinkul-MAG se utilizó la cepa GV2260 (Deblacre y col. 1985) de *Agrobacterium tumefaciens* que lleva el vector binario pGUS-int (Vancanneyt y col. 1990) que contiene el gen *uid A* que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) interrumpido por un intrón introducido artificialmente, bajo el control del promotor constitutivo del transcripto de 35S del virus del mosaico del coliflor. Este vector lleva también el gen *neo* que codifica para la neomicina fosfotransferasa (NPTII) bajo el control del promotor de la nopalina sintetasa. El plásmido fue gentilmente cedido por el Dr. L. Willmitzer, Max Planck Institut, Berlín.

2) Para la transformación de la variedad mexicana Alpha de *Solanum tuberosum*, se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (pAL4404) (Hoekema y col. 1983) que lleva el vector pBT1. Se trata de un vector que contiene un fragmento del gen *bt2* que codifica para el extremo NH2-terminal de la toxina de la var. Berliner 1715 de *Bacillus thuringiensis* bajo el control del promotor PTR2' y el gen *neo* (NPT II) que confiere resistencia a kanamicina bajo el control del promotor PTR1'. En la figura 5 se muestra un esquema del vector pBT1. Este vector fue gentilmente cedido por el Dr. A. Mentaberry, INGENI-CONICET.

3) Para la obtención de plantas transgénicas para el gen *bar* se utilizó la cepa LBA4404 (pAL4404) de *Agrobacterium tumefaciens* que lleva el plásmido pGV1040, el cual se muestra en la figura 6. La cepa fue gentilmente cedida por el Ing. Agr. Daniel Moriconi, Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Córdoba.

4) Para la obtención de plantas transgénicas para el gen de cápside de PLRV, se utilizó la cepa LBA4404 (pAL 4404) de *Agrobacterium tumefaciens* que lleva el plásmido pB1cpPLRV cuya construcción se detalla en Resultados.

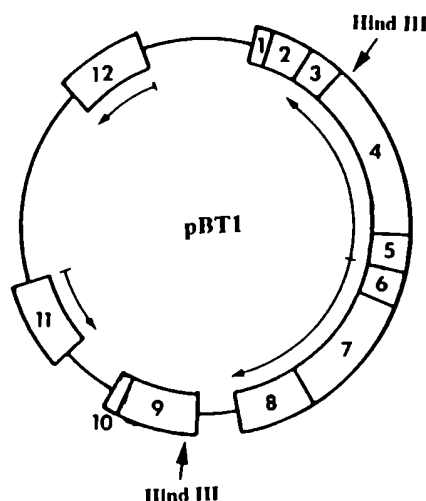
En todos los casos las bacterias se cultivaron a 28 °C con agitación en medio YEB + 2 ml/l de MgSO<sub>4</sub> 1M + antibióticos adecuados durante 24 hs.

La composición del medio YEB es la siguiente:

5 g/l extracto de carne, 1 g/l extracto de levadura, 5 g/l peptona, 5 g/l sacarosa.

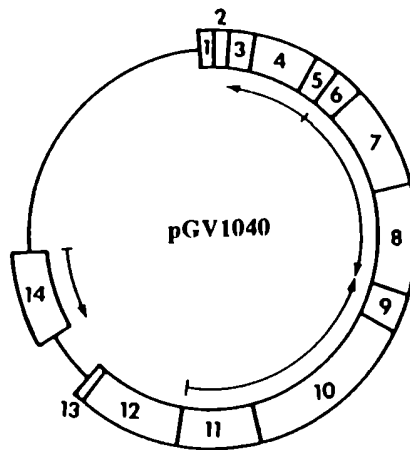
Los tres primeros componentes fueron de la marca Disco.

**Figura 5:**



1) Borde derecho. 2) T-DNA. 3) terminador del gen T7 de pTiA6. 4) gen *bt 884* (codifica para el fragmento tóxico de la entomotoxina de *Bacillus thuringiensis*. 5) PTR2': promotor de la fructopina sintetasa. 6) PTR1': promotor de la manopina sintetasa. 7) gen *neo* (codifica para la neomicina

**Figura 6:**



1) Borde derecho. 2) T-DNA. 3) terminador del gen T7 de pTiA6. 4) gen *bar* (que codifica para la fosfinotricina acetil transferasa 5) PTR2': promotor de la fructopina sintetasa. 6) PTR1': promotor de la manopina sintetasa. 7) gen *neo* (codifica para la neomicina fosfotransferasa). 8) terminador de la octopina sintetasa. 9) terminador de la nopalina sintetasa. 10) gen *uid A* (codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa). 11) promotor del transcripto de 35 S del CaMV. 12) T-DNA. 13) Borde izquierdo. 14) gen que codifica para la espectinomicina/ estreptomicina adenosil transferasa (confiere resistencia a espectinomicina y estreptomicina) del transposón Tn7.

#### **4) Chequeo de las plantas transformadas:**

##### **4.1) Medición de actividad de neomicina fosfotransferasa (NPT II):**

Este protocolo es una adaptación del publicado por McDonnell y col. (1987).

Se congelaron 0.5 g de tejido en nitrógeno líquido y se lo pulverizó en mortero. Se agregaron 150  $\mu$ l de buffer de extracción, se transfirió la mezcla a un tubo Eppendorf y se agitó en un vortex durante 45 seg. Se centrifugó en una microcentrífuga 5 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf. La reacción comenzó al mezclar igual volumen (15 $\mu$ l) de este sobrenadante y de la mezcla de reacción cuya composición se detalla más abajo. Se incubó 30 min a 37 °C y se sembraron 30, 15 y 3  $\mu$ l de la mezcla final en un dispositivo para "dot blot" en el cual se colocó nitrocelulosa encima de una membrana de fosfoclulosa para retener proteínas fosforiladas por fosforilasas endógenas y permitir así que la fosfoclulosa de abajo pueda retener específicamente la neomicina fosforilada durante los 30 min de reacción.

Se bloqueó la membrana en una solución de leche descremada (Molico) 5% (p/v) en buffer fosfato 10 mM pH 7,5, durante 1 h. Se lavó con el mismo buffer fosfato durante 15 min a 65 °C. Se dejó secar a temperatura ambiente y se expuso a película autoradiográfica marca Agfa Curix durante una noche a -70 °C en un cassette en presencia de pantallas intensificadoras (Kodak).

**Buffer de extracción (stock 2x):**

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Glicerol              | 20 %   |
| Tris HCl 0,5 M pH 6,8 | 125 mM |
| β-mercaptoetanol      | 10 %   |
| SDS                   | 0,2 %  |

**Buffer de reacción(stock 5x):**

|                                        |        |
|----------------------------------------|--------|
| Tris-HCl                               | 335 mM |
| MgCl <sub>2</sub>                      | 210 mM |
| NH <sub>4</sub> Cl                     | 2 M    |
| Se titula a pH 7,1 con Ac Maleico 1 M. |        |

**Mezcla de reacción:**

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| Buffer de reacción 1x           | 4936 µl |
| ATP (stock 10 mM)               | 5 µl    |
| <sup>32</sup> P-ATP (10 µCi/µl) | 1,5 µl  |
| Neomicina (stock 22 mM)         | 7 µl    |
| NaF (stock 1M)                  | 50 µl   |
|                                 | <hr/>   |
|                                 | 5000 µl |

**4.2) Determinación de la actividad βglucuronidasa (GUS):**

**Sobre hoja:**

Se fijó el tejido con formaldehído 0,3 % en manitol 0,3 M, MES 10 mM pH 5,6 durante 45 min a temperatura ambiente. Se realizaron varios lavados con buffer fosfato 50 mM pH 7. Se colocó la hoja en una dilución 1:100 del stock de X-Glu (5 mg X-Glu: ac. 5-Br-4-Cl-3 indolil β-D-

glucunónico/100 µl de dimetilformamida) en buffer fosfato 50 mM. Se incubó durante una noche a 37 °C.

#### Sobre raíz:

Se colocaron los ápices de las raíces cuidando de no dañarlos durante la manipulación (se trabajó bajo lupa) en la solución de X-Glu (igual concentración final que en el protocolo anterior). Se incubó toda la noche a 37 °C.

### **4.3) Extracción de DNA:**

Este protocolo se basa en el publicado por Rogers y col. (1985). Se pulverizó el tejido en un mortero, con nitrógeno líquido. Se agregó 1 µl de buffer de extracción por mg de tejido fresco. Se calentó a 65 °C por 3 min. Se transfirió a un tubo y se añadió 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v). Se mezcló exhaustivamente. Se centrifugó a 11.000 xg por 30 seg y se transfirió la fase acuosa a otro tubo. Se midió el volumen con una pipeta y se agregó 1/5 de volumen de CTAB 5% (bromuro de cetiltrimetilamonio), previamente calentado a 65 °C. Se hizo una segunda extracción con cloroformo:alcohol isoamílico. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se precipitó con 1 volumen de buffer de precipitación. Se mezcló suavemente. Se centrifugó a 12.000 rpm por 10 seg para precipitados fibrosos ó 60 seg para precipitados finos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en buffer TE de alta sal. Se calentó a 65 °C para facilitar la rehidratación. Se precipitó el DNA añadiendo dos volúmenes de etanol.

#### Buffer de extracción:

|                                       |       |
|---------------------------------------|-------|
| CTAB (p/v)                            | 2%    |
| Tris-HCl pH 8                         | 100mM |
| EDTA pH 8                             | 20mM  |
| NaCl                                  | 1,4M  |
| PVP (Polivinilpirrolidona, PM 40.000) | 1%    |

#### CTAB 5%:

|      |       |
|------|-------|
| CTAB | 5%    |
| NaCl | 0,35M |

#### Buffer de precipitación:

|               |      |
|---------------|------|
| CTAB          | 1%   |
| Tris-HCl pH 8 | 50mM |
| EDTA pH 8     | 10mM |

#### TE de alta sal :

|               |      |
|---------------|------|
| Tris-HCl pH 8 | 10mM |
| EDTA pH 8     | 1mM  |
| NaCl          | 1M   |

#### **4.4) Restricción de DNA:**

Se restringieron 20 µg de DNA con 60 U de Hind III en un volumen final de 100 µl durante 5 hs a 37 °C. Se precipitó el DNA con acetato de NH<sub>4</sub> y etanol (Maniatis y col. 1989). Se lavó el precipitado con etanol 70 % y se resuspendió en 25 µl de TE.

#### **4.5) Southern blot:**

Se corrió el DNA en un gel de agarosa 0,8% durante aproximadamente 18 h a 20 volts. Una vez finalizada la corrida, se desnaturalizó el DNA sumergiendo al gel en una solución de NaOH 0,2 M - NaCl 1,5 M durante 30 min con agitación suave. Se neutralizó el DNA sumergiendo al gel en una solución de Tris-HCl 1 M - NaCl 1 M durante 30 min con agitación suave. Se transfirió a una membrana de Nylon (Nytran de Schleicher & Schuell) según Maniatis y col. (1989) Se fijó mediante 10 min de exposición a luz UV (sobre un transiluminador) y 30 min de horneado a 80 °C entre dos hojas de papel Whatman 3MM en un secador de geles Hoeffer.

#### **4.6) Extracción de RNA:**

Se congeló el tejido con nitrógeno líquido y se lo pulverizó en mortero. Se añadieron 2 ml de buffer guanidina por gramo de tejido fresco. Se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min en el rotor SS 34 de Sorvall. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se le agregó 1 volumen de fenol/ cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, v/v).

Se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm por 45 min a temperatura ambiente. Se precipitó el RNA que está en la fase acuosa con 0,7 vol de etanol frío (-20 °C) y 0,2 vol de ácido acético 1 M. El DNA y las proteínas residuales quedaron en el sobrenadante. Se dejó 1 h a -70 °C ó toda la noche a -20 °C. Se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min. Se lavó el precipitado dos veces con acetato de Na 3 M pH 5,2 a temperatura ambiente (el RNA de bajo PM y polisacáridos contaminantes se disuelven y el RNA intacto permanece en el precipitado). Se lavó el precipitado con etanol 70 % y se resuspendió el RNA en agua tridestilada previamente tratada con dietil pirocarbonato y autoclavada.

Se determinó la concentración de RNA midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Beckman DU.

La composición del buffer guanidina es la siguiente:

|                             |       |
|-----------------------------|-------|
| isotiocianato de guanidinio | 4 M   |
| β-mercaptoetanol            | 50 mM |
| EDTA                        | 20 mM |
| MES                         | 20 mM |
| pH 7                        |       |

#### **4.7) Northern blot:**

##### Preparación de un gel de agarosa desnaturalizante para RNA:

Se fundieron 1,5 gr de agarosa en 73 ml de agua bidestilada estéril. Se dejó enfriar hasta alcanzar los 60 °C y se agregaron 10 ml de buffer MOPS 10x y 16,2 ml de formaldehído 37%. Se agregó bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml.

##### Preparación de la muestra de RNA:

Se resuspendieron 20 µg de RNA en las siguientes concentraciones finales de: formamida 50%, formaldehído 6%, MOPS 1x. Se calentó a 60 °C durante 5 min inmediatamente antes de sembrar.

##### Corrida del gel y transferencia:

La corrida se efectuó durante aproximadamente 4 hs a 4 V/cm en buffer MOPS 1x. El RNA se transfirió a una membrana de Nylon tal como se describe en Maniatis y col. (1989). Se fijó mediante 10 min de exposición a la luz UV (sobre un transiluminador) y 30 min de horneado a 80 °C entre dos hojas de papel Whatman 3MM en un secador de geles Hoeffer.

La composición del buffer MOPS (10x) es la siguiente:

|                                             |         |
|---------------------------------------------|---------|
| MOPS (ác. 3-(N-morfolin)-propano sulfónico) | 0,2 M   |
| Acetato de sodio                            | 0,005 M |
| Na <sub>2</sub> -EDTA                       | 0,01 M  |
| pH 7                                        |         |

#### **4.8) Amplificación de una región de la toxina de *Bacillus thuringiensis* por PCR para usar como sonda:**

La mezcla de reacción contuvo dNTPs a una concentración final de 0,2 mM, 10 pg de DNA del plásmido pES1 (Schnepf y col. 1981) linealizado como template, 1,5 U de Taq polimerasa I, buffer para la Taq polimerasa (1x final), y una concentración final de 0,25 M de c/u de dos oligonucleótidos: uno de ellos es complementario a 30 nt del extremo 3' de la región a amplificar:

5' TTGGATCCTTTCTAAATCATATTCTGCCTC 3'.

El otro oligonucleótido es igual a 30 nt del extremo 5' del fragmento a amplificar:

5' GAGGATCCGTTATGGATAACAATCCGAACA 3'.

La reacción de amplificación consistió en una primera etapa de desnaturalización a 93 °C durante 3 min. A continuación se realizaron 40 ciclos consistentes en 3 etapas c/u:

- a) Anillado: 1 min a 50 °C .
- b) Extensión: 2 min a 72 °C
- c) Desnaturalización: 1 min a 93 °C .

Finalmente se hizo una extensión durante 7 min a 72 °C para completar todas las moléculas que se hubieran iniciado.

La PCR se hizo en un termociclador Perkin Elmer.

El plásmido pES1 fue gentilmente cedido por el Dra. Clara Rubinstein de INGENI-CONICET. Es un derivado del vector pBR322 que contiene el gen de la toxina de *Bacillus thuringiensis* subespecie kurstaki HD-1-Dipel.

#### **4.9) Sondas utilizadas en Northern y Southern:**

\* Para la puesta a punto de la detección de RNAs mensajeros de genes de copia única y niveles de transcripción normales, por Northern "blot" se utilizó como sonda al plásmido pSAC (Shah y col. 1982 gentilmente cedido por la Dra J. Robb, Universidad de Guelph, Canadá.) linealizado. Este plásmido es un derivado de pBR322 que contiene 1,5 kpb de un clon genómico de la actina de soja. El gen de actina se expresa constitutivamente en plantas.



\* Para la detección de mensajeros del gen de la neomicina fosfotransferasa (nptII) se utilizó como sonda un fragmento de 1,25 kpb purificado por electroelución a partir del plásmido pMRKE70 (Robaglia y col. 1987; gentilmente cedido por el Dr. C. Robaglia) digerido con NcoI. Este fragmento contiene gran parte del gen *neo*.

\* Para la detección de RNAs mensajeros de la proteína de cápside de PLRV se utilizó como sonda el fragmento de DNA de 786 pb obtenido por PCR tal como se describió.

\* Para la detección de RNAs del gen de la toxina de *Bacillus thuringiensis* y del mensajero correspondiente en las plantas transgénicas Alfa 1 y Alfa 2, se utilizó como sonda un fragmento de 1871 pb amplificado por PCR. Su obtención se describió en la sección 4.8 de Materiales y Métodos.

#### **4. 10) Hibridación y lavados de Southern y Northern:**

En ambos casos se hicieron prehibridaciones de 3 hs a 65 °C con la siguiente solución:

|                                         |       |
|-----------------------------------------|-------|
| EDTA                                    | 1 mM  |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,2 | 0,5 M |
| SDS                                     | 7%    |

Las hibridaciones se hicieron durante toda la noche a 65 °C en la misma solución. Una vez finalizadas, se lavaron las membranas de la siguiente manera:

a) dos lavados de 20 min c/u a 65 °C con:

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| EDTA                      | 1 mM  |
| NaHPO <sub>4</sub> pH 7,2 | 40 mM |
| SDS                       | 5%    |

b) dos lavados de 20 min c/u a 65 °C con:

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| EDTA                      | 1 mM  |
| NaHPO <sub>4</sub> pH 7,2 | 40 mM |
| SDS                       | 1 %   |

La membrana se expuso a película Agfa Gevaert, entre 5 y 10 días, a -70 °C. Se utilizaron "cassettes" autoradiográficos Kodak con pantallas intensificadoras Crónex.

#### **5) Clonado del gen de la cápside del PLRV:**

##### **5.1) Amplificación y clonado del gen de cápside de PLRV:**

Se utilizó el sistema ("kit") comercial "cDNA cycle kit for RT-PCR1000" de InVivoGen y el "kit" "TACloning™" también de InVivoGen siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Brevemente:

a) Síntesis de cDNA viral por transcripción revertida.

Se purificó RNA total a partir de hojas de *Physalis floriana* infectadas con PLRV. Las hojas infectadas fueron gentilmente cedidas por el Ing. Agr. Luis Conci del Instituto de Fitovirología INTA-Córdoba.

Se disolvió 1 µg de RNA total de planta infectada en un volumen final de 8 µl de agua estéril. Se añadieron 2 µl de hidróxido de metil mercurio (MeHg(OH)) 100 mM 5 seg después, se agregaron 2,5 µl de β-mercaptoetanol 0,7 M y se colocó el tubo en hielo. Se agregó 1 µl de una solución de hexanucleótidos de secuencia al azar (concentración final de 1µM, Pharmacia).

Se calentó a 65 °C durante 2 min y se dejó el tubo en hielo. Se agregaron a continuación 1 µl de inhibidor placentario de RNAsas, 4 µl de buffer 5x, 1µl de dNTPs 25mM y 0,5 µl ( 0,5 U) de transcriptasa reversa. Se incubó 1 hora a 42 °C. Se calentó a 95 °C durante 3 min para desnaturalizar los híbridos RNA-cDNA, se añadieron 0,5 µl de transcriptasa reversa y se incubó a 42 °C durante 1 h.

b) Amplificación del gen de la cápside viral por PCR.

Al templado de cDNA (primera cadena) que proviene del paso anterior, se le agregaron 5 µl de buffer 10x, 1µl de dNTPs 25 mM, cada uno de los oligonucleótidos iniciadores a una concentración final de 1µM y 4 U de la enzima Taq polimerasa. El volumen final fue de 50 µl. Se cubrieron con 100 µl de aceite mineral para evitar la evaporación durante los ciclos de amplificación.

Se usaron dos oligonucleotidos como iniciadores específicos: uno de ellos es complementario a la cadena codificante de la zona no codificante del extremo 3'. Abarca desde la posición 671 hasta la 706 tomando como posición 1 el comienzo del gen de cápside (que tiene 627 nucleótidos). Será llamado oligo 3'. Su secuencia es:

5' TGCGGAGTTGGAGTGGGTGTTGGTTGTGGGCTTGG 3'.

El otro oligonucleótido utilizado tiene 20 nt. y es igual a la cadena codificante del fragmento comprendido entre la posición -100 y -80 del extremo 5' no codificante de cápside. En lo sucesivo será llamado oligo 5'. Su secuencia es:

5' GCGGGATTTGCTTTAGGATTCTCAT 3'.

Cada ciclo de amplificación constó de 3 etapas:

\* desnaturalización: 45 seg a 93 °C.

\* anillado: 45 seg a 50 °C.

\* extensión: 45 seg a 72 °C.

Se realizaron 35 ciclos idénticos en el equipo termociclador de Perkin Elmer (Cetus).

c) Clonado del producto de amplificación por PCR en el vector pCR1000:

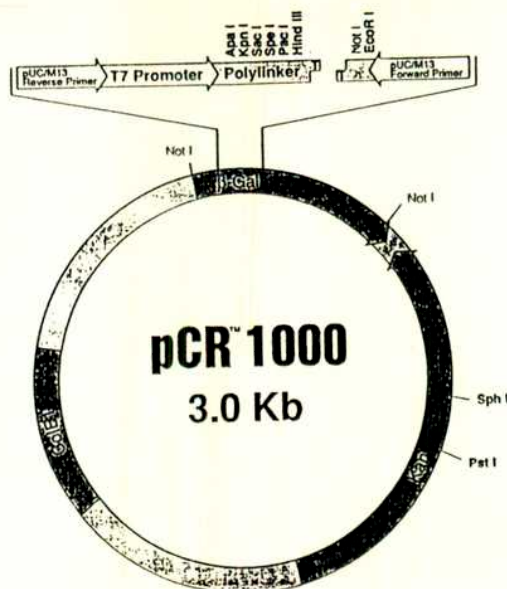
El clonado se hizo en el vector pCR1000 cuyo mapa se muestra en la figura 7. Este vector aprovecha la característica de la Taq polimerasa I de agregar deoxiadenosinas en los extremos 3' de las moléculas de doble cadena independientemente del templado. Estas deoxiadenosinas que protruyen en los extremos 3' sirven para ligar directamente el producto de amplificación por PCR al vector pCR1000 que tiene deoxitimidinas protruyendo en los extremos.

Se utilizaron 50 ng de vector y 12,9 ng de inserto (el producto de la PCR) para una relación molar vector:inserto de 1:1 y 38,8 ng de inserto para una relación molar de 1:3.

El ligamiento se hizo en un volumen final de 11 µl, incubando DNA del vector y del inserto con T4 DNA ligasa a 12 °C durante 14 hs. Se hizo un control con vector sólo religado para cuantificar el "background" debido a bacterias transformadas con vector religado consigo mismo. Se transforman 50 µl de células INV α F' de *Escherichia Coli* con 1 µl de la mezcla final de ligamiento mediante el protocolo descrito en Maniatis y col. (1989). Se transformaron, además, células con 1 ng de DNA plasmídico control, para calcular la eficiencia de transformación.

Una vez completada la transformación y la recuperación de las células en LB sin antibiótico (volumen final: 500 µl) se plaquearon 25 y 250 µl en placas de LB ágar con kanamicina (50 µg/ml). Estas placas fueron previamente rastrilladas con una solución de X-Gal (40 mg/ml) de manera que las colonias provenientes de bacterias recombinantes fueran blancas (porque el gen de la β-galactosidasa está interrumpido por el inserto) y las colonias provenientes de bacterias transformadas con el vector religado, azules.

**Figura 7:**



$\beta$ -Gal: gen que codifica para la  $\beta$ -Galactosidasa. Kan: gen *neo* que confiere resistencia a kanamicina. colE1: origen de replicación del plásmido Col E1.

Nótese las deoxitimidinas protruyendo en los extremos 5', la posición de dos de los cuatro iniciadores ("reverse primer": es el llamado "rev" en Resultados y "forward primer": es el llamado "-40" en Resultados) usados para la secuenciación del gen de cápside de PLRV, y los sitios de corte de la enzima Not I.

## 5.2) Transferencia de colonias a nitrocelulosa:

Se colocó un círculo de papel de nitrocelulosa estéril sobre la placa de Petri donde estaban las colonias a transferir. Se marcó asimétricamente el papel, pinchándolo con una aguja embebida en tinta china. Se incubó 1 hora a 37 °C. Se levantó el papel de nitrocelulosa y se lo embebió, con las colonias hacia arriba, durante 5 min en c/u de las siguientes soluciones.

\* SDS 10%.

\* Solución de desnaturalización: 0,5M NaOH; 1,5M NaCl.

\* Solución de neutralización: 1,5M NaCl; 0,5M Tris-HCl pH 7,4.

Se dejó secar a temperatura ambiente y se horneó durante 2 horas a 80 °C.

## 5.3) Marcado de DNA e hibridación

Se marcaron 50 ng de DNA con  $\alpha$   $^{32}$ P-CTP por el método de iniciación al azar, utilizando un kit comercial de Pharmacia siguiendo las instrucciones del fabricante. Se separó el DNA de los

nucleótidos no incorporados mediante centrifugación a través de una columna de Sephadex G50 según Maniatis y col. (1989).

La prehibridación se hizo a 65 °C durante 3 hs en la siguiente solución:

|                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| SDS                                  | 1%    |
| PAES (polianetol sulfonato de sodio) | 0,1%  |
| SSPE                                 | 2,5x  |
| PPi                                  | 0,01% |

A continuación se agregó la sonda previamente calentada a 95 °C durante 2 min. Se permitió que ocurra la hibridación durante toda la noche a 65 °C.

Se hicieron dos lavados de la membrana a 65 °C durante 15 min c/u con:

- 1) 2X SSPE, 0,1% SDS.
- 2) 1X SSPE, 0,1% SDS.

Se expuso a película autoradiográfica Kodak X-Omat en un "cassette" con una pantalla intensificadora.

#### **6) Secuenciación de DNA de doble cadena:**

Se utilizó el sistema comercial "Sequenase". Versión 2.0 de United States Biochemicals (USA) y <sup>35</sup>S-ATP. Se siguió el protocolo recomendado por los fabricantes, basado en el método de Sanger (Sanger y col. 1977). Se utilizan dos iniciadores comerciales: el oligonucleótido "-40": 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3' y el "rev":

5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'. Se usaron además otros dos oligonucleótidos como iniciadores. Uno de ellos es igual a 20 nt de la zona 5' no codificante de la cápside viral, abarcando las posiciones -27 a -7 con respecto al sitio de iniciación de la traducción. Su secuencia es:

5' TTTCCTCCCACGTGCGATCA 3'. El otro es complementario a 20 nt de la cápside de PLRV desde las posiciones 287 a 307. Su secuencia es:

5' TTCCATCCTTGAATGCCGGA 3'.

Ambos fueron diseñados con la ayuda del programa "Oligo". Versión 3.3 (Rychlik y col. 1989) para poder secuenciar zonas lejanas a los iniciadores "-40" y "rev".

Una vez concluidas las reacciones de secuenciación, se corrieron en geles de poliacrilamida al 6% con formamida. Los geles se fijaron durante media hora en ácido acético 10% - metanol 10%, se secaron durante 3 hs sobre papel Whatman 3MM y se expusieron a película autoradiográfica a temperatura ambiente durante 24 hs.

## **7) Construcción del plásmido pBlepPLRV y su introducción en *Agrobacterium tumefaciens*:**

### **7.1) Construcción de pBlepPLRV:**

Las técnicas clásicas de DNA recombinante como corte de DNA plasmídico con enzimas de restricción, electroforesis de DNA en geles de agarosa, rellenado de extremos 5' protruyentes con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, electroelución o purificación por agarosa de bajo punto de fusión de fragmentos de DNA, ligación de DNA y transformación de *E. coli* con DNA plasmídico fueron según Maniatis y col. (1989).

Para todos los pasos del subclonado se utilizó DNA plasmídico purificado mediante cromatografía de afinidad por el sistema de columnas de Qiagen (Diagen GmbH) según las instrucciones del fabricante.

En todos los casos en que se hizo una doble restricción Hind III-Not I, se cortó primero con Hind III, se agregó NaCl 500 mM hasta alcanzar una concentración de 150 mM final y se hizo la segunda restricción con Not I. El esquema de clonado y los distintos pasos se describen en Resultados.

### **7.2) Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*:**

Se utilizó el protocolo descrito por Höfgen y col. (1988). Brevemente:

Se partió de 5 ml de un cultivo líquido saturado de la cepa LBA4404 (pAL4404) de *Agrobacterium tumefaciens* crecidas a 28 °C en medio LB con rifampicina 100 µg/ml, estreptomicina 100 µg/ml, con agitación. Se inocularon 200 ml de LB sin antibióticos con 2 ml de este cultivo saturado. Se cultivó con agitación a 28 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 550 nm de 0,5. Se centrifugó durante 5 min a 4°C a 6000 rpm en el rotor SS34 de la centrífuga Sorvall. Las bacterias se resuspendieron en agua estéril y se volvió a centrifugar otros 5 min. Se resuspendieron en 1 ml de glicerol 10% y se guardaron a -80 °C en alícuotas de 200 µl . Para la transformación, se pusieron en un tubo Eppendorf 50 µl de bacterias, 5 µg de DNA del plásmido con el que se desea transformar (en este caso, pBlepPLRV que lleva resistencia a kanamicina) y 50 µl de LB sin antibióticos. Se congeló en nitrógeno líquido durante 5 min, se colocó a temperatura ambiente durante 25 min. Se repitió 3 veces este procedimiento. Se agregó 15 ml de LB sin antibióticos y se permitió la recuperación de las bacterias a 28 °C durante toda la noche sin agitación. Se centrifugaron a 6.000 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 200 µl de LB. Se sembraron 180 µl en una placa de Petri con LB-rifampicina 100 µg/ml, estreptomicina

100 µg/ml y kanamicina 100 µg/ml y 20 µl en otra placa igual. Se cultivaron a 28 °C durante 3 días.

#### **8 ) Inmunodetección de la proteína expresada por las plantas transgénicas para la porción tóxica de la proteína de *Bacillus thuringiensis*.**

Se extrajeron proteínas a partir de plantas micropropagadas de Alfa 1 y Alfa 2, así como también del control correspondiente, utilizando el buffer de extracción detallado a continuación:

|                  |      |
|------------------|------|
| SDS              | 0,1% |
| β-mercaptoetanol | 5%   |
| Tris-HCl pH 6,8  | 60mM |
| glicerol         | 10%  |

Por cada 100 mg de tejido fresco se utilizaron 200 µl de buffer de extracción.

El tejido se pulverizó dentro de un Eppendorf, con nitrógeno líquido. Las muestras se centrifugaron a máxima velocidad y se sembraron distintas alícuotas sobre una membrana de nitrocelulosa en un dispositivo para "dot blot". Como control positivo se utilizaron proteínas extraídas a partir de un cultivo en fase lag de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstakii* provisto por el Dr. Jorge Cozzi, IMYZA, CICA, INTA-Castelar.

La membrana se deja secar a temperatura ambiente y luego se la incubó durante toda la noche (con agitación suave) a temperatura ambiente en la solución de bloqueo:

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| Tris-HCl pH 8           | 50mM  |
| NaCl                    | 150mM |
| Tween 20                | 0,05% |
| leche descremada Molico | 3%    |
| glicina                 | 2%    |

Se lavó con TBST dos veces durante 5 min y luego se puso a incubar con IgG anti-BT (provisto generosamente por el Dr Pedro Oramas, del Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba), en una dilución 1: 1000 en solución de bloqueo, durante 2 hs a temperatura ambiente (con agitación suave).

La membrana se lavó tres veces con TBST durante 10-15 min y luego se puso a incubar con IgG αconejo acomplejada con Fosfatasa Alcalina, en la dilución recomendada por el fabricante (Sigma), durante 60 min a temperatura ambiente.

La detección de la reacción enzimática se realizó usando el sustrato fluorescente AMPPD (disodio metoxispiro tricyclo decan fenil fosfato; Tropix, n° catálogo PD250-B). Para ello, se lavó la membrana con buffer sustrato por 10 min, el cual se reemplazó por buffer sustrato +

AMPPD (2µl/ml de solución) y se puso a incubar (en oscuridad) a temperatura ambiente durante 20 min.

Composición del buffer sustrato:

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Tris-HCl pH 9,5   | 0,01M |
| NaCl              | 0,1M  |
| MgCl <sub>2</sub> | 0,05M |

La membrana se expuso toda la noche a temperatura ambiente con film ultrasensible (Fuji Medical X-Ray film).

### **9) Actividad biológica de las plantas transgénicas para el gen de cápside frente al desafío con áfidos infectados con PLRV.**

Este ensayo se llevó a cabo en la Estación Experimental Agropecuaria de INTA-Balcarce, gracias a la colaboración del Ing. I. Butzonitch y la Ing. M. Colavita.

Se transfirieron plántulas de un mes de edad crecidas *in vitro* a macetas que contenían tierra desinfectada con bromuro de metilo. En esta ocasión no se les quitó el ágar, pero se las regó con agua conteniendo 2,5 g/l de Rhizolex® para evitar la proliferación de *Rizoctonia solani*. Las macetas se colocaron en un invernadero. A los 9 días del transplante a tierra, se infectó a cada planta con 15 ninfas de *Myzus persicae* que previamente se habían alimentado en plantas de *Solanum tuberosum* cv. Ballenera o *Datura stramonium* con infección secundaria con PLRV. Luego de 13 días, se trató las plantas con Pirimicarb®, un insecticida para eliminar los áfidos. Para el ELISA se utilizó el sistema ("kit") de Bioreva, Suiza y se siguieron las recomendaciones del fabricante. Se tomaron hojas sanas, completamente desarrolladas.

### **10) Ensayo de sensibilidad de larvas de polilla del tomate a la toxina expresada por Alfa 1 y Alfa 2:**

Este ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Lucha Biológica del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, CICA, de INTA-Castelar, gracias a la colaboración del Dr. E. Botto y la Ing. Agr. Silvina Ceriani.

Con el objeto de obtener plantas en maceta para el ensayo de actividad biológica de las plantas Alfa 1 y Alfa 2, así como también de dos testigos negativos Huinkul-MAG y Spunta, se micropropagaron ápices de 10 plantas de cada grupo a medio fresco. Al mes, se destaparon los tubos, pero se mantuvieron las plantas en la misma cámara de cría. Esto evita un pasaje brusco entre las condiciones *in vitro* y las de maceta. Al cabo de una semana, se sacaron las plantas de



los tubos de micropropagación con sumo cuidado para no romper las raíces, se les quitó el ágar bajo un pequeño chorro de agua, y se las transplantó a tierra. La eliminación del ágar es importante ya que éste contiene nutrientes que favorecen la proliferación de microorganismos que podrían causar la pudrición de las raíces.

Las plantas se colocaron en jaulas de vidrio de 130 x 70 x 80 cm.

Las condiciones empleadas en el ensayo fueron: temperatura, 25 °C; luz natural difusa, suplementada con un equipo de dos tubos fluorescentes de 40W; humedad relativa, 60-80%.

#### **10) Ensayo de resistencia de plantas transgénicas en maceta a fosfinotricina:**

Se transplantaron a maceta plantas crecidas *in vitro* de un mes, tal como se describió en la sección anterior.

A los 10 días del trasplante a tierra se pulverizaron las plantas dispuestas en un área de 0,5 m<sup>2</sup> con 0,5 l de Basta® disuelto en agua (1 gramo de compuesto activo por litro) con la ayuda de un pulverizador manual.

El Basta® comercial contiene 20 g de compuesto activo (fosfinotricina) por cada 100 ml.

# Resultados

## **A: OBTENCION Y EVALUACION DE PLANTAS DE PAPA TRANSGENICAS:**

### **A 1) Puesta a punto de la transformación de *Solanum tuberosum* cv. Huinkul-MAG:**

Si bien se publicaron numerosos trabajos de transformación genética de papa, la mayoría de éstos se limita a unos pocos cultivares modelo (i.e. Désirée) o cultivares de gran importancia para Estados Unidos o Europa (i.e. Russet Burbank y Bintje) demostrándose una gran dependencia del genotipo en la eficiencia de transformación. Interesaba conocer y poner a punto la transformación de cultivares argentinos de uso comercial como Huinkul-MAG.

Para poner a punto la técnica de transformación de papa, se eligió utilizar el gen *neo* que codifica para la neomicina fosfotransferasa II (NPT II) como marcador de selección. Este marcador, si bien es el más utilizado en plantas, no es igualmente efectivo en todas las especies. Incluso, su efectividad es variable en distintos cultivares de una misma especie.

Para determinar la concentración de kanamicina (Km) a utilizar en la selección de los brotes que surgen a partir de una célula transformada, se debe buscar una solución de compromiso considerando:

- a) Privilegiar la selección usando concentraciones altas de Km.
- b) Privilegiar la obtención del mayor número posible de plantas transgénicas usando bajas concentraciones de Km durante la selección.

La decisión a) tiene la ventaja de que se reduce la aparición de escapes, es decir plantas no transgénicas pero que toleran concentraciones bajas de Km. Sin embargo posee dos desventajas: las células transformadas que expresan bajos niveles de neomicina fosfotransferasa no son capaces de regenerar en un medio con alta concentración de Km. Es decir se "pierden" en la etapa de selección plantas transgénicas que posiblemente expresen el gen de interés, aunque probablemente lo hagan en bajos niveles. Además, como se dijo en la Introducción, la muerte de las células no transformadas debe ser lenta, ya que éstas liberan al medio compuestos tóxicos que inhiben la regeneración de las células transformadas. A altas concentraciones de Km, la muerte de las células no transformadas es rápida.

En cuanto a la decisión b), tiene la ventaja de que se recupera una mayor cantidad de transformantes, punto importante cuando se trata de buscar las condiciones para optimizar la transformación. Sin embargo, aplicar bajas concentraciones de Km durante la selección, tiene la desventaja de que aumenta la frecuencia de escapes.

Se realizaron ensayos preliminares para determinar la sensibilidad de las hojas del cultivar Huinkul-MAG a la Km, en las condiciones a usar durante la regeneración según el protocolo de Wenzler de transformación de hoja (Wenzler y col. 1989). El objetivo de este ensayo fue

confirmar que las concentraciones de Km propuestas en la literatura para otros cultivares de papa producían necrosis y muerte sobre hojas del cultivar a usar en lo sucesivo. Se ensayaron 0, 25, 50, 100 y 150 mg/l de Km en el medio de cultivo como presión de selección. Se encontró que las hojas que estaban en un medio con Km 50 mg/l mostraban amarillamiento y necrosis al cabo de un mes. Las que estaban en Km 100 ó 150 mg/l sobrevivían en este medio alrededor de 15 días. Debido a esto último y a lo que se consideró anteriormente (muerte lenta deseable) se decidió aplicar Km a una concentración de 50 µg/ml en los futuros experimentos de transformación. Sin embargo, la aplicación del protocolo de Wenzler no dio lugar a eficiencias de regeneración adecuadas en un medio sin Km.

Se intentó a continuación poner a punto la regeneración de papa a partir de rodajas de tubérculo, usando minitubérculos del cultivar Spunta obtenidos en invernadero.

Para determinar las condiciones adecuadas para la regeneración a partir de tubérculo, se hizo una simulación de cocultivo (sin *Agrobacterium*) al cabo del cual las rodajas de tubérculo se colocaron en distintos medios conteniendo concentraciones variables de una auxina y una citoquinina. En 1989 Hockema y col. realizaron una tarea similar para las variedades europeas Bintje, Désirée y Escort, en donde encontraron, luego de probar distintas hormonas (kinetina, ac. naftalenacético, ac. indolacético o AIA, ribósido de zeatina), que las hormonas y concentraciones adecuadas eran: 10 µM zeatina/ 1µM AIA para Escort y Bintje, y 5 µM zeatina/ 0,3 µM AIA para Désirée.

Luego de una esterilización superficial de tubérculos de Spunta (ver Materiales y Métodos), se colocaron las distintas rodajas de aproximadamente 0,9 cm de diámetro y 2 mm de espesor en 7 medios diferentes (15 rodajas en cada medio) en cuanto a la concentración de hormonas utilizadas. Los resultados obtenidos se detallan a continuación en la tabla 4:

Tabla 4.

| Concentración de zeatina | 0 µM    | 5 µM  | 10 µM        |
|--------------------------|---------|-------|--------------|
| Concentración de AIA     |         |       |              |
| 0 µM                     | ninguna | ND    | regeneración |
| 5 µM                     | ND      | callo | callo        |
| 10 µM                    | ninguna | callo | callo        |

Las combinaciones 0 µM zeatina/5 µM AIA y 5µM zeatina/ 0 µM AIA no fueron ensayadas (ND).

A 14 días de iniciado el tratamiento, se observó la aparición de callos en las concentraciones zeatina 10µM/AIA 10µM, zeatina 10µM/AIA 5µM, zeatina 5µM/AIA 10µM, y zeatina 5µM/AIA 5µM. No se observó aparición de callos en las concentraciones zeatina 0µM/AIA 0µM, zeatina 0µM/AIA 10µM, zeatina 10µM/AIA 0µM. A los 35 días los callos eran verdes y de un diámetro de entre 1,5 y 2,5 cm. No se diferenció ningún brote a partir de estos callos.

A los 35 días de iniciado el tratamiento se observó la aparición de microcallos en el 100% de las rodajas de tubérculos que estaban bajo el tratamiento de zeatina 10µM/AIA 0µM. Una semana después, surgieron brotes a partir de todos estos microcallos. Cuando los brotes alcanzaron un tamaño de unos 10 cm se los separó de las rodajas de tubérculo con un bisturí y se los transfirió a medio de enraizamiento. A los 15 días, todos los brotes enraizaron.

Como se desprende de la tabla, el tratamiento con zeatina 10  $\mu$ M como única hormona fue, por lo tanto, el más adecuado para el cultivar Huinkul-MAG.

En la figura 8 se muestran varios brotes desarrollados sobre una rodaja de tubérculo.

Figura 8:



Brote formado por regeneración en medio selectivo a partir de un microcallo sobre una rodaja de tubérculo del cultivar Spunta.

Sin embargo, se decidió no continuar trabajando con tubérculo debido a que las eficiencias de regeneración obtenidas con distintas partidas de tubérculos fueron enormemente variables. Esto probablemente se haya debido a la heterogeneidad en las condiciones de almacenaje y edad de los tubérculos.

Finalmente se ensayó una modificación del protocolo publicado por Rocha Sosa y col. (1989). Se resolvió utilizar el medio P, definido originalmente para espárrago y utilizado en el INRA-Versalles, Francia para micropropagación de papa (Tendille y col. 1974), en el que observaciones previas (comunicación personal de la Dra. V. Saladrigas) indicaban que el cultivar Huinkul-MAG crecía mejor que en el medio de Murashige-Skoog (MS). Este medio lleva 10% sacarosa en lugar de 20% sacarosa del medio MS. Se resolvió por lo tanto utilizar 1% glucosa en el medio de regeneración en lugar de 1,6% glucosa del protocolo original. También, y como consecuencia de resultados de regeneración a partir de tubérculo, se resolvió añadir zeatina como única hormona en el medio de regeneración, en lugar de la combinación de zeatina, ácido naftalenacético y ácido giberélico que utilizan Rocha-Sosa y col. (1989).

El protocolo definitivo se detalla en Materiales y Métodos.



Se hicieron tres tipos de controles:

1) Control de regeneración: simulación de cocultivo colocando los explantos en medio líquido, sin agrobacterias y plaquéndolos en medio de regeneración sin presión de selección:

A su vez se realizó el cocultivo de discos de hojas con agrobacterias de la misma cepa a usar en la transformación pero sin el plásmido que contiene el T-DNA en medio líquido y luego plaqueo en medio de regeneración:

2) Control del efecto de la cepa sobre la regeneración: los explantos se plaquean en medio sin presión de selección.

3) Control de la efectividad del agente selectivo: para este tipo de control, los explantos sin tratar con las agrobacterias se plaquean en medio suplementado con el agente selectivo.

En la figura 9 se muestra un detalle de brotes que surgen en medio selectivo a partir de pequeños callos que se forman sobre la superficie del corte hecho en la hoja antes de la coinfección.

Figura 9:



Brote formado por regeneración en medio selectivo a partir de un microcallo sobre una hoja de Huinkul-MAG. Nótese que el brote surge en la zona de la hoja herida por corte con bisturí.

Los brotes se cortaron con un bisturí y se transfirieron a un medio sin kanamicina para que crezcan con mayor rapidez. Una vez logrado este objetivo, se pasó un ápice de cada uno de estos "candidatos" a medio selectivo (con Km 50 µg/ml) y al cabo de 10 días se hizo una observación comparativa de dos clones de una misma planta creciendo con y sin presión de selección. Se tomó en consideración el color de las hojas, el tamaño de la planta y, especialmente, si fueron o no capaces de enraizar en kanamicina. Las plantas que surgieron en medio selectivo pero que luego de un período sin presión de selección no enraizaron en Km, son los escapes iniciales a la

presión de selección. En la figura 10 se muestra uno de estos casos. Como se observa en la figura, se puede determinar claramente que se trata de un escape.

Figura 10:



El tubo de la derecha contiene medio P con km y cefotaxime y el de la izquierda medio P con cefotaxime

En la tabla 5 se volcaron datos de dos ensayos independientes de transformación de hojas de papa del cultivar Huinkul-MAG con la cepa LB4404 (pAl4404) de *Agrobacterium tumefaciens* que lleva el vector GUS-intrón.

En todos los casos se hicieron los 3 controles descritos (cantidad de explantos por control: entre 10 y 15). Los controles 2 y 3 se hicieron con la cepa LB4404 (pAl4404) de *Agrobacterium tumefaciens*.

La eficiencia de regeneración en medio no selectivo fue del 100% para los explantos tratados o no con *Agrobacterium tumefaciens* (controles 2 y 1). El cocultivo con la cepa LB4404 (pAl4404) de *Agrobacterium tumefaciens* no tuvo por lo tanto efecto sobre la regeneración.

En ningún caso se obtuvieron callos verdes ni regeneración en los explantos correspondientes al control 3 en medio selectivo. Las hojas se tornaron amarillas paulatinamente hasta que murieron. Para evitar confusiones, a las plantas provenientes de un mismo explanto inicial se les adjudicó una letra y un número que indica el orden con que fue cortada y pasada a un medio fresco. Así,

por ejemplo la serie A1, A2, A3 indica que el explanto A dio origen, sucesivamente a 3 brotes 1, 2 y 3 que pueden ser o no de origen clonal (ver más adelante).

Tabla 5:

|                                             | E1                          | E2                     |
|---------------------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| n = n° explantos iniciales en km 50         | 43                          | 60                     |
| n° de brotes en km50                        | 21                          | 29                     |
| x= n° explantos que dieron plantas en km50  | 4                           | 8                      |
| y = n° de plantas obtenidas en km50         | 16                          | 29                     |
| y/x                                         | 16/4 = 4                    | 29/8 =3,6              |
| escapes iniciales a la presión de selección | $(21-16).100 / 21 = 23,8\%$ | 0                      |
| Ef A = $(y/n) . 100$                        | $(16/43).100 = 37,2\%$      | $(29/60).100 = 48,3\%$ |
| Ef E = $(x / n) . 100$                      | $(4/43).100 = 9,3\%$        | $(8/60).100 = 13,3\%$  |
| % de plantas GUS+ / y                       | $(11/16).100 = 68,8\%$      | $(13/29).100 = 44,8\%$ |
| % de plantas NPT II + / y                   | $(16/16).100 = 100\%$       | NT                     |

E1 y E2 son dos ensayos independientes de transformación de hojas de papa del cultivar Huinkul-MAG con *Agrobacterium tumefaciens* que lleva el vector GUS-intrón.

NT = No testado.

Ef A: eficiencia de transformación en sentido amplio.

Ef E: eficiencia de transformación en sentido estricto.

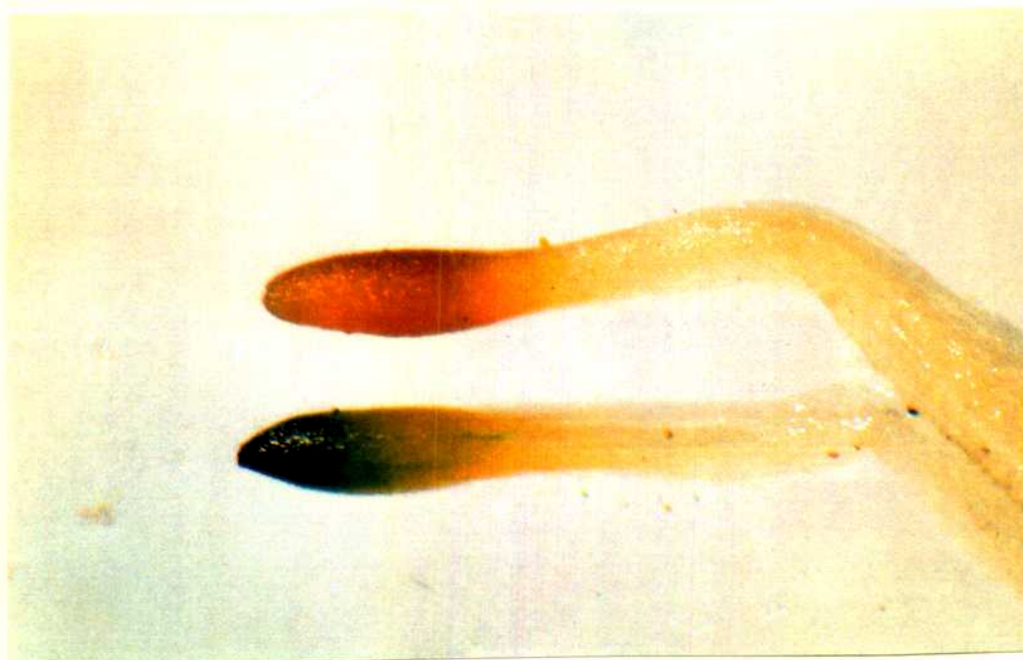
Si tomamos en cuenta la definición amplia (ver Introducción) la eficiencia de transformación fue del 37,2% en el primer ensayo y del 48,3% en el segundo. Sin embargo estos valores son, probablemente una sobrestimación ya que alguna/s de las plantas obtenidas de un mismo explanto pueden ser clones entre sí, es decir ser plantas idénticas surgidas a partir de una única



célula transformada. Dado que se fueron cortando los brotes que surgieron a partir de un mismo explanto a lo largo de 3 semanas, es probable que una misma célula haya dado lugar, sucesivamente, a dos o más brotes. Es por ello que la definición estricta es quizás más cercana a la realidad. En ese caso la eficiencia de transformación fue del 9,3% y del 13,3% en los ensayos 1 y 2 respectivamente. Sin embargo estamos frente a una subestimación ya que en muchos casos se tiene la certeza que se trata de regenerantes independientes puesto que surgen a partir de microcallos completamente separados entre sí.

Se intentaron dos protocolos distintos para el ensayo de GUS (ver Materiales y Métodos). Los ensayos sobre raíz demostraron ser más sensibles que sobre hoja (los datos presentados en la tabla corresponden a ensayos en raíz). Ver figura 11.

Figura 11:



Raíces de una planta de Huinkul-MAG sin transformar (arriba) y de una planta de Huinkul-MAG transgénica para el gen *uid A* (que codifica para GUS) interrumpido por un intrón (abajo), luego de un ensayo de detección de actividad GUS.

#### **A 2) Puesta a punto de la determinación de actividad neomicina fosfotransferasa:**

Hay varios métodos para detectar actividad neomicina fosfotransferasa en plantas transformadas. Uno de ellos consiste en la separación electroforética en un gel de poliacrilamida de esta enzima del resto de las proteínas de la planta y la posterior incubación con el antibiótico presente, junto

con  $\gamma$   $^{32}\text{P}$  ATP, en un gel de agarosa que se prepara encima del de poliacrilamida. Luego se transfiere la neomicina fosforilada *in situ* a un papel de fosfocelulosa y se autoradiografía. Este método tiene la desventaja de requerir grandes cantidades de  $\gamma$   $^{32}\text{P}$  ATP y de ser poco práctico para manejar gran cantidad de muestras.

Se optó por poner a punto un ensayo de medición de actividad enzimática por "dot blot". Se trabajó sobre el protocolo de McDonnell (1987). Básicamente consiste en la extracción de proteínas totales, reacción de NPT II (propriadamente dicha) incubando estas proteínas con neomicina y  $\gamma$   $^{32}\text{P}$ -ATP y "dot blot" sobre papel de fosfocelulosa que retiene la neomicina fosforilada por la enzima NPT II.

El principal problema a resolver fue la gran cantidad de radiactividad no específica que se pega a la membrana detectada en los ensayos preliminares que impide o genera dudas en la identificación de muestras positivas.

Las fuentes de ruido de fondo o "background" son dos:

- a) Proteínas fosforiladas por quinasas endógenas.
- b)  $\gamma$   $^{32}\text{P}$ -ATP que precipita sobre el papel de fosfocelulosa.

El fondo debido a a) es importante porque puede dar lugar a falsos positivos ya que las quinasas endógenas están tanto en tejidos de plantas transformadas como no transformadas. Para eliminarlo se interpuso una membrana de nitrocelulosa que se ubica por sobre el papel de fosfocelulosa en el "dot blot". Las proteínas fosforiladas quedan retenidas mientras que la neomicina fosforilada, mucho más pequeña y sin afinidad por la nitrocelulosa, no queda retenida en ésta sino en la fosfocelulosa que está por debajo.

El fondo debido a b) es importante porque es tan alto que no se distingue dónde hubo siembra y dónde no. Para eliminarlo se intentaron dos métodos:

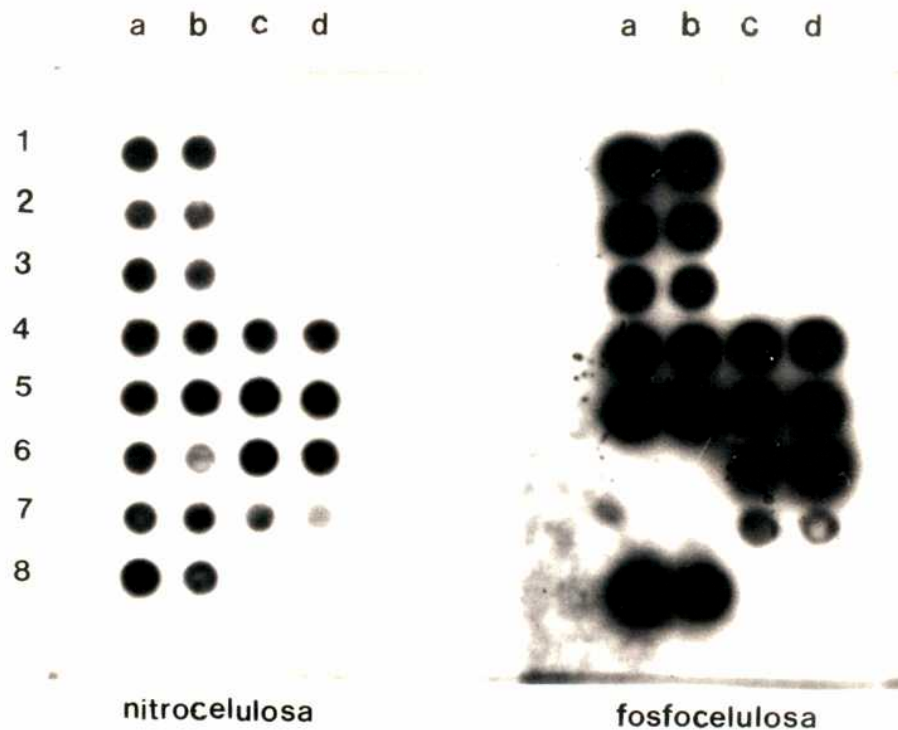
- 1) Bloqueo de la membrana con ATP frío.
- 2) Bloqueo de la membrana con una solución conteniendo leche descremada.

El método 2) fue satisfactorio.

El protocolo definitivo se detalla en Materiales y Métodos.

En la figura 12 se ve el resultado de un ensayo de NPT II hecho con plantas del cultivar Huinkul-MAG regeneradas en medio selectivo luego de una coinfección de discos de hojas con la cepa de *A. tumefaciens* que lleva el plásmido GUS-intrón. Estos candidatos a ser transformantes fueron negativos en el ensayo de GUS. El ensayo de NPT II se hizo para determinar si se trataba de escapes a la presión de selección (y por lo tanto verdaderos GUS negativos) o, por el contrario, eran transformantes, en cuyo caso estaríamos ante un problema en cuanto a la sensibilidad del ensayo de GUS (falsos GUS negativos).

Figura 12:



En todos los casos testados se incluyó la siembra de dos cantidades distintas del volumen final de reacción: 30  $\mu$ l en a) y c) y 15  $\mu$ l en b) y d).

En a1, a2, a3, a4, c4, c5, c6 y c7 se sembró material proveniente de los distintos individuos a.

a5 es el control positivo de papa: el ensayo se hizo con material de una planta transformada en el mismo ensayo que las plantas testadas en este experimento, que era GUS positiva.

a6 es el control negativo de papa: Huinkul-MAG sin transformar.

a7 es el control negativo de tabaco: Xanthi sin transformar.

a8 es el control positivo de tabaco: Xanthi transformado con el vector pMON9749.

Todas las muestras testadas provenientes de plantas que regeneraron en medio selectivo expresaron actividad neomicina fosfotransferasa II mientras que los controles no lo hicieron.

### A 3) Puesta a punto de la técnica de Northern blot para detectar RNAs mensajeros:

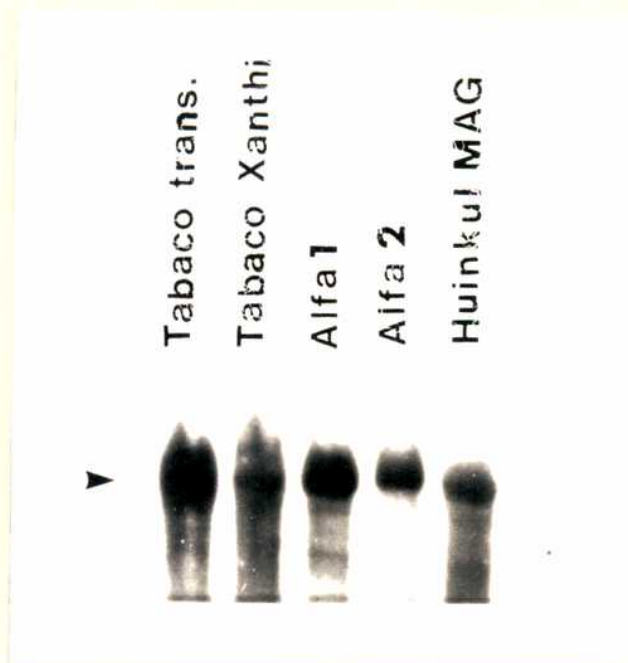
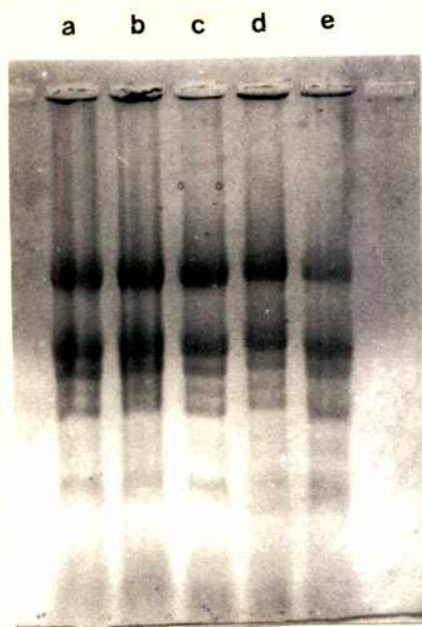
Para poner a punto la técnica de Northern "blot" se eligió comenzar por detectar el mRNA de un gen que se expresa constitutivamente en plantas: el gen de actina.



Se extrajo RNA total de plántulas de tabaco y papa transgénicas y no transgénicas crecidas *in vitro*. Se lo sometió a una electroforesis en un gel de agarosa desnaturalizante y se lo transfirió a una membrana de Nylon. En la figura 13 se muestra un foto del gel resultante: las distintas bandas corresponden a las subunidades pequeña y grande del RNA ribosomal de citoplasma, cloroplastos y mitocondrias. Como sonda se utilizó el plásmido pSAC (que contiene el gen de actina de soja) linealizado y marcado con  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP.

La foto de la autoradiografía correspondiente que se muestra en la figura 14 indica que es posible detectar RNA mensajeros de abundancia intermedia a alta en las condiciones utilizadas. A la altura indicada por la flecha se ve una banda del mismo tamaño para papa y tabaco que está presente, como era de esperar, tanto en las plantas transgénicas como en las que no lo son. Dado que se trata de un gen altamente conservado, el hecho de que la sonda fuera de soja no dificultó la hibridación heteróloga con papa y tabaco.

Figuras 13 y 14:



Se corrieron 10  $\mu\text{g}$  de RNA total de plantas mediante electroforesis desnaturalizante de agarosa al 1,5 %.

Las muestras provinieron de:

A) *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi transformada con el vector pMON9749.

B) *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi.

C) Alfa 1 (*Solanum tuberosum* cv. Alfa transformado con el vector pBT1. Su obtención y análisis se explican más adelante en esta tesis).

D) Alfa 2 (ídem anterior).

E) *Solanum tuberosum* cv. Huinkul-MAG.

El RNA se transfirió a un filtro de Nylon por la técnica de Northern y se hibridó con el plásmido pSAC (que contiene el gen de actina de soja) linealizado y marcado con  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP por la técnica de iniciación al azar. La actividad específica de la sonda fue de  $10^8$  cpm/  $\mu\text{g}$  DNA.

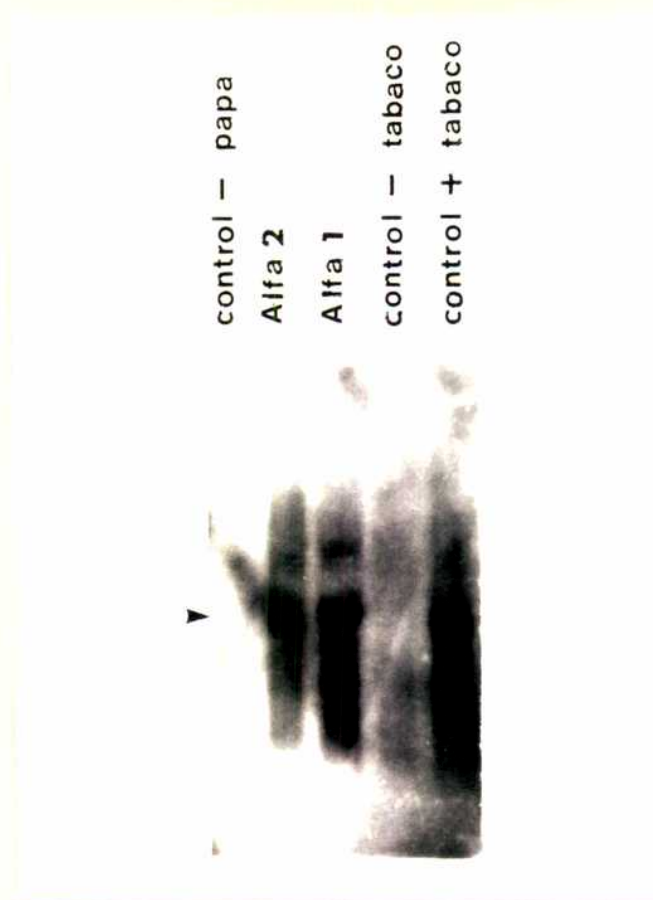
Puede observarse que las bandas de la autoradiografía de la figura 14 no son nítidas. Una dificultad para obtener bandas nítidas en los Northern es que parte del mRNA complementario a la sonda es arrastrado inespecíficamente o sufre degradación parcial, dando lugar a chorreados. Además hay heterogeneidad en el tamaño de las moléculas del mRNA debido a diferencias en la longitud de la cola de poliA del extremo 3' de las distintas moléculas de mRNA, de manera que no se suelen obtener bandas tan nítidas como las de un Southern. La pureza de la sonda suele señalarse como otro factor crítico que evita la unión inespecífica de radiactividad.

El siguiente paso fue detectar el mRNA correspondiente al gen *neo* que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II que confiere resistencia a kanamicina. Como controles positivos se usaron los RNAs de Alfa 1, de Alfa 2 y de tabaco transformado con pMON9749, a los que previamente se les había detectado actividad neomicina fosfotransferasa. Como control negativo se incluyó RNA de *Solanum tuberosum* cv Huinkul-MAG y de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi sin transformar.

Se hicieron dos primeros intentos usando como sonda al plásmido pMRKE70 completo linealizado en un caso y al plásmido pBI 121 linealizado en el otro caso. Estos plásmidos contienen dos genes *neo* cada uno, uno bajo el control de un promotor para plantas dentro del T-DNA (marcador de selección en plantas) y otro bajo el control de un promotor de bacterias ubicado fuera de esta región (marcador de selección en bacterias). En ninguno de los dos casos se detectaron bandas en los controles positivos. Además, las autoradiografías mostraron unión inespecífica de la sonda a toda la membrana (no sólo donde está el mRNA).

Se decidió hacer varias modificaciones al protocolo. Por un lado se aumentó la cantidad del RNA sembrado por calle a 20 µg. Por otro lado, y para evitar o disminuir la unión inespecífica, se cambió tanto de técnica de bloqueo e hibridación como la pureza de la sonda. Los primeros ensayos descritos la prehibridación y la hibridación se hicieron con una solución cuyo principal componente de bloqueo es un derivado de la heparina, el polianetol sulfonato de sodio (PAES, Hopp y col. 1988), técnica que fue reemplazada por la descrita en Materiales y Métodos de esta tesis. En cuanto a la sonda, se resolvió trabajar con un fragmento purificado del plásmido pMRKE70 por digestión con enzimas de restricción seguida de electroforesis y aislamiento del fragmento que contiene el gen *neo* por el método de la agarosa de bajo punto de fusión. La autoradiografía correspondiente se muestra en la figura 15. La flecha indica la banda correspondiente al mRNA de la neomicina fosfotransferasa en las plantas transgénicas: Alfa 1, Alfa 2 y tabaco transformado con pMON9749. Esta banda no está presente en los controles negativos (papa y tabaco sin transformar).

Figura 15:



Se corrieron 10 µg de RNA total de plantas mediante electroforesis desnaturizante de agarosa al 1,5 %.

Las muestras provinieron de:

*Solanum tuberosum* cv. Huinkul-MAG (Control - papa).

Alfa 2 (*Solanum tuberosum* cv. Alpha transformado con el vector pBT1. Su obtención y análisis se explican más adelante en esta tesis).

Alfa 1 (*Solanum tuberosum* cv. Alpha transformado con el vector pBT1. Su obtención y análisis se explican más adelante en esta tesis).

*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi (control - tabaco).

*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi transformada con el vector pMON9749 (control + tabaco).

El RNA se transfirió a un filtro de Nylon por la técnica de Northern y se hibridó con un fragmento de DNA que contiene el gen *neo* marcado con  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP por la técnica de iniciación al azar. La actividad específica de la sonda fue de  $10^8$  cpm/ µg DNA.

## **B: OBTENCION DE PLANTAS DE PAPA TRANSGENICAS EXPRESANDO EL GEN DE CAPSIDE DE PLRV:**

### **B 1) Clonado y secuenciación del gen de cápside de PLRV:**

#### **B 1.1) Estrategia general:**

El hecho de que el PLRV se encuentra solamente en el floema y células acompañantes, hace que la purificación de este virus sea difícil y poco eficiente. Mediante el protocolo de purificación de Takanami y col. (1979), que utiliza un complejo de enzimas pectinolíticas, hemicelulolíticas y celolíticas "Driselasa" para optimizar la extracción se obtiene un rendimiento no superior a 1 mg virus/kg de hojas de *Physalis floridana* infectada ó 0,7 mg virus /kg de hojas de *Solanum tuberosum* infectadas. En cambio, la eficiencia de recuperación de virus que replican en el mesófilo de la hoja como PVX es de 10 mg/kg de hoja fresca (Huisman y col. 1988).

Debido a los bajos rendimientos de purificación previstos, se resolvió evitar pasar por una etapa de purificación viral, usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para lograr la amplificación del gen de cápside viral.

Se extrajo RNA total de hojas de *Physalis floridana* infectadas con un aislamiento local de PLRV hecho en el Instituto de Fitovirología, INTA-Córdoba. Se sintetizó la primer cadena de cDNA con RNA total como templado, oligonucleótidos al azar como iniciadores y transcriptasa reversa.

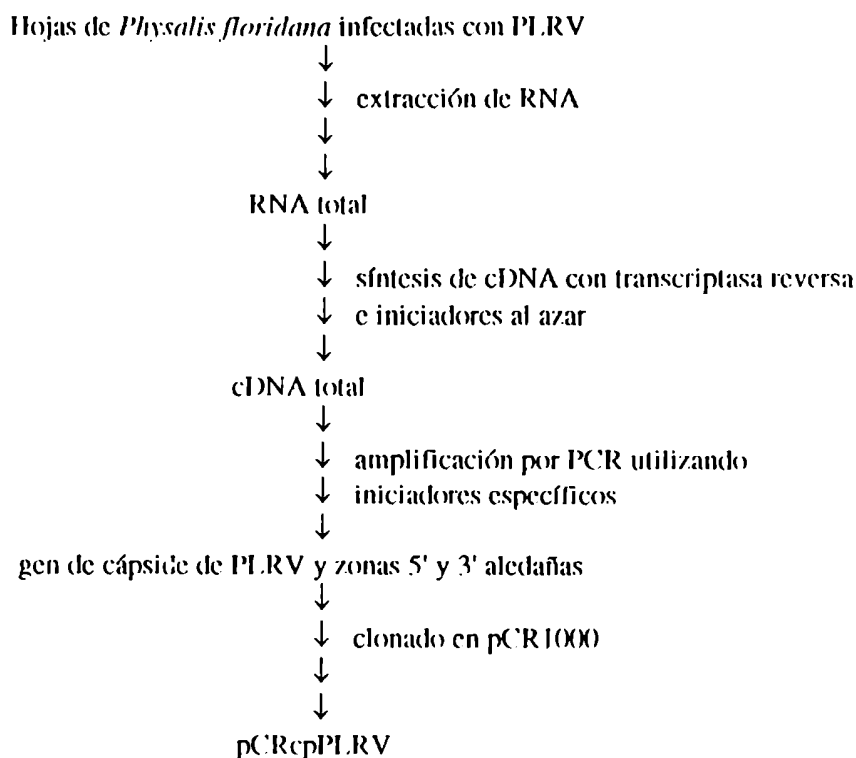
Para la reacción de PCR se usó cDNA total como templado, un par de oligonucleótidos especialmente diseñados como iniciadores y la enzima Taq polimerasa I. Uno de los oligos tiene una secuencia complementaria a 20 nt de la región 3' NC de la cápside, y el otro tiene una secuencia igual a 20 nt en el extremo 5' NC de la cápside.

El producto de la amplificación por PCR se clonó en un vector comercial, el pCR1000, cuyo mapa se mostró en la figura 7 (ver Materiales y Métodos).

A continuación se secuenció el gen de cápside y sus zonas 5' y 3' aledañas, mediante el método de los dideoxinucleótidos de Sanger. Esto permitió la comparación de la secuencia de este aislamiento local con otras secuencias publicadas, correspondientes a aislamientos europeos, canadienses y australianos.

En la figura siguiente se esquematiza la estrategia empleada, y a continuación se describe cada uno de los pasos por separado.

**Figura 16:**



Esquema de la estrategia de clonado del gen de cápside de PLRV.

**B 1. 2) Amplificación y clonado del gen de cápside:**

Para el clonado del gen de cápside del PLRV se utilizó la técnica de PCR.

Se extrajo RNA total de hojas de *Physalis floridana* infectadas con PLRV. Se sintetizó una primera cadena de cDNA utilizando como templado 1 µg de RNA total. Para ello se utilizaron dos tipos de iniciadores.

- a) Una mezcla de hexanucleótidos de secuencia al azar, de manera que la iniciación fuera también al azar.
- b) Un oligonucleótido de 35 pares de bases complementario a la zona 3' NC del gen de cápside viral. Una vez obtenida la primera cadena de cDNA, se incubó a 95 °C durante 3 min para desnaturalizar y se hizo la reacción de PCR. En ambos casos (a y b) se añadieron dos oligos específicos de cápside como iniciadores, los cuatro deoxinucleótidos (dNTPs) y Taq polimerasa I. Ver Materiales y Métodos.

Es importante aclarar que estos oligos fueron diseñados utilizando el programa Oligo, versión 3.3, que considera tres factores fundamentales: la estabilidad del dúplex formado entre el oligo y el templado (en este caso cDNA), la especificidad del oligo en su unión al templado y la



complementaridad de c/u de los oligos consigo mismo y uno con respecto al otro (Rychlik y col. 1989).

Para la reacción de PCR, se eligieron condiciones relajadas de anillamiento: 45 seg a 50 °C ya que la temperatura de fusión de uno de los oligos era baja, 54,7 °C. La extensión fue de 45 seg a 72 °C y a desnaturalización de 45 seg a 93 °C. Se hicieron 30 ciclos idénticos y uno más largo al final para completar todas las cadenas. Una vez finalizada la reacción se sembró un décimo del volumen final en un gel de agarosa.

En el caso a) en el que la primer cadena de cDNA fue producida por iniciación al azar, luego de la PCR se obtuvo una banda de un tamaño igual al esperado; es decir que se amplificó un fragmento del genoma viral de 786 pb comprendido entre la posición -100 y 686 que incluye el gen de la cápside viral completo, 100 pb del extremo 5' NC y 59 pb del extremo 3' NC.

En el caso b) no se obtuvo amplificación de DNA.

El fragmento amplificado se clonó en el vector pCR100 del sistema ("kit") de In Vitro Gen cuyo mapa se mostró en la fig 7. La ligación se hizo tal como se describe en Materiales y Métodos.

Luego de la transformación de la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* con el producto del ligamiento del vector pCR1000 con el gen de la proteína de la cápside amplificado por PCR, se presentó el siguiente problema: había igual número de colonias blancas y azules en la placa de las células transformadas con el DNA recombinante y en la placa de las células transformadas con el vector religado (control sin inserto). Esto probablemente se debió a la pérdida espontánea de las deoxitimidinas en los extremos 3' del vector, y la consecuente interrupción del marco de lectura del gen de la  $\beta$ -galactosidasa. Las colonias resultantes de esta pérdida son blancas si bien no tienen inserto.

Debido a este inconveniente (que está previsto por los fabricantes del "kit", aunque en menores proporciones) fue necesario diferenciar las colonias blancas de bacterias que llevaban un plásmido recombinante de las colonias blancas de bacterias que llevaban un vector sin inserto. Esto se hizo por hibridación de colonias usando, como sonda, el DNA producto de la amplificación (es decir el inserto del clonado) marcado con  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-CTP. La actividad específica de la sonda fue de  $1 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g DNA.

El protocolo utilizado se describe en Materiales y Métodos.

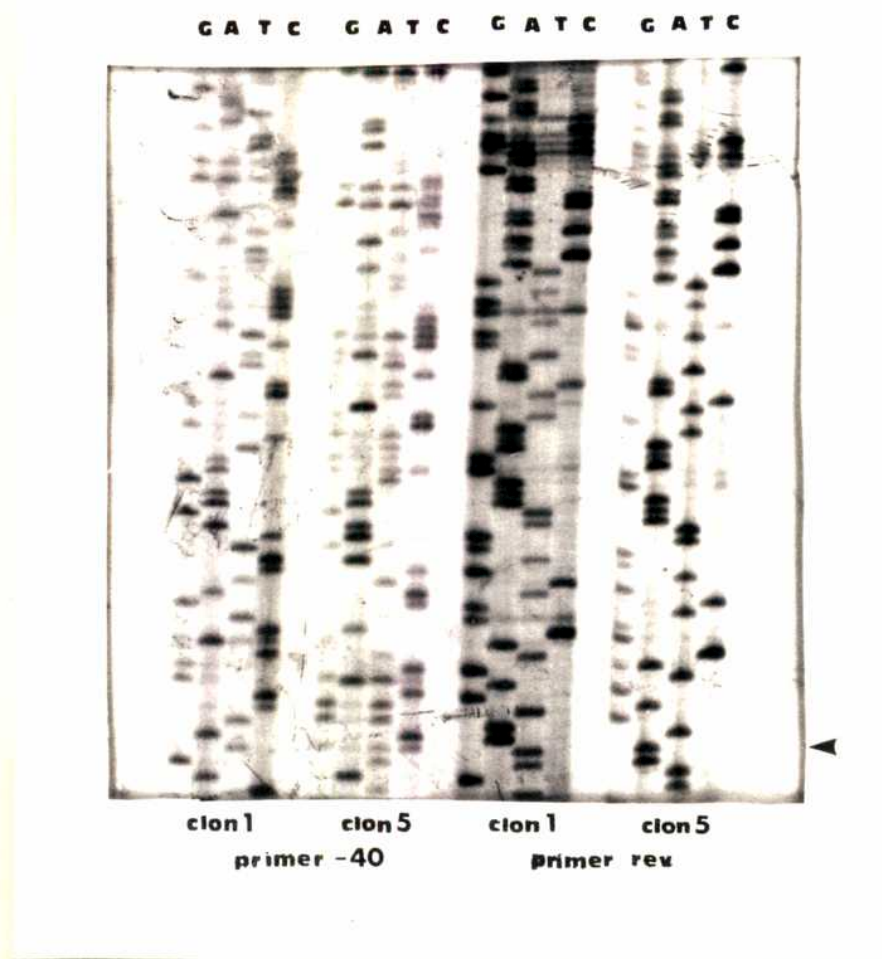
Como resultado de este experimento, se identificaron 10 clones candidatos a llevar un plásmido recombinante. Se hizo una minipreparación de plásmidos de estos 10 clones, se digirió el DNA plasmídico con las enzimas de restricción Eco RI y Hind III y se sometieron los productos de la digestión a electroforesis en un gel de agarosa al 1%. De esta manera se identificaron dos clones, el 1 y el 5 de los que se liberó un fragmento de DNA del tamaño esperado.

### B 1. 3) Secuenciación del gen de la cápside de PLRV:

Se realizó la secuenciación de DNA de doble cadena de plásmidos de dos clones (1 y 5) recombinantes, utilizando el método de terminación con dideoxinucleótidos de Sanger (ver Materiales y Métodos). Estos dos clones sólo difieren en la zona de unión del inserto al vector (la orientación 5'-3' del inserto es la misma). Por comparación de secuencias entre sí y con otras publicadas, no se encontraron evidencias de que la reacción de PCR haya introducido mutaciones o artefactos debidos a secuencias modificadas.

Uno de ellos (el 1) presenta 2 nucleótidos (AG) en la zona de unión inserto-vector en el extremo 5' que no pertenecen ni al inserto ni al vector. Asimismo, en el extremo 3' de la unión inserto vector hay una T foránea. El otro clon (el 5) perdió la T protruyente del vector en el extremo 5' de la zona de unión inserto-vector. En la figura 17 se muestra una parte de la secuencia de estos dos clones que es idéntica salvo por un desfase de 3 nucleótidos en el extremo 5' (evidenciada cuando la secuenciación se hace con el iniciador "rev") y el desfase de un nucleótido en el extremo 3' (evidenciada cuando la secuenciación se hace con el iniciador "-40"). Se marca con una flecha el ATG de iniciación de la traducción.

Figura 17:



Autoradiografía de gel de poliacrilamida al 6% (con formamida) en el que se corrieron las reacciones de secuenciación por el método de Sanger. Los "primers" "-40" y "rev" fueron los iniciadores usados para secuenciar ambas cadenas. Los clones 1 y 5 contienen el gen de cápside de PLRV y G; T; A; C indican las reacciones de terminación con: ddCTP; dATTP; ddTTP y ddGTP respectivamente.

Los oligonucleótidos comerciales "rev" y "-40" utilizados en esa etapa no permitieron secuenciar el DNA comprendido entre las posiciones 133 y 315 del gen de cápside, por hallarse esta región muy alejada de dichos iniciadores. Se sintetizaron entonces, dos nuevos oligonucleótidos de 20 bases c/u para usar como iniciadores (ver Materiales y Métodos).

La secuencia resultante se muestra en la figura 18. Se subraya el codón de iniciación, el codón de terminación y los dos oligonucleótidos usados para secuenciar.

**Figura 18:**

```

1 GCGGGATTTG CTTTAGGATT CTCATCCGCA ATCCCATITT CAGTAGCCGG
2      T      C      C C      C      A
3      T      C      C C      C      A
4      T      C      C C      T      A
5
6      C              T C      C
7      T              C T      C

51 TITATATTTA GTTTACCTAA AGATTTCTC CCACGTCCGA JCAATTGTTA
2      A              TCC      G      A      T
3      T              TCC      G      A      T
4      T              TCC      G      A      T
5
6
7

101 ATGAGTACGG TCGTGGTTAA AGGAAATGTC AATGTGTGGT TACAACAACC
2                                  C
3                                  T
4                                  T
5                                  T
6                                  T
7                                  T

151 AAGAAGGGG      TCAATCCCTTCGAG GCGGCTAAG AGAGTTCAG
2      A      G
3      A      T
4      G      G
5      G      G
6      A      G
7      A      G

201 CAGTGGTTAT GGTACGGGCC CTTGGGCAAC CCAGGCGCCG AAGACGACAG
2                                  C                                  C
3                                  C                                  C
4                                  T                                  T
5                                  T                                  T
6                                  C                                  C
7                                  C                                  T

251 AGAGGAGGCA ATCGCCGCTC AAGAAGAACT GGAGTTCCTC G
2
3
4
5
6
7

```

301 CTCAAGCGAG ACATTCGTGT TTACAAAGGA CAACCTCATG GGCAACCTCC

|   |   |   |   |
|---|---|---|---|
| 2 | G | A | T |
| 3 | G | G | A |
| 4 | G | A | T |
| 5 | C | A | T |
| 6 | G | G | T |
| 7 | G | G | T |

351 AAGGAAGTTT CACCTTCGGG CCGAGTCTAT CAGACTGTCC GGCACTCAAG

|   |   |
|---|---|
| 2 | A |
| 3 | A |
| 4 | A |
| 5 | T |
| 6 | A |
| 7 | A |

401 GATGG \_

|   |
|---|
| 2 |
| 3 |
| 4 |
| 5 |
| 6 |
| 7 |

451 TCAGTTCGTG AGCGAGGCTT CTTCACCTC CTCGGGTCC ATCGCTTATG

|   |   |   |
|---|---|---|
| 2 | T | T |
| 3 | T | T |
| 4 | T | C |
| 5 | T | C |
| 6 | T | T |
| 7 | G | C |

501 AGTTGGACCC CCATTGCAAA GTATCATCCC TCCAGTCTTA CGTCAACAAAG

|   |   |
|---|---|
| 2 | C |
| 3 | A |
| 4 | A |
| 5 | A |
| 6 | A |
| 7 | A |

551 TTCCAAATTA CGAAGGCGGG CGCCAAAAC TATCAAGCGG GGATG

|   |   |    |   |   |
|---|---|----|---|---|
| 2 | C | TC | C | T |
| 3 | A | GA | C | T |
| 4 | A | GA | C | T |
| 5 | A | GA | C | T |
| 6 | A | GA | C | T |
| 7 | A | GA | T | C |

601 CGGGGTAGAA TGGCACGATT CTTCTGAGGA TCAGTCCYCG ATACTGTGGA

|   |   |   |
|---|---|---|
| 2 | T | T |
| 3 | T | T |
| 4 | T | T |
| 5 | T | T |
| 6 | T | T |
| 7 | G | A |

651 AAGG

|   |   |
|---|---|
| 2 | A |
| 3 | G |
| 4 | G |
| 5 | G |
| 6 | G |
| 7 | A |

701 AGGGTGGCTT TGC'AAAAC'CC'CAAATAGGTA GACTCCGGAC' CAGAGCC' TGG

|   |    |   |  |   |   |
|---|----|---|--|---|---|
| 2 | GG | G |  | C | G |
| 3 | AG | A |  | T | A |
| 4 | GG | G |  | T | G |
| 5 | GG | G |  |   |   |
| 6 | GG | G |  |   |   |
| 7 | GA | G |  |   |   |

### Referencias:

- 1) Aislamiento viral hecho en el Instituto de Fitovirología, INTA-Córdoba y secuenciado en este trabajo.
  - 2) Cepa caracterizada en Wageningen, Holanda. Secuencia publicada en 1989 por Van der Wilk y col. Llamada también cepa PLRV-N (de "Neetherlands" = Países Bajos).
  - 3) Cepa I aislada de tubérculos infectados de la variedad Cara de papa en Escocia. Secuencia publicada por Mayo y col. en 1989. Llamada también cepa PLRV-S (de "Scotish").
  - 4) Aislamiento número 6 hecho y secuenciado por Tacke y col. en 1989. No aclaran cuál es la cepa secuenciada. El grupo de trabajo es alemán.
  - 5) Trabajo publicado en 1989 por Prill y col. No aclara cuál es la cepa secuenciada. El grupo de trabajo es alemán.
  - 6) Aislamiento viral hecho por Rowhani y col. en Canadá en 1979. Secuencia publicada en 1989 por Kawchuk y col. Cepa también llamada PLRV-C (Canadá).
  - 7) Aislamiento B40 hecho por Thomas en Australia en 1984. Publicado por Keese y col. en 1990. Cepa también llamada PLRV-A (Australia).
- Los trabajos 2), 3), 4), 6) y 7) reportan la secuencia de todo el genoma de PLRV. El 5) sólo incluye la secuencia de la cápside.

Fue posible, por lo tanto, analizar el grado de homología de:

a) el fragmento en estudio (gen de cápside y 100 bases de la zona 5' NC y 59 bases de la zona 3' NC) ó

b) el gen de cápside solamente,

con las otras secuencias publicadas. Los resultados se describen en la tabla 5. La homología más grande en la secuencia del gen de cápside fue con el aislamiento canadiense (89,3%) y la menor fue con el australiano (53,6%). Como puede concluirse, el aislamiento argentino es distinto a cualquiera de los aislamientos secuenciados. Las diferencias se concentran en los nucleótidos polimórficos mientras que las secuencias conservadas se mantienen iguales a los otros aislamientos publicados.

Tabla 6:

| distintos<br>aislamientos | a     | b     |
|---------------------------|-------|-------|
| 2) PLRV -<br>N            | 83,7% | 75%   |
| 3) PLRV -<br>S            | 74,4% | 71,4% |
| 4) PLRV -<br>G1           | 81,4% | 82,1% |
| 5) PLRV -<br>G2           | *     | 75%   |
| 6) PLRV -<br>C            | 81,4% | 89,3% |
| 7) PLRV -<br>A            | 48,8% | 53,6% |

Porcentaje de homología a nivel de nucleótidos de a) la región secuenciada (gen de cápside y zonas 5' y 3' NC) o b) el gen de cápside del aislamiento viral hecho en el Instituto de Fitovirología, INTA-Córdoba con respecto a la secuencia de los distintos aislamientos publicados.

Los números y abreviaturas de los aislamientos de PLRV se corresponden con los descriptos en la figura anterior.

\* En 5) se reportó la secuencia de cápside solamente.

## **B 2) Construcción de un vector adecuado para la expresión del gen de cápside de PLRV en plantas transgénicas.**

### **B 2. 1) Estrategia general:**

El paso siguiente fue construir un vector binario recombinante que tuviera el gen de la proteína de cápside viral bajo el control de un promotor y un terminador adecuados para su expresión en plantas. Para ello se reemplazó en gen *uid A* (que codifica para la  $\beta$  glucuronidasa) del vector pBI121 (Jefferson y col. 1987b) por el gen de cápside de PLRV dando lugar al plásmido pBIcpPLRV. Así, el gen de cápside viral quedó bajo el control de un promotor fuerte en plantas (el 35S del CaMV) y de un terminador adecuado. Este paso demandó dos subclonados sucesivos.

Se transformaron células de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido pBIcpPLRV. Se utilizó un clon resultante de esta transformación para el cocultivo con hojas de Huinkul-MAG heridas, según el protocolo descrito en la sección anterior.

Se obtuvieron así plantas transgénicas capaces de expresar el gen de cápside de PLRV.

## B 2. 2) Construcción del plásmido pBIcpPLRV:

Fue necesario subclonar el gen de cápside viral en el vector pBs KS(+) de manera de flanquear el inserto con los sitios de restricción adecuados para, en un siguiente paso, reemplazar el gen *uid A* de pBI121 por el gen de cápside de PLRV.

El plásmido pCRcpPLRV tiene 3 sitios de restricción para Not I. Al cortar este plásmido con Not I y Hind III se producen 4 fragmentos de 2400, 786, 350 y 150 pares de bases. El fragmento de 786 corresponde al inserto de PLRV. Para clonar este inserto en el plásmido pBS KS(+), fue necesario, por lo tanto, purificar el fragmento de 786 pb utilizando electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión. Por el mismo método se purificó plásmido pBS KS(+) cortado con las mismas dos enzimas. Se ligaron 200 ng de vector linealizado con 300 ng de inserto y con 1  $\mu$ l de la mezcla de ligación se transformaron 50  $\mu$ l de células competentes de la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*. Se plaquearon las células en LB ampicilina 100  $\mu$ g/ml. Se extrajeron plásmidos de 15 clones resultantes y se liberó el inserto con Hind III-Not I, confirmando que se trata de verdaderas colonias recombinantes. A uno de estos plásmidos se le hizo un chequeo adicional que consistió en comprobar que se linealizaba al restringir con la enzima BamH I que corta dentro del inserto de PLRV y no en el vector.

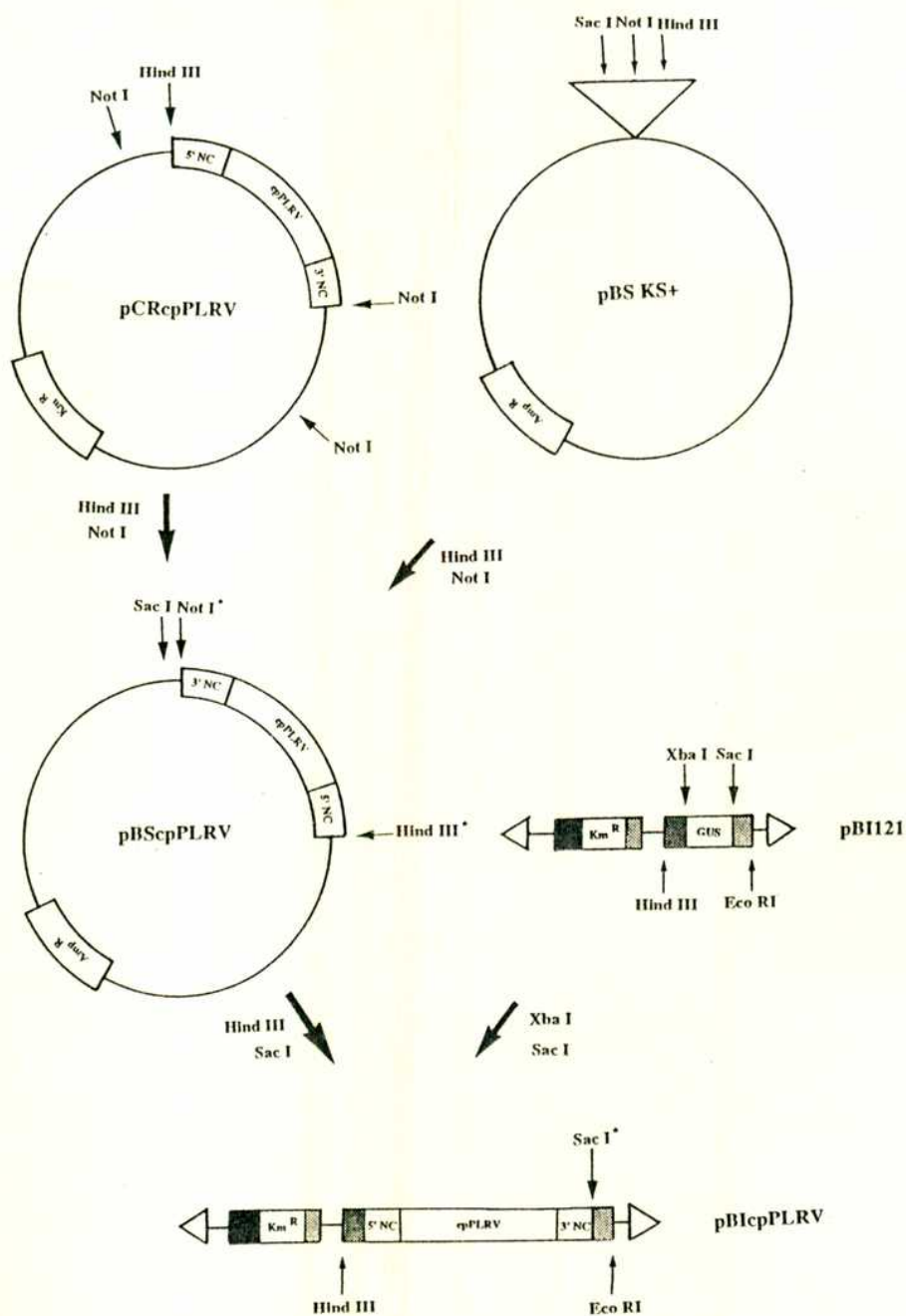
Se abrió el plásmido pBScpPLRV con Hind III y se rellenaron los extremos 5' protruyentes utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I y dNTPs. Se precipitó el DNA con NH<sub>4</sub>Ac y etanol, se resuspendió en agua y se digirió con Sac I. De esta manera se liberó un inserto de aproximadamente 790 pb que fue posteriormente purificado por agarosa de bajo punto de fusión.

Paralelamente, se eliminó el gen *uid A* de pBI121 mediante un corte con Xba I, llenado de los extremos 5' protruyentes de la misma manera que antes, y posterior digestión con Sac I. Se purificó el vector abierto resultante por electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión.

Se ligó el inserto de 790 pb de pBScpPLRV con el vector pBI121 abierto reemplazando al gen *uid A* por el gen de cápside de PLRV y parte de sus zonas 5' y 3' NC. Se transformaron células DH5 $\alpha$  competentes y se plaquearon en LB con 100  $\mu$ g/ml de kanamicina. Se extrajeron plásmidos de 10 de las colonias resultantes y se cortaron con Eco RI-Hind III. De esta manera se liberó un fragmento de 1846 pb conteniendo el promotor del transcripto de 35 S del virus del mosaico del coliflor (800 pb), el gen de cápside de PLRV y el terminador de la nopalina sintetasa (260 pb). A uno de estos plásmidos recombinantes se lo llamó pBIcpPLRV.



Figura 19:



### B 2. 3) Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 con pBIcpPLRV:

Se transformaron células de la cepa LB4404 (pAL4404) de *A. tumefaciens* con el plásmido pBIcpPLRV mediante el método de congelado-descongelado descrito en Materiales y Métodos. Luego de la transformación se plaquearon las células en medio YEB + 100 µg/ml rifampicina + 100 µg/ml estreptomycin + 100 µg/ml kanamicina. La resistencia a rifampicina está dada por un gen en el DNA cromosómico de la cepa LB4404, la resistencia a estreptomycin está en el plásmido que aporta las funciones *vir* (pAL4404) y la resistencia a kanamicina es aportada por el plásmido pBIcpPLRV.

Para confirmar que el plásmido pBIcpPLRV estaba dentro de las agrobacterias que dieron origen a colonias en medio selectivo, se extrajeron plásmidos de 10 de estas colonias y de una colonia de LB4404 sin transformar. Se digirieron estos plásmidos con Hind III y Eco RI, se corrieron en un gel de agarosa junto con plásmido pBIcpPLRV extraído a partir de *E. coli* y cortado con las mismas dos enzimas. Se confirmó que a partir de todos los clones se liberaba la banda de 1846 pb esperada ("cassette" formado por el promotor de 35S, la cápside de PLRV y el terminador de la nopalina sintetasa). Esta banda no estaba presente en la calle correspondiente a la colonia de *A. tumefaciens* LB4404 sin transformar.

### B 2. 4) Chequeo de pBIcpPLRV por restricción e hibridación:

Se chequeó al plásmido pBIcpPLRV, así como también todas las construcciones previas que le dieron origen, por restricción, Southern y posterior hibridación con el fragmento de 786 pb de la cápside de PLRV (así como también a zonas 5' y 3' NC) obtenido por PCR que está contenido en todos estos plásmidos.

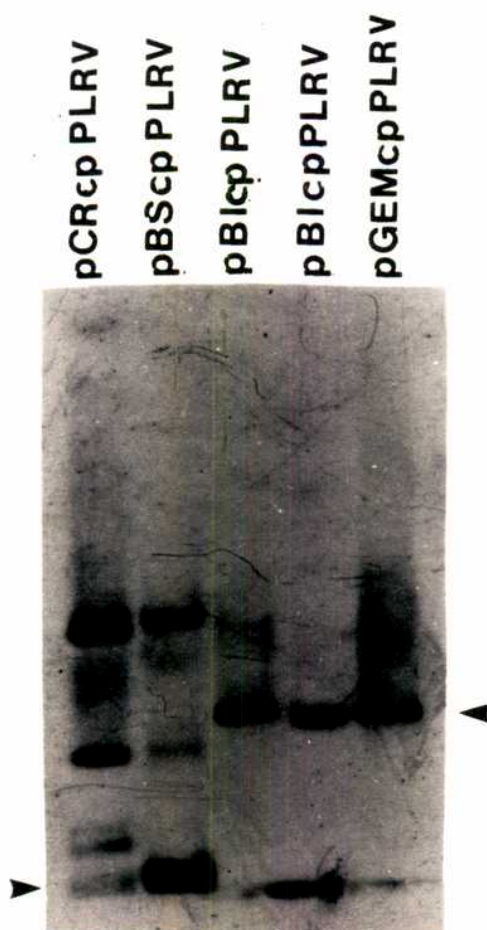
Para ello se liberó el inserto de cápside de PLRV del plásmido pCRcpPLRV mediante una digestión doble con Not I y Hind III y de pBSepPLRV con Sac I - Hind III. Si las construcciones estaban correctamente hechas, se esperaba que luego de un corte con las dos enzimas correspondientes se libere un fragmento de aproximadamente 786 pb en los dos casos.

De pBIcpPLRV (en *E. coli* y en *A. tumefaciens*) se liberó un "cassette" formado por el promotor de 35S (aprox. 800 pb), la cápside de PLRV (786 pb) y el terminador de la nopalina sintetasa (aprox. 200 pb). Esto se hizo digiriendo con Eco RI y Hind III. El fragmento liberado debería ser por lo tanto de aproximadamente 1846 pb (800 + 786 + 200).

Luego de correr los plásmidos así digeridos en un gel de agarosa, se los transfirió a una membrana de Nylon y se los hibridó con la sonda de cápside de PLRV obtenida por PCR. Como se ve en la figura 20 en todos los casos se obtuvieron las bandas esperadas. Abajo a la izquierda se marca la posición del fragmento de 786 pb y al centro a la derecha la posición del fragmento

de 1846 pb. Las bandas de tamaños mayores en los dos primeros casos (pCRcpPLRV y pBScpPLRV) son debidas a digestiones parciales.

Figura 20:



Restricción según se indica, corrida electroforética, Southern, posterior hibridación (y autoradiografía) de DNA correspondiente a las distintas construcciones, con una sonda que contiene el gen de la cápside de PLRV marcada con  $^{32}\text{P}$ -dCTP por la técnica de iniciación al azar.

pCRcpPLRV: fue digerido con Not I y Hind III.

pBScpPLRV: fue digerido con Sac I y Hind III.

pBIcpPLRV: fue digerido con Eco RI y Hind III.

Se analizó pBIcpPLRV extraído de *Escherichia coli* y de *Agrobacterium tumefaciens* por separado (calle de la izquierda y la derecha respectivamente).

pGEMcpPLRV es un derivado de pBIcpPLRV que no se discutirá.

### **B 3) Obtención de plantas de papa transgénicas para el gen de cápside de PLRV.**

#### **B 3. 1) Transformación de hojas de Huinkul-MAG con pBIcpPLRV:**

Se usó la cepa LB4404 (pAl4404 pBIcpPLRV) de *Agrobacterium tumefaciens* obtenida y chequeada como se detalla más adelante, para transformar discos de hoja de papa, del cultivar Huinkul-MAG, utilizando el protocolo descrito en la sección anterior.

Se hicieron 3 ensayos de transformación independientes llamados E3, E4, y E5.

En todos los casos se hicieron los 3 controles descritos en la Introducción (cantidad de explantos por control: entre 10 y 15). Los controles 2 y 3 se hicieron con la cepa LB4404 (pAl4404) de *Agrobacterium tumefaciens*.

La eficiencia de regeneración en medio no selectivo fue del 100% para los explantos tratados o no con *Agrobacterium* (controles 2 y 1, ver Introducción).

En ningún caso se obtuvieron callos verdes ni regeneración en los explantos correspondientes al control 3 en medio selectivo. Las hojas se tornaron amarillas paulatinamente hasta que murieron. El ensayo E3 sufrió graves problemas de contaminación, por lo que no se incorporará en el cuadro que sigue. De todos modos, en este ensayo se obtuvieron 8 plantas capaces de enraizar en medio selectivo. Dos de ellas son E3A3 y E3A5 que se analizarán más adelante. En este ensayo se incluyeron hojas del cultivar Spunta, además de Huinkul-MAG, las que fueron cocultivadas por separado. A partir de ellas se obtuvieron 3 plantas llamadas SpuA, SpuB y SpuC capaces de enraizar en medio selectivo.

El ensayo E4 tuvo un  $n$  inicial de 112 que disminuyó a 81 por contaminación en algunas de las placas de Petri donde se hizo el cocultivo.

El ensayo E5 tuvo un  $n$  inicial de 159 que disminuyó a 82 por contaminación.

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos:

**Tabla 7:**

|                                                   | E4                 | E5                 |
|---------------------------------------------------|--------------------|--------------------|
| n= n° explantos iniciales<br>en km 50             | 81                 | 82                 |
| x= n° de explantos que<br>dieron plantas en km 50 | 27                 | 10                 |
| y= n° de plantas obtenidas<br>en km50             | 46                 | 28                 |
| y/x                                               | 46/27 =1,7         | 28/10 =2,8         |
| (y/n) . 100 Ef. A                                 | (46/81) .100=56,8% | (28/82) .100=43,1% |
| (x/n) . 100 Ef. E                                 | (27/81) .100=33,3% | (10/82) .100=12,2% |

Distintos parámetros de dos ensayos (E4 y E5) de transformación de *Solanum tuberosum* cv. Huinkul-MAG mediante la técnica de transformación de discos de hoja con la cepa LB4404 (pAI 4404) de *Agrobacterium tumefaciens* que lleva el vector pBIcpPLRV.

Ef A: eficiencia de transformación en sentido amplio.

Ef E: eficiencia de transformación en sentido estricto.

Se obtuvo entonces un total de 82 plantas del cultivar Huinkul-MAG (8 de E3, 46 de E4 y 28 de E5) y 3 plantas del cultivar Spunta capaces de enraizar en medio selectivo.

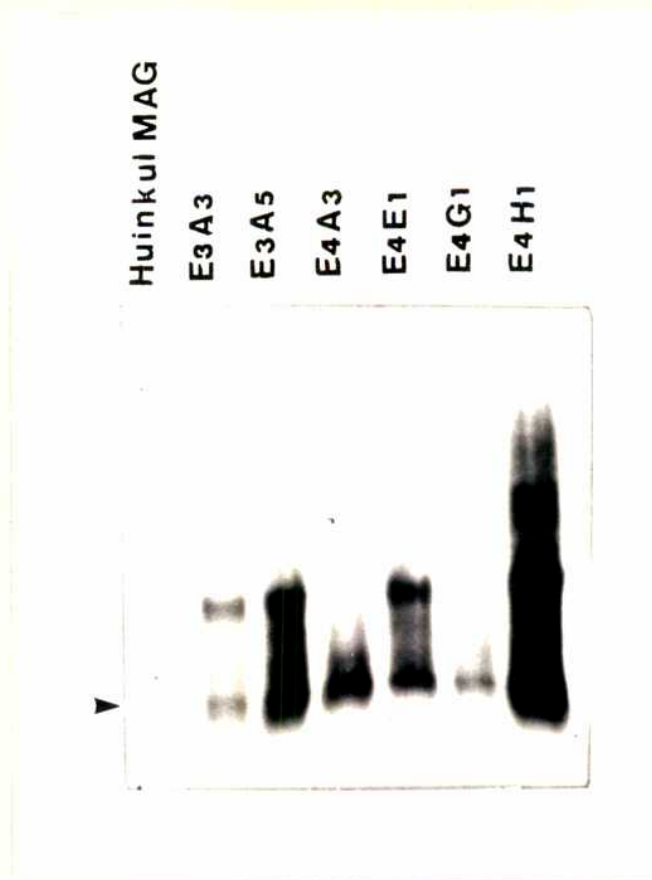
En el experimento 4 (E4) se obtuvo una eficiencia de transformación incluso superior a la obtenida en los ensayos de puesta a punto del sistema con el plásmido que lleva GUS-intrón y la misma cepa de *Agrobacterium tumefaciens*.

### **B 3. 2) Chequeo de las plantas de papa transgénicas para el gen de cápside de PLRV:**

La evaluación de las plantas obtenidas en los distintos ensayos de transformación con la cepa LB4404 (pAI4404 pBIcpPLRV) se hizo por Northern.

Se extrajo RNA de 6 plantas: E3A3, E3A5, E4A3, E4E1, E4G1 y E4H1, además de RNA de Huinkul-MAG (control negativo). Como sonda se utilizó el fragmento de 786 pb que contiene el gen de cápside de PLRV obtenido por PCR. La autoradiografía correspondiente se muestra en la figura 21.

Figura 21:



Se corrieron 20 µg de RNA total de plantas mediante electroforesis desnaturizante de agarosa al 1,5 %. Las muestras provinieron de: E3A3, E3A5, E4A3, E4E1, E4G1 y E4H1, es decir distintas plantas que resultaron de la transformación de Huinkul-MAG con la cepa LB4404 (pAI4404 pBIcpPLRV) de *Agrobacterium tumefaciens*.

Huinkul-MAG es el control negativo.

El RNA se transfirió a un filtro de Nylon por la técnica de Northern y se hibridó con un fragmento obtenido por PCR que contiene el gen de cápside de PLRV marcado con  $\alpha$   $^{32}\text{P}$ -CTP por la técnica de iniciación al azar. La figura corresponde a la autoradografía resultante.

La flecha marca la posición de una banda de bajo peso molecular presente en todas las plantas analizadas con excepción del control negativo. Esta banda probablemente corresponda al mRNA de la cápside de PLRV que se está expresando en la planta transgénica correspondiente.

La detección del RNA del transgén por Northern blot llevó a analizar la presencia de proteína de cápside. Como se mencionó más adelante, en los ensayos biológicos se

realizaron ELISAs de 20 genotipos transgénicos no pudiendo detectarse cápside viral, lo cual indica que de sintetizarse, el nivel debe ser inferior a los 5 ng/g de hoja, que es el nivel de sensibilidad de este método.

#### **B 4) Actividad biológica de las plantas transgénicas para el gen de cápside frente al desafío con áfidos infectados con PLRV:**

Con el objetivo de hacer una preselección de los distintos candidatos a ser utilizados en ensayos posteriores, se realizó un ensayo de infección de distintos individuos que expresan el gen de cápside de PLRV, posterior cuantificación de la multiplicación viral por ELISA y observación cualitativa de los síntomas producidos por la infección por PLRV.

Se pasaron a maceta seis plantas (clones entre sí) de cada uno de 20 genotipos transgénicos obtenidos en la transformación del cultivar Huinkul-MAG con la cepa LBA4404 (pAL4404) que lleva el vector pBIcpPLRV y seis plantas de Huinkul-MAG sin transformar (como control negativo). En todos los casos se utilizaron plantas crecidas *in vitro* de un mes de edad que fueron transferidas a maceta.

Previo al ensayo se confirmó la ausencia de PLRV, PVX y PVY por ELISA. Cabe aclarar que en el caso de las plantas transgénicas se mide acumulación de virus solamente, ya que la proteína de cápside que estas plantas expresan constitutivamente está por debajo del límite de detección del ELISA.

Luego de 9 días del transplante a tierra cada planta se infectó con 15 ninfas de *Myzus persicae* que previamente se habían alimentado sobre *Solanum tuberosum* cv. Ballenera o *Datura stramonium* con infección secundaria con PLRV. A los 13 días se eliminaron los áfidos tratando las plantas con el insecticida Pirimicarb®.

Al mes de comenzada la infección, se hizo una observación de los síntomas debidos a PLRV y a los 38 días del comienzo de la infección se hizo un ensayo de ELISA a cada una de las plantas infectadas por separado.

Los síntomas característicos de la infección por PLRV son:

- a) enrollado de hoja. Puede observarse a simple vista o, en los casos en donde es leve, apretando suavemente la hoja desde los bordes laterales: la hoja se pliega sobre el eje de la nervadura central.
- b) necrosis de la hoja, especialmente en los bordes.
- c) disminución en la velocidad de crecimiento.

A las plantas que presentaron alguno de estos síntomas se las clasificó como "con síntomas" independientemente de la severidad de los mismos.

Los resultados de este ensayo se volcaron en la tabla 8.



**Tabla 8:**

| individuos | n° de clones | proporción de plantas con síntomas | ELISA de c/u de los clones                | X ELISA | menor proporción de plantas con síntomas que Huinkul | menor lectura en ELISA que Huinkul |
|------------|--------------|------------------------------------|-------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------|------------------------------------|
| E4A1       | 6            | 0,83                               | 0,02<br>0<br>0<br>0,09<br>0<br>0          | 0,018   |                                                      |                                    |
| E4A2       | 6            | 0,83                               | 0,02<br>0<br>0,05<br>0,14<br>0,07<br>0,24 | 0,087   |                                                      |                                    |
| E4A3       | 6            | 1,00                               | 0,05<br>0<br>0<br>0<br>0,1                | 0,025   |                                                      |                                    |
| E4A4       | 5            | 1,00                               | 0<br>0,36<br>0<br>0,05<br>0               | 0,082   |                                                      |                                    |
| E4C1       | 5            | 0,20                               | 0,62<br>0,72<br>0,55<br>0,65<br>0,75      | 0,658   |                                                      |                                    |
| E4D1       | 3            | 0,33                               | 0,29<br>0,82<br>0,37                      | 0,493   | *                                                    |                                    |
| E4E1       | 4            | 1,00                               | 0<br>0,01<br>0,03<br>0,16                 | 0,05    |                                                      | *                                  |
| E4F1       | 5            | 0,20                               | 0,49<br>0,80<br>0,17<br>0,70<br>0,84      | 0,60    |                                                      |                                    |



|      |   |      |                                              |       |  |  |
|------|---|------|----------------------------------------------|-------|--|--|
| E4F2 | 6 | 1,00 | 0,89<br>0,85<br>0,88<br>0,74<br>0,34<br>0,95 | 0,775 |  |  |
| E4F3 | 6 | 0,50 | 0,81<br>0,72<br>0,63<br>0,17<br>0,70<br>0,80 | 0,638 |  |  |
| E4G1 | 6 | 0,83 | 0,01<br>0<br>0<br>0<br>0<br>0                | 0,002 |  |  |
| E4G3 | 6 | 1,00 | 0,01<br>0,02<br>0<br>0<br>0<br>0             | 0,005 |  |  |
| E4H1 | 6 | 0,83 | 0,85<br>0,43<br>0,98<br>0,91<br>0,89<br>0,93 | 0,832 |  |  |
| E3A1 | 6 | 0,67 | 0,87<br>0,83<br>0,90<br>0,91<br>0,31<br>0,85 | 0,778 |  |  |
| E3A3 | 6 | 1,00 | 0,66<br>0,83<br>0,83<br>0,12<br>0,25<br>0,67 | 0,56  |  |  |
| E3A4 | 5 | 0,40 | 0,35<br>0,06<br>0,01<br>0<br>0,04            | 0,092 |  |  |
| E3A5 | 6 | 0,5  | 0,03<br>0,57<br>0,24<br>0,63<br>0<br>0,12    | 0,265 |  |  |

|             |   |      |                                           |       |  |  |
|-------------|---|------|-------------------------------------------|-------|--|--|
| E3A6        | 6 | 0    | 0<br>0<br>0,36<br>0,01<br>0<br>0,70       | 0,178 |  |  |
| E3A7        | 6 | 0    | 0<br>0<br>0<br>0<br>0<br>0,84             | 0,140 |  |  |
| E3A8        | 6 | 0,33 | 0,11<br>0<br>0<br>0,06<br>0,94<br>0,74    | 0,308 |  |  |
| Huinkul-MAG | 6 | 0,67 | 0,06<br>0,13<br>0,76<br>0,09<br>0,06<br>0 | 0,183 |  |  |

Se infectaron varios clones de distintos genotipos transgénicos resultantes de la transformación de Huinkul-MAG con la cepa L.B4404 (pAI4404 pBIcpPI.RV) de *Agrobacterium tumefaciens* y plantas de Huinkul-MAG sin transformar con 15 adultos de *Myzus persicae* que previamente se habían alimentado en plantas con infección secundaria de PI.RV. Se muestran los resultados de la observación de los síntomas debidos a PI.RV, las lecturas de ELISA hechas sobre c/u de distintos clones de un mismo individuo y la media de los valores de ELISA de cada individuo.

Se esperaban obtener dos grupos de plantas: susceptibles (con síntomas y multiplicación viral) y resistentes (pocos síntomas y demora en la replicación del virus). Sin embargo, como se desprende de la tabla, hay plantas de los cuatro grupos posibles:

- a) con menor proporción de síntomas y menor acumulación de virus que Huinkul-MAG: E3A4, E3A6 y E3A7.
- b) con mayor proporción de síntomas y menor acumulación de virus que Huinkul-MAG: E4A1, E4A2, E4A3, E4A4, E4E1, E4G1, E4G3.
- c) con menor proporción de síntomas y mayor acumulación de virus que Huinkul-MAG: E4C1, E4D1, E4F1, E4F3, E3A5 y E3A8.
- d) con mayor proporción de síntomas y mayor acumulación de virus que Huinkul-MAG: E4F2, E4H1, E3A3.

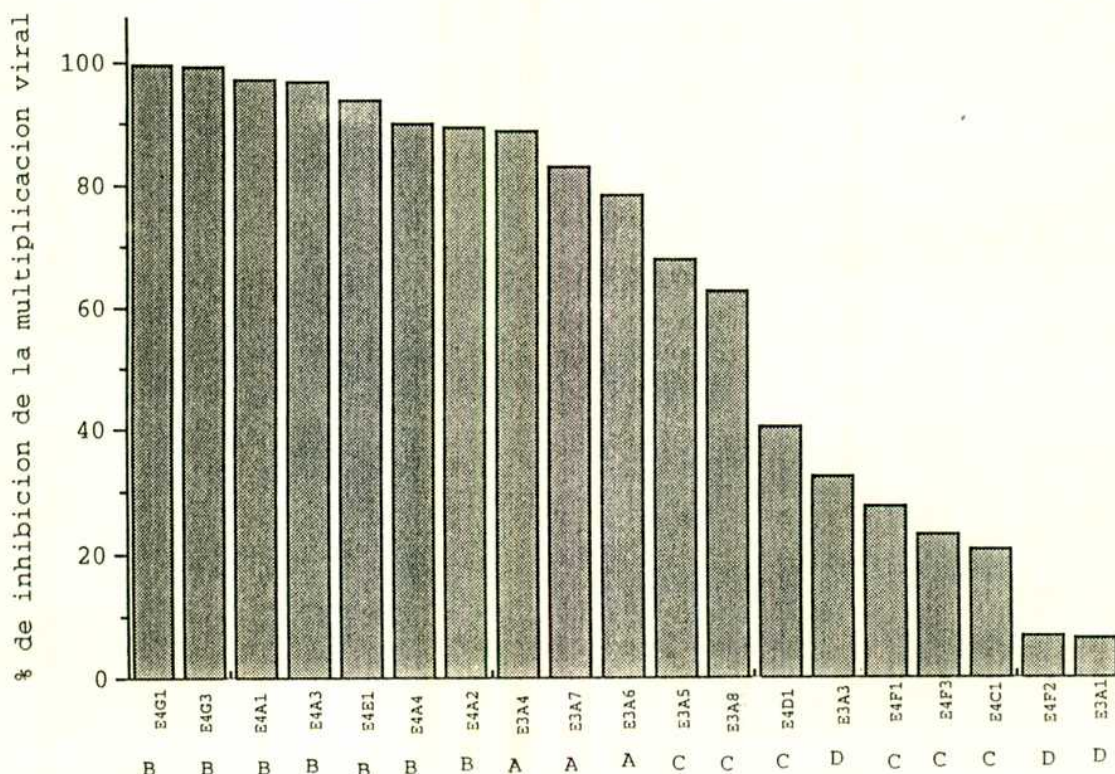
E3A1 tiene igual proporción de síntomas pero mayor acumulación de virus.

La media de los promedios de ELISAs de los distintos individuos de cada grupo es:

- a) 0,137      c) 0,494.  
b) 0,038      d) 0,722.

Como se deduce de la tabla, hay varios clones del cultivar Huinkul-MAG que claramente escaparon a la infección, ya que rindieron valores de 0 ó cercanos a 0 y se trata de un cultivar susceptible a PLRV (no presenta genes de resistencia). Como consecuencia, el ensayo quedó sin punto de referencia para cuantificar la inhibición de la multiplicación viral. Por esta razón, "parece" que el virus multiplica más en varias de las plantas transgénicas que en Huinkul-MAG. Para tratar de solucionar este problema, se tomó a la "peor" transgénica (es decir E4H1, ya que es la planta en la que el virus replicó más) como punto de referencia en lugar de Huinkul-MAG. Por lo tanto se consideró al valor 0,832 como 100% de multiplicación (y por lo tanto 0% de inhibición de la multiplicación viral), y se refirieron los datos de multiplicación en las otras plantas transgénicas a éste valor. En la figura 22 se muestran los porcentajes de inhibición de la multiplicación viral tomando como 0% de inhibición a E4H1.

Figura 22:



Porcentaje de inhibición de la multiplicación viral producido en las distintas plantas transgénicas (y cuantificado por ELISA) luego de la infección de las mismas con 15 áfidos que previamente se habían alimentado en plantas con infección secundaria de PLRV. Los datos se refirieron al valor de multiplicación que ocurrió en la planta E4H1.



Como se desprende de la figura 22, las plantas del grupo b) resultaron las más protegidas frente a la infección con PLRV ya que presentaron inhibición en la multiplicación viral de aproximadamente entre el 100% y el 90% con respecto a la acumulación viral ocurrida en la planta E4H1. Les siguieron las plantas pertenecientes al grupo a) (inhibición en la multiplicación viral entre el 89% y 78%) y las plantas pertenecientes al grupo c) (inhibición en la multiplicación viral entre el 68% y 23%).

En la figura 23 se muestra a una planta E4H1 y a una planta de Huinkul-MAG a los 40 días de comenzada la infección con los áfidos que llevaban PLRV. Como se ve ambas plantas presentan síntomas. E4H1 pertenece al grupo d) y es aquella planta que acumuló más virus.

Figura 23:



E4H1 (a la izquierda) y Huinkul-MAG (a la derecha), a los 40 días de comenzado el ensayo.

La figura 24 se muestra una planta E4G1 y una planta de Huinkul-MAG a los 40 días de comenzada la infección con los áfidos que llevaban PLRV. Esta planta pertenece al grupo b) y es la que resultó más protegida (es decir en donde se observó una mayor inhibición de la multiplicación viral). La planta transgénica presentó síntomas en sus hojas inferiores, pero creció más que Huinkul-MAG (que se encuentra a su derecha). En la figura 25 se muestra una aproximación del ápice de la planta E4G1 que no presenta síntomas.

Figura 24:



Figura 25:



E4G1 (a la izquierda) y Huinkul-MAG (a la derecha), a los 40 días de comenzado el ensayo.  
Aproximación del ápice de la planta E4G1.

En la figura 26 se muestra una planta E3A6 y una planta de Huinkul-MAG a los 40 días de comenzada la infección con los áfidos que llevaban PLRV. Esta planta pertenece al grupo a), es decir presentó menor proporción de síntomas pero acumuló más virus que en Huinkul-MAG.



Figura 26:



E3A6 (a la izquierda) y Huinkul-MAG (a la derecha), a los 40 días de comenzado el ensayo.

**C: OBTENCION DE PLANTAS DE PAPA TRANSGENICAS RESISTENTES A INSECTOS POR EXPRESION DE LA DELTAENDOTOXINA DE *BACILLUS THURINGIENSIS*:**

**C 1) Obtención de plantas transgénicas para el gen *bt 884*:**

Una parte de este trabajo es parte de una colaboración entre laboratorios de distintos países que incluyen al CINVESTAV de Irapuato, México. Es por ello que se trabajó no sólo con cultivares de interés para Argentina sino también para México, como es el caso del cultivar Alpha de *Solanum tuberosum* de uso en México.

Las plantas transgénicas denominadas Alfa 1 y Alfa 2 fueron el resultado de una transformación con el plásmido pBT1 (cuyo mapa se muestra en la figura 5) que lleva el gen *bt 884* (un fragmento del gen *bt2* de la toxina de *Bacillus thuringiensis* subesp. Berliner 1715 que codifica para la porción activa de la toxina) bajo el control del promotor de la fructopina sintetasa (PTR2') y de un terminador adecuado. Según Phocroen y col. (1990), este promotor es inducible por daño en plantas, si bien no muestra ni cita evidencias experimentales de ello.

Para la transformación se usó la cepa LBA4404 (pAL4404) de *Agrobacterium tumefaciens* que lleva, además al plásmido pBT1.

El protocolo de transformación utilizado fue el descrito en Materiales y Métodos salvo que las plantas del cv. Alpha se micropropagaron en medio MSS y la regeneración se hizo en un medio con glucosa 1,6%.

**C 2) Evaluación de las plantas transgénicas:**

Para determinar que se trataba de plantas transgénicas y no de escapes a la presión de selección, se realizó un ensayo de actividad de neomicina fosfotransferasa.

Para determinar si el gen de interés estaba integrado al genoma de la planta, se hicieron ensayos de Southern "blot".

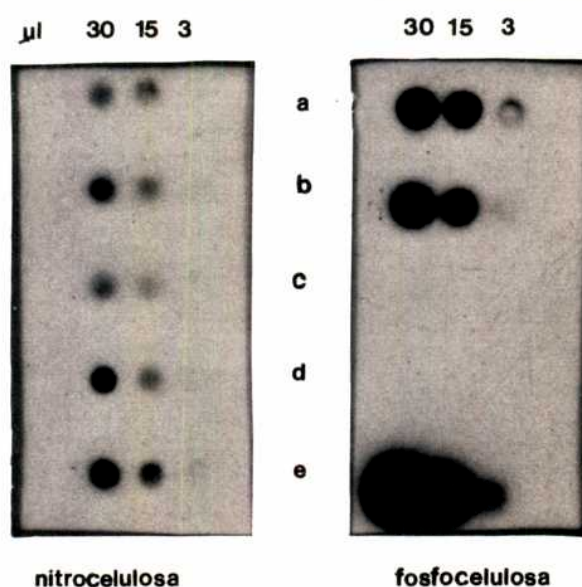
Para determinar si el gen se transcribía, se hicieron ensayos de Northern "blot".

Por último, para determinar si las plantas Alfa 1 y/o Alfa 2 presentaban actividad insecticida frente a un Lepidóptero minador se hicieron ensayos de actividad biológica estudiando la sensibilidad de larvas de polilla del tomate (*Scrabipalpuloides absoluta* (Meyrick)) a la toxina que estas plantas teóricamente expresaban.

C 2.1) Ensayo de actividad del producto del gen marcador (NPT II) en las plantas transgénicas para el gen *bt 884*:

En la figura 27 se muestra el resultado del "dot blot" hecho con las plantas transgénicas y los controles positivos y negativos correspondientes.

Figura 27:



Determinación de actividad neomicina fosfotransferasa mediante "dot blot" de proteínas incubadas con  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP y neomicina.

a) y b) Plantas Alfa 1 y Alfa 2 a testar.

c) Huinkul-MAG sin transformar (control negativo).

d) Tabaco sin transformar (control negativo).

e) Tabaco transformado con pMON 9749 que lleva el gen *neo* (control positivo).

Se sembraron cantidades decrecientes de la mezcla de reacción final: 30, 15 y 3  $\mu\text{l}$ .

Puede concluirse de este experimento que las plantas Alfa 1 y Alfa 2 expresan actividad NPT II, es decir están transformadas. No se trata, por lo tanto, de escapes a la presión de selección.

C 2.2) Detección del transgén de la entomotoxina y de su transcripto por Northern y Southern:



#### C 2.2.1) Amplificación de la porción tóxica del gen *bt2* por PCR:

Con el objeto de obtener una sonda adecuada para detectar el gen de la toxina de BT (en el caso de Southern) y mRNA correspondiente a esta toxina (en el caso de Northern), en las plantas Alfa 1 y Alfa 2, se amplificó por PCR un fragmento de 1871 pb correspondiente a los primeros 1860 nt del gen *bt2* de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* así como también a 11 nt de la zona 5' NC de este gen.

Como templado para la PCR se usó DNA del plásmido pES1, que contiene todo el gen de la toxina de *Bacillus thuringiensis* (3527 pb) además de 527 nt de la zona 5' NC y 168 nt de la zona 3' NC.

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados *ad hoc* con la ayuda del programa Oligo Versión 3.3. Como estos oligos no son completamente homólogos al templado, ya que incluyen sitios Bam HI en los extremos de cada uno de ellos que no estaban en la secuencia original, se optó por una temperatura baja de anillado: 50°C.

Las condiciones de la PCR se detallan en Materiales y Métodos.

Luego de la reacción, se sembró 1/5 del volumen final en un gel de agarosa al 1%. Luego de la electroforesis se observó una sola banda del tamaño previsto. Se utilizó la técnica de marcación por iniciación al azar para marcar el DNA así amplificado con  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP y usarlo como sonda tanto para Southern como para Northern.

#### C 2.2.2) Detección del gen *bt 884* en el genoma de las plantas transgénicas mediante Southern:

En la figura 28 se muestra la corrida en un gel de agarosa de DNAs extraídos de plantas transgénicas y de los controles correspondientes digeridos con la enzima Hind III. Esta enzima corta en dos sitios dentro del DNA transferido de la bacteria que lleva el vector pBT1 (usada en la transformación) al genoma de las plantas Alfa 1 y Alfa 2, liberándose un fragmento de aproximadamente 4 kpb que contiene al gen *bt 2* truncado (el gen *bt 884*). El gel de la figura 28 se transfirió por la técnica de Southern y se hibridó con el fragmento de DNA del gen *Bt 2* amplificado por PCR marcado con  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. La autoradiografía correspondiente se muestra en la figura 29.

Figura 28:

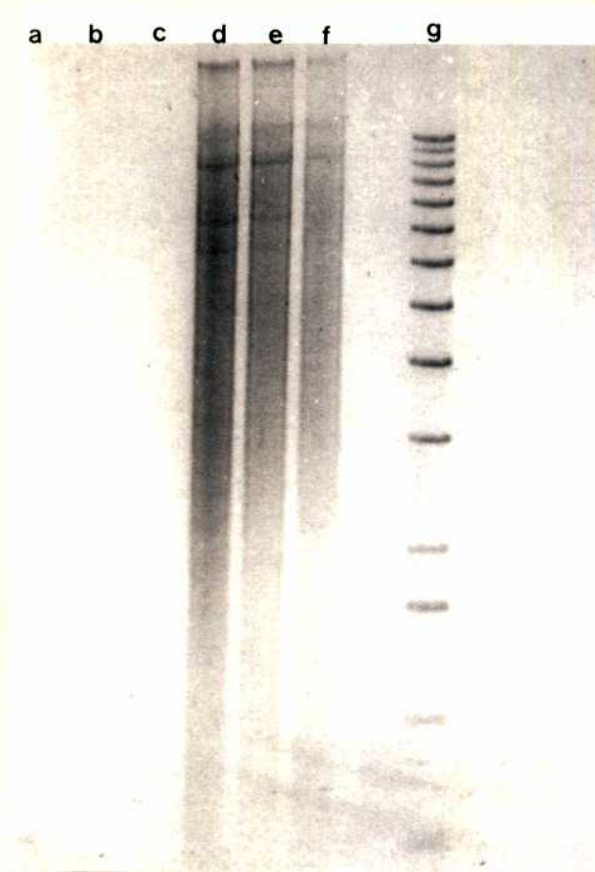


Figura 29:

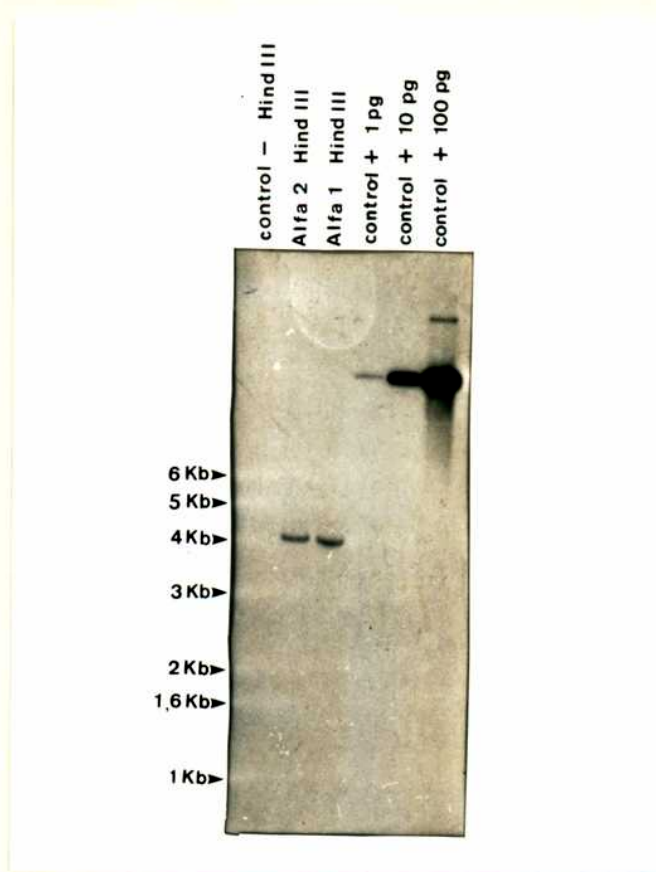


Figura 28: Calles A, B, C: Como control positivo se sembraron 100, 10 y 1 pg de DNA complementario a la sonda a usar en la hibridación: se trata de 885, 88,5 y 8,85 pg del plásmido pES1 linealizado (el DNA complementario a la sonda es un 11,3% del plásmido ya que el plásmido pES1 tiene aprox. 17,75 kpb y la zona complementaria a la sonda tiene 2 kpb).

Calles D, E y F: 20 µg de DNA de Alfa 1, Alfa 2 y Huinkul-MAG (como control negativo) digeridos con Hind III. Calle G: marcador de peso molecular.

Figura 29: Las calles rotuladas como control positivo 100, 10 y 1 de la figura 29 corresponden a las calles A, B y C de la figura 28.

En las calles rotuladas Alfa 1 y Alfa 2 (calles D y E de la figura 28) de la figura 29 se ve una banda del tamaño esperado: 4 kpb que no está presente en el control negativo (calle F de la figura 28). Se demuestra por lo tanto que el gen *bt 884* está incorporado al genoma de Alfa 1 y Alfa 2.

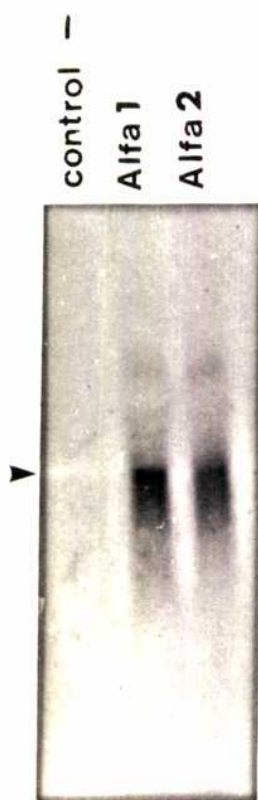
#### C 2.2.3) Northern: Detección del mRNA correspondiente al gen *bt 884* en Alfa 1 y Alfa 2:

Una vez detectado el gen *bt 884* en el genoma de Alfa 1 y Alfa 2 fue fundamental determinar si este gen se transcribía, es decir si se sintetizaba el mRNA correspondiente.

Se corrieron 20 µg de RNA total de Alfa 1 y Alfa 2 así como también de Huinkul-MAG como control negativo. Como sonda se usó el fragmento de DNA del gen *bt 2* amplificado por PCR (usado en el Southern).

Como se muestra en la figura 30 tanto en Alfa 1 como en Alfa 2 hay mRNA correspondiente al gen *bt 884*.

Figura 30:



Se corrieron 20 µg de RNA total de plantas mediante electroforesis desnaturizante de agarosa al 1,5 %. Las muestras provinieron de: Huinkul-MAG como control negativo, Alfa 1 y Alfa 2.

El RNA se transfirió a un filtro de Nylon por la técnica de Northern y se hibridó con un fragmento obtenido por PCR que contiene el gen *bt 2* marcado con  $\alpha$   $^{32}\text{P}$ -CTP por la técnica de iniciación al azar. La prehibridación e hibridación se hicieron tal como se describe en la puesta a punto de los Northern. La figura corresponde a la autorradiografía resultante.

#### C 2.2.4) Inmunodot: Detección de la entomotoxina de BT en Alfa 1 y Alfa 2.

Para evaluar el nivel de proteína (toxina) sintetizada por las plantas transgénicas se tomaron 300 mg de hoja de plantas micropropagadas, las cuales se homogenizaron en el buffer de extracción y, luego de una clarificación a máxima velocidad, se sembraron en



membranas de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con anticuerpos policlonales anti-toxina Bt, con un segundo anticuerpo anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina y revelado con nitroazul de tetrazolio (NBT) y 5-Br-4-Cl-3-indolilfosfato (BCIP). Dado que no se pudieron detectar señales positivas en las muestras de Alfa1 y Alfa2, el experimento se repitió usando AMPPD como sustrato, para aumentar la sensibilidad. La detección se hizo por fluorografía de la quimioluminiscencia generada por la membrana en el transcurso de una noche, tal como se observa en la figura 31.

Figura 31



Se sembraron 100 µl de 4 diluciones seriadas al medio partiendo del "tal cual", de extractos de proteínas de Alfa 1, Alfa 2 y Huinkul-MAG (como control negativo). Asimismo se sembraron 100 µl de 4 diluciones seriadas al décimo partiendo de la 1/10 del cultivo de *B.thuringiensis*. La figura es el resultado de la exposición de la membrana durante toda la noche

La figura muestra que el control positivo que consiste en un extracto diluído de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. kurstakii produce una clara señal, mientras que no se pudo detectar reacción en los extractos vegetales. Si bien no fue posible cuantificar la sensibilidad de este ensayo, resulta claro que el nivel de expresión de la proteína de interés es bajo.

### **C 3) Bioensayo de las plantas transgénicas: Sensibilidad de larvas de polilla del tomate a la ingesta de hojas de las plantas transformadas:**

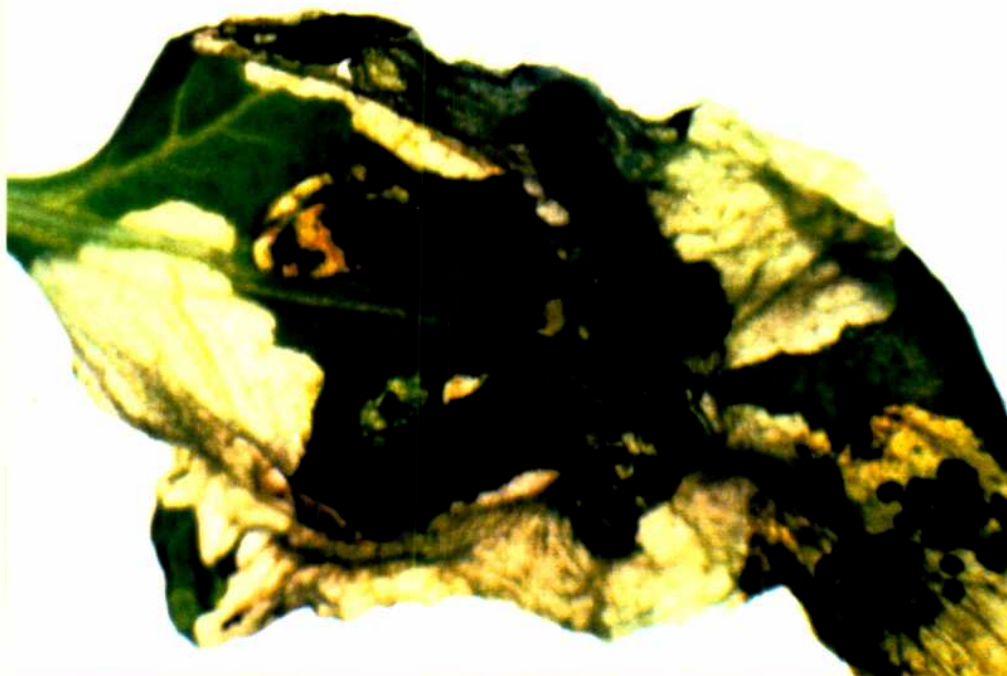
Para obtener plantas rusticadas para el siguiente ensayo de actividad biológica, se pasaron plantas de Alfa 1, Alfa 2, así como también de dos testigos negativos Huinkul-MAG y Spunta crecidas *in vitro*, a maceta (ver Materiales y Métodos).

Con el objeto de comprobar que la población de *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick) a utilizar en el ensayo no presentaba problemas para completar su desarrollo usando a la papa como recurso alimentario, se realizó una generación completa del lepidóptero sobre plantas de papa. Como resultado de esta primera generación se obtuvieron 300 pupas, indicando que esta fuente alimentaria permite la multiplicación del insecto con eficiencia similar a la del huésped natural en las condiciones de laboratorio.

Los adultos obtenidos a partir de estas pupas fueron liberados en una jaula de vidrio conteniendo 10 plantas de cada tipo: Alfa 1, Alfa 2, Huinkul-MAG y Spunta, con el propósito de obtener una cantidad adecuada de huevos. Tras 72 hs de exposición, se separaron los 4 grupos de plantas en jaulas individuales y se contó el número de huevos por planta. Se mantuvieron entre 130 y 140 huevos por planta. Las condiciones ambientales empleadas en este ensayo se describen en Materiales y Métodos.

A dos semanas de la eclosión de las larvas, se observaron galerías y larvas vivas tanto en las hojas de las plantas transgénicas Alfa 1 y Alfa 2 como en los controles Huinkul-MAG y Spunta. A pesar de ello, el daño observado (tamaño y número de galerías) en las plantas transgénicas fue considerablemente menor al registrado en las plantas control.

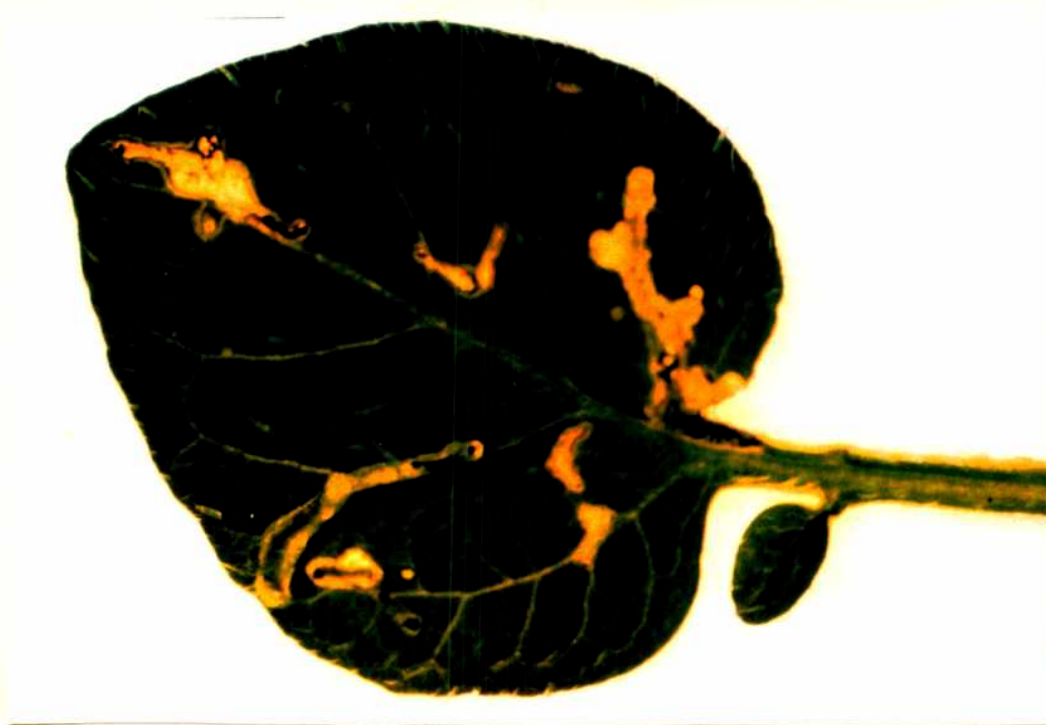
Figura 32:



Detalle de una hoja de una planta control (Huinkul-MAG) a dos semanas de la eclosión de las larvas de *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick).



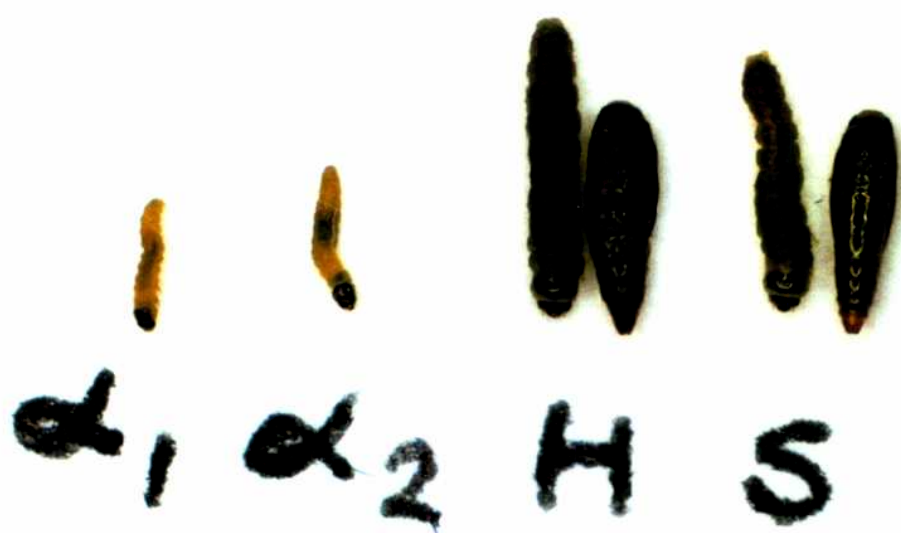
Figura 33:



Detalle de una hoja de una planta Alfa 1 a dos semanas de la eclosión de las larvas de *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick).

Asimismo, el desarrollo de las larvas criadas sobre las plantas transgénicas fue menor que el observado en las plantas testigo. Las larvas que estaban sobre las plantas Alfa 1 y Alfa 2 no alcanzaron el estado de pupa y, por lo tanto, tampoco el de adulto. En cambio, el desarrollo larval en las plantas control se completó normalmente.

Figura 34:



Desarrollo alcanzado por las larvas de *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick) sobre las plantas transgénicas Alfa 1 ( $\alpha_1$ ), Alfa 2 ( $\alpha_2$ ), y sobre los controles Spunta (S) y Huinkul-MAG (H). Junto a las larvas desarrolladas en la planta control se muestran las pupas correspondientes.

## **D: OBTENCION DE PLANTAS DE PAPA TRANSGENICAS RESISTENTES A HERBICIDAS TOTALES:**

### **D 1) Obtención de plantas de papa transgénicas para el gen *bar*:**

Se utilizó el protocolo de transformación de discos de hoja de papa para la obtención de plantas de *Solanum tuberosum* cv. Huinkul-MAG resistentes a herbicidas por expresión del gen *bar*. Se hizo un ensayo pequeño, ya que se partió de 25 discos de hojas. Durante el ensayo hubo graves problemas de contaminación, por lo que se descartaron muchos explantos. Todo esto hizo imposible el cálculo de la eficiencia tanto de regeneración como de transformación en este ensayo. De todas maneras, se obtuvo una planta capaz de enraizar en medio selectivo (kanamicina 50 µg/ml) en adelante llamada AE2.

### **D 2) Chequeo *in vitro* de la resistencia a fosfinotricina:**

Para chequear si Huinkul-MAG presentaba o no resistencia natural (en condiciones de laboratorio) al herbicida comercial Basta®, se hizo, en una primera etapa, una curva de sensibilidad de ápices de *Solanum tuberosum* cv. Huinkul-MAG sin transformar a distintas concentraciones de Basta® en el medio de cultivo *in vitro*. Para ello se hicieron dos ensayos sucesivos.

En el primero se colocaron ápices en 4 concentraciones crecientes de fosfinotricina: 25, 50, 100 y 200 mg/l, además de un control sin fosfinotricina. Se utilizaron 10 ápices por cada tratamiento. En todos los casos el medio contenía cefotaxime (300 mg/l), antibiótico necesario para controlar el crecimiento de las agrobacterias (si bien se trata de plantas sin transformar, y por lo tanto sin contacto con agrobacterias, se trató de reproducir las condiciones a las que se someten las plantas transformadas). Como resultado de este primer ensayo, todas las plantas crecidas en tubos con Basta® presentaron clorosis primero y murieron al cabo de 5 días. En todos los casos la clorosis comenzó en la base de la lámina, en forma similar a lo conocido para otras plantas incluyendo otros cultivares de papa.

Se decidió por lo tanto ensayar concentraciones menores del herbicida en el medio: esta vez se colocaron ápices en 3 concentraciones distintas de fosfinotricina: 0,1; 1 y 10 mg/l en cada tubo, con 10 repeticiones por tratamiento. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.



**Tabla 9:**

| caract /<br>conc. PPI(mg/l). | clorosis | enraizamiento |
|------------------------------|----------|---------------|
| 0                            | 0%       | 100%          |
| 0,1                          | 40%      | 100%          |
| 1                            | 70%      | 60%           |
| 10                           | 100%     | 0%            |

Porcentaje de plantas del cultivar Huinkul-MAG que presentan clorosis y/o son capaces de enraizar en medio P con cefotaxime (300 mg/l) y concentraciones crecientes de fosfinotricina (PPI).

El siguiente paso fue ensayar la resistencia de la planta transgénica AE2 a la fosfonitricina en el medio de cultivo. Para ello se optó por utilizar 1,2 mg/l de fosfinotricina ya que por el mecanismo de acción del herbicida y de la fosfinotricina acetil transferasa (PAT) (resistencia por detoxificación), si se agrega una concentración muy grande de herbicida en el medio, la resistencia puede ser sobrepasada.

El ensayo se hizo con ápices de *Solanum tuberosum* cv. Huinkul-MAG sin transformar (como control) y con ápices de AE2. Se hicieron 16 repeticiones por tratamiento. Se incluyó un tratamiento sin fosfinotricina.

**Tabla 10:**

| conc.<br>(mg/l)               | Control | AE2  |
|-------------------------------|---------|------|
| enraizadas y<br>verdes        | 0%      | 100% |
| no enraizadas y<br>cloróticas | 100%    | 0%   |

Porcentaje de plantas de Huinkul-MAG (Control) y transgénicas para el gen *bar* (AE2) capaces de enraizar y con buen aspecto general o incapaces de enraizar y cloróticas, a los 15 días de cultivo en medio P con cofotaxime (300 mg/l) y 1,2 mg/l de fosfinotricina.

Se concluyó por lo tanto que la planta AE2 presenta resistencia a la fosfinotricina en condiciones *in vitro*.

En la figura 35 se muestra a una planta transgénica AE2 (rotulada en naranja) y una planta control sin transformar (*Solanum tuberosum* Huinkul-MAG, rotulada en amarillo) en un medio sin herbicida. Ambas plantas presentan un fenotipo normal.

En la figura 36 se muestran las mismas dos plantas en un medio con Basta® (1,2 mg/l de PPT). La planta transgénica no presenta clorosis y enraíza normalmente. La planta control no fue capaz de enraizar ni crecer. Sus hojas se tornaron cloróticas primero y necróticas después, hasta que el explanto se secó completamente.

En la figura 37 se muestra una planta AE2 en un medio con el herbicida a la izquierda y otra planta igual (AE2 de la misma edad) en un medio sin el herbicida a la derecha. Como se observa, el herbicida no ejerce ningún efecto sobre la planta transgénica, ya que la planta permanece verde, enraíza y tiene un buen aspecto general.

En todos los casos las fotos se tomaron 15 días después de haberse micropropagado los ápices a medio fresco.

Figura 35:



AE2 (a la izquierda) y Huinkul-MAG sin transformar (a la derecha) luego de 15 días de haberse pasado a medio de micropropagación sin herbicida.

Figura 36:



AE2 (a la izquierda) y Huinkul-MAG sin transformar (a la derecha) luego de 15 días de haberse pasado a un medio de micropropagación que contenía 1,2 mg PPT/l.

Figura 37:



AE2 micropropagada en un medio con 1,2 mg PPT/l (a la derecha) y en el mismo medio sin PPT (a la izquierda).

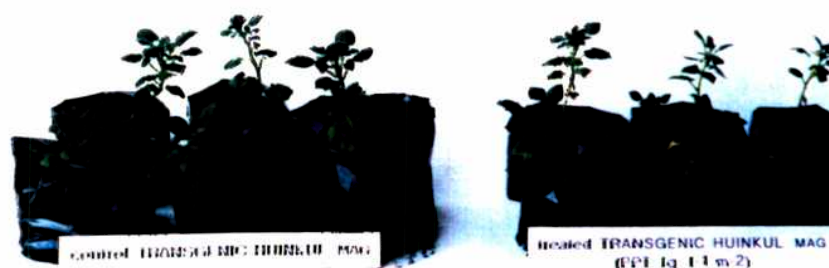
### **D3) Chequeo *in vivo* de la resistencia a fosfinotricina:**

Se transfirieron 12 plantas AE2 y 12 plantas Huinkul-MAG crecidas *in vitro* de un mes de edad a macetas. A 10 días del trasplante, se pulverizaron 6 plantas de cada tipo con una solución de 1 gramo por litro de Basta®. Se "pulverizaron" además, 6 plantas de cada tipo con agua. A los dos días de iniciado tratamiento con Basta®, los bordes de todas las hojas de las plantas Huinkul-MAG se curvaron hacia abajo. Esto no ocurrió en las plantas AE2 tratadas con el herbicida.



A los cinco días de iniciado el tratamiento las plantas Huinkul-MAG estaban completamente secas, mientras que las plantas AE2 presentaban el mismo aspecto que las plantas de Huinkul-MAG ó AE2 rociadas con agua.

Figura 38:



Aspecto general de plantas transgénicas (AE2) del cultivar Huinkul-MAG sin tratar con el herbicida (control) y a los 5 días de ser tratadas con 1 g/l de PPT.

Figura 39:



Aspecto general de plantas del cultivar Huinkul-MAG sin tratar con el herbicida (control) y tratadas con 1 g/l de PPT. Las fotos fueron tomadas a los 5 días de iniciado el tratamiento.

Figura 40:



Aspecto general de plantas del cultivar Huinkul-MAG y de plantas transgénicas (AE2) del mismo cultivar a los 5 días de ser tratadas con 1g/l de PPT.

# Discusión



### **A) Transformación de papa:**

En el presente trabajo de Tesis se ensayaron distintas alternativas para lograr la regeneración y transformación eficiente de cultivares de papa de interés en el país. Una de estas alternativas fue la utilización de rodajas de tubérculos como explantos de partida en experimentos de regeneración. Los resultados obtenidos no fueron reproducibles, probablemente debido a la heterogeneidad en las condiciones de edad y almacenamiento de los tubérculos. Varios autores señalaron la baja reproducibilidad de las eficiencias de regeneración y transformación cuando se usa tubérculo como explanto de partida. Sheerman y col. (1989), señalaron a la edad de los tubérculos como un parámetro crítico: con tubérculos de más de 6 meses de edad no obtuvieron resultados reproducibles. Además existen dudas con respecto a las condiciones de almacenamiento adecuadas: algunos autores sostienen que los tubérculos deben permanecer a 4 °C (Sheerman y col. 1988; Stickema y col. 1988) mientras que observaciones de la Dra. P. Malnoc (Estación Experimental Agrícola de Changins, Nyon, Suiza, comunicación personal) indicaron que se obtenían mejores resultados si los tubérculos eran almacenados a 15 °C. La utilización de tubérculos como explanto de partida conlleva un procedimiento de desinfección muy largo (de aproximadamente 3 hs) y tedioso. Estos inconvenientes indujeron a Ishida y col. (1989) a utilizar tubérculos crecidos *in vitro* como material de partida, aunque este grupo no logró, con ellos, eficiencias altas de transformación.

La utilización de hojas de plantas crecidas *in vitro* en cámaras de cría demostró ser, en nuestras manos, un procedimiento más simple, y dió lugar a eficiencias de regeneración del 100% y de transformación no solamente reproducibles sino también comparables o mejores que las informadas en los protocolos publicados hasta el momento. En la tabla que se presenta a continuación se muestran las eficiencias de transformación logradas por otros grupos:

**Tabla 11:**

| Explantos utilizados              | Autor           | Ef. transf.           | cultivares de papa                    |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------------|---------------------------------------|
| Tubérculo                         | Stickema 1988   | 1%                    | Bintje y Désirée                      |
| Tubérculo                         | Sheerman 1988   | 4,8%<br>16%           | Pentland Dell,<br>Désirée             |
| Mini tubérculo<br><i>in vitro</i> | Ishida 1989     | No aclara             | Russet Burbank<br>Lemhi Russet        |
| Hoja                              | De Block 1988   | No aclara             | Bintje, Désirée                       |
| Hoja                              | Tavazza 1988    | 23%                   | Désirée                               |
| Hoja                              | Wenzler 1989    | 9%<br>20%<br>400-500% | Superior<br>Désirée<br>FL1607         |
| Hoja                              | este trabajo    | 13-33%*               | Huinkul-MAG                           |
| Hoja                              | Rocha-Sosa 1989 | No aclara             | Désirée                               |
| Tallo                             | Newell 1991     | 13%<br>14%<br>2%      | Désirée<br>Kennebec<br>Russet Burbank |

Explantos de partida, autor y eficiencia de transformación lograda para distintos cultivares de papa, en éste y otros trabajos.

\* Eft fue del 33% cuando se utilizó el vector pBicpPI.RV y del 13% cuando se utilizó el vector GUS-intrón.

En cuanto a los escapes a la reacción GUS observados, hay que considerar que si bien el gen GUS está bajo el control de un promotor más fuerte (el 35S) que el promotor que controla el gen que confiere resistencia a kanamicina (Pnos), la reacción en sí tiene menor sensibilidad debido a la baja permeabilidad del sustrato X-Glu en el tejido y a la alta inestabilidad del X-Glu en solución. Es sabido que aún en el caso de transgenes ligados, la expresión de los genes no es equiparable. Dado que la selección se realizó en presencia de kanamicina, no sorprende que se

obtenga buen nivel de expresión del gen *neo* aunque el promotor no sea fuerte. En cambio, no existió selección por alta expresión del gen *uid A* responsable de la expresión de GUS. Además, un trabajo reciente (Ottaviani y col. 1993) demostró que en algunos casos, la transcripción del gen GUS a partir del promotor de 35S es suprimida por metilación del DNA (específicamente en el gen GUS y en el promotor de 35S) en plantas de papa del cv. Bintje transformadas con el vector pBI121. En el trabajo publicado por Wenzler y col. (1989), el 65% de los tallos que regeneraron en kanamicina expresaban GUS. Pueden tratarse de escapes a la presión de selección, escapes a la reacción de GUS y, a la luz de los resultados de Ottaviani, falta de expresión por metilación del DNA. En nuestro caso se trata de escapes a la reacción de GUS (es decir, bajos niveles de expresión) o a metilación del gen y/o el promotor de 35S, ya que el 100% de las plantas fue positiva en el ensayo de NPTII.

### **B) Resistencia a PLRV por expresión de proteína o antimensajero de cápside:**

A mediados de 1990, Kawchuk y col. obtuvieron plantas transgénicas de papa (cv. Désirée) resistentes a PLRV. La construcción utilizada tenía el gen de la cápside rodeado por 11 nt del extremo 5' no codificante y 112 nt del extremo 3' no codificante, bajo el control del promotor doble de 35S. A los 3 meses de la infección (realizada mediante 5 áfidos, que previamente se habían alimentado en plantas de *Physalis pubescens* infectadas, por planta) las plantas transgénicas tenían un 10% del virus presente en las plantas control (reducción del 90% en la multiplicación viral). Sólo en algunos casos fueron capaces de detectar la proteína de cápside por Western, por lo que propusieron que la proteína se encuentra por debajo del límite de detección de esta técnica (0,01% de las proteínas solubles totales) o que se degrada rápidamente.

En 1991 el mismo grupo obtuvo plantas transgénicas del cultivar Russet Burbank utilizando dos construcciones distintas a la anterior: una de ellas incluía el gen de cápside bordeado por 192 nt del extremo 5' no codificante (en un intento para mejorar los niveles de transcripción) y la otra tenía el gen de cápside con sus zonas aledañas en orientación antisentido de manera que las plantas resultantes produjeran un antimensajero de la proteína de cápside. Los niveles de transcripción fueron similares para las dos construcciones. En ningún caso detectaron la proteína de cápside viral por Western. Sorprendentemente obtuvieron los mismos niveles de resistencia con las dos construcciones: entre 1 y 8% de la multiplicación viral con respecto a los controles sin transformar. En este caso aumentaron el nivel del inóculo 10 veces (50 áfidos por planta).

Además, observaron una reducción significativa en la habilidad de *Myzus persicae* para transmitir el virus desde las transgénicas a plantas de *P. pubescens* sanas (siempre que los títulos virales en las mismas fueran iguales o menores al 5% de los controles). Este hecho es particularmente importante ya que la epidemiología se vería afectada, reduciéndose la transmisión viral en el campo y a campos vecinos sin el uso de insecticidas.

van der Wilk y col. (1991), obtuvieron niveles similares de resistencia en plantas del cultivar Désirée transformadas por una construcción que llevaba el gen de cápside bajo el control del promotor del transcripto de 35 S. Tampoco este grupo fue capaz de detectar la proteína de la cápside en las plantas transgénicas.

En 1992 Barker y col. obtuvieron plantas de papa transgénicas (cv. Pentland Squire y Désirée) para la proteína de cápside de PLRV así como 111 nt del extremo 5' y 262 nt del extremo 3' no codificante. Fueron capaces de detectar la proteína de cápside en algunas plantas de Pentland Squire (nunca en Désirée). En este caso no midieron los niveles de resistencia en infecciones primarias sino en las secundarias, las más importantes a campo, ya que la diseminación del virus ocurre principalmente de fuentes con infecciones secundarias más que con infecciones primarias. Las concentraciones virales fueron de 6 a 4 veces menores que en los controles para Désirée y de

3 a 2 veces menores que los controles para Pentland Squire. Los niveles de resistencia no dependieron en los niveles de proteína de cápside detectada (es decir no hallaron mayor resistencia en aquellas plantas donde había proteína de cápside detectable). Los niveles de virus encontrados en las transgénicas fueron similares a los encontrados en cultivares producidos por métodos de mejoramiento clásicos como por ejemplo G6845 y G7714.

En el presente trabajo, se obtuvieron plantas de papa de cultivares de uso local (Huinkul-MAG y Spunta) que expresan el gen de cápside viral, así como también 100 nt del extremo 5' NC y 59 nt del extremo 3' NC de este gen. Es la primera vez que se clona y secuencian un aislamiento sudamericano de este virus. Para realizar el clonado se amplificó el fragmento de interés por PCR usando RNA de planta infectada para sintetizar el cDNA total que sirvió como templado de partida. Esto evitó el paso de purificación viral, que es particularmente conflictivo en el caso de este virus que replica solamente en células de floema y acompañantes.

Asimismo, se hizo un ensayo preliminar de multiplicación viral (cuantificada por ELISA) en plantas transgénicas y control infectadas mediante áfidos que previamente se habían alimentado en plantas de papa con infección secundaria de PLRV.

El ensayo se realizó del mismo modo que el utilizado por los Ingenieros Butzonitch y Colavita de la Estación Experimental INTA-Balcarce para la evaluación de distintos genotipos de papa en planes de mejoramiento. Por lo tanto, para el caso de plántulas jóvenes como las de este ensayo, se utilizaron 15 áfidos por planta, dado que ésta es la dosis adecuada para lograr un grado de infección aceptable. Esta dosis se eligió para no sobrepasar los posibles niveles de resistencia que presenten las plantas; dosis mayores podrían conducir a necrosis y muerte de las plántulas por efecto de la reacción a los áfidos.

Se agruparon las distintas plantas transgénicas en 4 grupos: (a), b), c) ó d), en base a la acumulación de virus evaluada por ELISA y la proporción de plantas con síntomas.

En los casos a) y b) en los que se acumula menos virus que en el control (Huinkul-MAG sin transformar) no se puede descartar la existencia de escapes a la infección. En caso de resistencia, la cantidad de virus accesible a futuros áfidos vectores que se alimenten de estas plantas será menor, lo que naturalmente traerá aparejado un cierto control de la virosis.

Las plantas pertenecientes al grupo b) constituyen un caso interesante, ya que presentan síntomas pero la multiplicación viral está inhibida. En el caso de plantas transgénicas para el gen de cápside de PVY se observó algo similar (comunicación personal de la Dra. Pfa Malnoe, Estación Experimental Agrícola de Changins, Nyon, Suiza,). Esto podría deberse a que la aparición de los síntomas se vea potenciada por el producto del transgén y el inicio de la multiplicación viral. Según Kawchuk (1990 y 1991) y van der Wilk (1991), las plantas de papa de los cultivares Désirée y Russet Burbank crecidas en invernadero no presentaron síntomas en infecciones primarias. No obstante, Kawchuk (1991) menciona que algunas de las plantas transgénicas

presentaron síntomas luego de la infección (no aclara a los cuántos días). Estos autores consideraron que los síntomas de infecciones primarias son, en general, difíciles de evaluar y los atribuyeron a las condiciones de crecimiento en que se hallaban las plantas.

Los casos en los que se obtiene baja o nula lectura en el ELISA, pueden deberse a que la planta presentó resistencia o a que la planta escapó al inóculo inicial. Esto último ocurrió claramente en por lo menos tres de los clones de Huinkul-MAG, ya se trata de un cultivar susceptible a la infección con PLRV (carece de genes de resistencia) y en estos clones no se observó o se observó muy baja multiplicación viral. Sin embargo esto no ocurrió en varias de las plantas transgénicas en las que se observó multiplicación viral en todos los clones analizados. Por esta razón, si se toman los promedios de lectura de ELISA, "parece" que en estas plantas transgénicas el virus "replica más" que en Huinkul-MAG. Esta es una explicación plausible para los grupos c) y d) en los que la multiplicación viral es mayor que en Huinkul-MAG.

Con respecto al efecto de la expresión del gen de cápside viral (el transgén) en las plantas infectadas con virus, teóricamente hay tres posibilidades:

- a) que la expresión del transgén provoque una disminución en la multiplicación viral.
- b) que la expresión del transgén no afecte la multiplicación viral.
- c) que la expresión del transgén facilite la multiplicación viral.

La posibilidad a) es la esperada y, como se dijo, se ha reportado muchas veces, incluyendo el caso de PLRV.

La posibilidad b) también se ha observado. Ocurre en varias situaciones como por ej. cuando el transgén se inserta en zonas transcripcionalmente inactivas del genoma de la planta o cuando ocurre metilación del transgén luego de la integración.

En cuanto a la posibilidad c), si bien es teóricamente posible, no se han reportado casos.

El referir la multiplicación viral que se observa en las distintas plantas transgénicas, a la multiplicación ocurrida en la "peor" transgénica (en cuanto a la efectividad para restringir la multiplicación viral, que es lo que se busca), será una subestimación de la efectividad de las distintas plantas si lo que ocurre es el caso a). Es decir que si aun la "peor" transgénica inhibe en algo la multiplicación viral, al calcular la inhibición de la multiplicación con respecto a ella estamos cometiendo una subestimación.

Si por el contrario en la "peor" transgénica la expresión de la proteína de cápside facilita la multiplicación viral (caso c), al referir los datos de las demás transgénicas a ella se cometerá una sobreestimación.

Finalmente si en la "peor" transgénica el transgén no tuvo efecto alguno sobre la multiplicación viral, entonces esta planta puede ser tomada como punto de referencia al igual que Huinkul-MAG sin transformar.

Los grupos a), b) c) y d) hechos en base a la acumulación viral y la proporción de síntomas con respecto a Huinkul-MAG, se correspondieron casi perfectamente con la inhibición de la multiplicación viral tomando a la acumulación producida en E4H1 como punto de referencia (100% de acumulación; 0% de inhibición).

Un párrafo aparte merecen las plantas del grupo c) en las que hay multiplicación viral pero no se observa sintomatología, lo que por muchos fitopatólogos es conocido como tolerancia. Para confirmar la falta de efecto de la infección será necesario contar con los datos de rendimiento. De algunos "candidatos" que surgieron en este ensayo y que seguramente surgirán en ensayos similares, se harán curvas de acumulación viral, a distintos días postinfección. Se planea también detectar los niveles de PLRV en los tubérculos producidos por las plantas transgénicas infectadas para determinar si hay o no una disminución en la cantidad de virus transportado a tubérculo y determinar si el rendimiento (peso de tubérculos producidos) se ve o no afectado por la expresión del transgén.

Los síntomas fueron registrados al mes del comienzo de la infección; esto fue, quizás, un poco tarde para efectuar la selección de candidatos, ya que el retraso en la aparición de los síntomas también es una característica de interés distintiva de la estrategia de protección por expresión del gen de cápside.

### **B 1) Propuestas para el mecanismo de protección a PLRV:**

El gen de la proteína de cápside en orientación sentido o antisentido de PLRV fue igualmente eficaz para conferir protección. Esto constituye una diferencia fundamental con respecto a la resistencia mediada por proteína de cápside hallada para todos los demás virus. Las construcciones antisentido de cápside de PVX (Hemenway y col. 1988) o CMV (Cuozzo y col. 1988) confirieron protección sólo frente a inóculos virales bajos, y en todos los casos fueron menos eficientes que las construcciones del gen de proteína de cápside. La transmisión de PLRV, al contrario que estos virus, ocurre mediante áfidos vectores de manera persistente. La acumulación viral es lenta y los títulos virales permanecen bajos, lo que provocaría que el transcripto antisentido tenga una mejor oportunidad para interferir con la replicación viral. Kawchuk y col. (1991), proponen que los transcriptos sentido o antisentido interfirieran con la hebra de RNA viral de polaridad opuesta. Palukaitis y Zaitlin (1984) plantearon este mismo modelo para explicar el fenómeno de protección cruzada. Dado que los niveles de RNA viral positivo y negativo difieren durante el curso de la infección, Kawchuk y col. (1991), sugieren que la resistencia ocurriría en una etapa temprana de la infección, en la que tanto los niveles de RNA positivo como negativo son bajos. El proceso de infección también podría estar afectado

por una posible competencia entre el RNA expresado en las plantas transgénicas y el RNA del virus desafiante por factores esenciales (como por ej. la replicasa) virales o del huésped.



### **C) Resistencia a insectos por expresión de la delta-entomotoxina de *Bacillus thuringiensis*:**

Para la evaluación de plantas que expresan la toxina de *Bacillus thuringiensis*, generalmente se ha usado *Manduca sexta* ("hornworm" del tabaco) ya que es un Lepidóptero muy sensible a la toxina de BT y fácil de criar (Vaeck y col. 1987; Fischhoff y col. 1987; Barton y col. 1987). Estos autores cuantificaron la mortalidad de larvas sobre las distintas plantas transgénicas producidas.

En el presente trabajo no se observó mortalidad sino una disminución en la alimentación de las larvas de *Scrobipalpus absoluta* (Meyrick), lo que trajo como consecuencia una reducción en el número y tamaño de galerías, con el consiguiente menor daño en las hojas. Barton y col. 1987, observaron que plantas catalogadas como "no tóxicas" frente a *Manduca sexta*, en el sentido que no producían mortalidad de las larvas, resultaban menos dañadas debido a que las larvas se alimentaban menos.

Se observó además un retraso en el desarrollo de las larvas: las que se alimentaban de las plantas transgénicas Alfa 1 y Alfa 2 no alcanzaron el estado de pupa, no así las que se alimentaban de las plantas control, que se desarrollaron normalmente.

Otros lepidópteros como *Heliothis zea* (gusano del capullo del algodón), *Heliothis virescens* (gusano de los brotes de tabaco), *Pectinophora gossypiella* (lagarta rosada) y *Spodoptera exigua* (gusano de la remolacha, "beet armyworm") son menos sensibles a la toxina de BT que *Manduca sexta*. En estos casos raramente se observó mortalidad, sino reducción en los niveles de alimentación, tasa de crecimiento y desarrollo de larvas sobre plantas transgénicas con respecto a larvas que se alimentaban en plantas control. Fischhoff y col. (1987) observaron que larvas de *Heliothis virescens* sobre hojas control duplicaban su tamaño en 4 días, mientras que las larvas sobre hojas de plantas transgénicas, estaban mal desarrolladas y no aumentaron de peso en el mismo lapso. Similarmente, Perlak y col. (1990), informaron una reducción en el desarrollo de larvas del gusano del capullo del algodón.

Específicamente en papa, Pharoen y col. (1990), hallaron que sólo el 16% de las plantas transgénicas para BT causaban mortalidad de larvas de *Manduca sexta*; el resto producía una seria inhibición en el crecimiento de las mismas. Este mismo grupo estudió el daño producido por larvas de la polilla de la papa (*Phthorimaea operculella*, también llamado gusano del tubérculo) sobre hojas del cultivar Kennebec. A los 4 días observaron inhibición en el desarrollo larvario. Sugirieron que este lepidóptero perteneciente a la misma familia (Gelechiidae) que la polilla de tomate con la que se trabajó aquí, es menos sensible a BT que *Manduca sexta*. Estudiaron también el daño producido por la polilla de la papa sobre tubérculos de plantas transgénicas para BT y plantas del cultivar Berolina como control. Hallaron larvas con el desarrollo retrasado en los tubérculos de las plantas transgénicas.

En el presente trabajo, si bien fue claramente posible detectar la presencia del gen por Southern blot así como su expresión por Northern blot, no fue posible detectar el producto del gen por inmunodot, indicando que el nivel de proteína es muy bajo, ya sea por una baja eficiencia de síntesis o por una acelerada degradación. En este contexto es interesante mencionar el trabajo de Phoeoen y col (1990) los cuales afirman que el promotor que regula la expresión de la entomotoxina en la construcción utilizada es del tipo inducible por daño aunque no dan evidencias de ello y no hay menciones sobre el tema en trabajos en los que se utiliza este promotor. De ser cierta la necesidad de inducción por heridas, se explicaría la falta de detección de la proteína en condiciones normales. El insecto produciría el daño induciendo la síntesis de la toxina que tiene efecto negativo sobre su desarrollo.

Si bien es conocido que el uso de plantas de estas características no evita un nivel basal de daño inicial debido a que el insecto debe ingerir tejido vegetal conteniendo la toxina para que ésta actúe, probablemente el nivel de expresión de la toxina de BT por parte de Alfa 1 y Alfa 2 no fue la adecuada en cantidad o calidad para evitar la formación de galerías o causar la muerte de las larvas en forma más temprana. A pesar de ello, la estrategia de obtención de plantas transgénicas que expresan el gen truncado de la toxina de *Bacillus thuringiensis* fue exitosa para el control de la polilla del tomate: si bien dañadas, las plantas Alfa 1 y Alfa 2 sobrevivieron al ataque de las larvas, no así las plantas Huinkul-MAG y Spunta control. Además las larvas que se alimentaron en las plantas Alfa 1 y Alfa 2 no se desarrollaron totalmente ya que no alcanzaron el estadio de pupa.

Es importante recalcar que la aplicación de los productos comerciales Biotrol Xk® y Biotrol plus® (que contienen esporas de la subespecie Berliner de BT) y el producto comercial Dipel® (que contiene esporas de la subespecie Kurstaki de BT) no tuvieron efecto significativo sobre larvas de *Scrobipalpus absoluta* (Meyrick) que infectaron plantas de tomate (Ripa, 1981; Moore, 1983), siendo éste el primer trabajo que indica la susceptibilidad de este importante insecto a la toxina de BT.

#### **D) Plantas resistentes a fosfinotricina por expresión del gen *bar*:**

Según Loyola Vargas y col. (1984), la utilidad de la estrategia que se basa en la sobreproducción de la proteína blanco del herbicida no está muy clara en el caso de la glutamina sintetasa. Esto se debe a que la conversión de mayor cantidad de glutamato en glutamina podría tener efectos indeseados en el metabolismo del nitrógeno de la planta.

Según De Block y col. (1987), el uso de la estrategia basada en la introducción de una forma mutada de la glutamina sintetasa que no es inhibida por el herbicida tampoco es probable en este caso: debido al rol fundamental de esta proteína, una pequeña modificación de sus propiedades enzimáticas podría dar lugar a muchos inconvenientes. Además, como se trata de un multímero, los complejos que se formen entre las proteínas nativas y las mutadas podrían ser igualmente inhibidos por el herbicida.

La introducción de una enzima detoxificante es entonces teóricamente la mejor estrategia para la obtención de plantas resistentes a fosfinotricina.

La planta AE2 producida por transformación de Huinkul-MAG con un vector que lleva el gen *bar* bajo el control del promotor PTR2', demostró ser resistente, no sólo *in vitro* sino también *in vivo* a dosis de fosfinotricina más altas que las normalmente utilizadas para controlar malezas (entre 2,5 y 7,5 l Basta® / ha).

Se utilizaron 0,5 litros de una solución de 1 gramo de PPT por litro de agua para tratar un área de 0,5 m<sup>2</sup>; ésto equivale a 10.000 g PPT / ha. El Basta® comercial tiene 20 g PPT por cada 100 ml, por lo que la dosis utilizada correspondió a 50 l Basta® / ha. Es decir que se demostró que la planta AE2 resiste por lo menos una dosis 10 veces mayor a la normalmente utilizada para controlar malezas a campo.

En cuanto al uso del gen *bar* como marcador de selección, se han hecho curvas de sensibilidad de plantas de Huinkul-MAG a la fosfinotricina *in vitro*. El hecho de que se haya determinado que una concentración de 1,2 mg PPT/l de medio de cultivo es adecuada para distinguir una planta transgénica de una que no lo es, no implica que ésta sea la concentración justa a usar durante la regeneración de plantas transformantes (como marcador de selección), pero sí da una idea del orden con el que conviene empezar a trabajar.

Este gen resulta de particular utilidad cuando se trata de analizar la progenie de plantas transgénicas. En tabaco, por ejemplo se hizo germinar toda la progenie a campo y se la trató con el herbicida, observándose una tasa de 3:1 que indica que el gen se heredó mendelianamente (De Block y col. 1987).

**Conclusiones**

Se ha logrado poner a punto la técnica de transformación mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* para introducir y expresar genes de interés agropecuario en plantas de papa de un cultivar de uso local, Huinkul-MAG.

Se ha clonado y secuenciado el gen de cápside del virus del enrollamiento de la hoja (PLRV) de un aislamiento local (de la provincia de Córdoba). A pesar de la gran importancia económica de los daños causados por el PLRV en papa, es la primera vez que se reporta la secuencia de un aislamiento latinoamericano de este virus.

Se han subclonado este gen con el objetivo de construir un vector adecuado para la transformación mediante *Agrobacterium*, y se han obtenido una gran cantidad de plantas de papa transgénicas que expresan el gen de cápside de PLRV, con la idea de obtener así resistencia al virus, tal como se ha descrito ya para éste y varios otros sistemas virus-planta. Resultados preliminares indicaron que en varias de estas plantas transgénicas hay reducción en la acumulación de PLRV al ser infectadas con áfidos que previamente se alimentaron de plantas con infección secundaria de PLRV.

Se obtuvieron las plantas transgénicas Alfa 1 y Alfa 2. Estas plantas, que expresan parte del gen de la toxina de *Bacillus thuringiensis*, fueron capaces de restringir la formación de galerías y el desarrollo de las larvas de un insecto minador de hoja como la polilla del tomate (*Scrobipalpus absoluta* (Meyrick)) frente al cual los métodos tradicionales de control basados en la misma toxina aplicada a campo demostraron ser ineficaces.

Se obtuvo la planta transgénica AE2 expresa el gen *bar* que codifica para la fosfinotricina acetil transferasa (PAT), enzima que inactiva la fosfinotricina, componente activo de los herbicidas totales Basta® y Bialaphos®. Se demostró que esta planta presentaba resistencia al herbicida Basta® tanto *in vitro* como *in vivo*, a dosis de fosfinotricina más altas que las normalmente utilizadas para controlar malezas.

# Bibliografía

An, G; Watson, B; Stachel, S; Gordon, M; Nester, E. 1985. New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.* 4: 277-284.

Bald, J; Tinsley, T. 1967a. A quasi-genetic model for plant virus host ranges. I. Group reactions within taxonomic boundaries. *Virology* 31: 616-624.

Bald, J; Tinsley, T. 1967b. A quasi-genetic model for plant virus host ranges. II. Differentiation between host ranges. *Virology* 32: 321-327.

Bald, J; Tinsley, T. 1967c. A quasi-genetic model for plant virus host ranges. III. Congruence and relatedness. *Virology* 32: 328-336.

Barker, H; Harrison, B. 1985. Restricted multiplication of potato leafroll virus in resistant potato genotypes. *Annals of Applied Biol.* 107: 205-212.

Barker, H; Harrison, B. 1986. Restricted distribution of potato leafroll virus in resistant potato genotypes and its effect on transmission of the virus by aphids. *Annals of Applied Biol.* 109: 595-604.

Barker, H. 1987. Multiple components of the resistance of potatoes to potato leafroll virus. *Annals of Applied Biol.* 111: 641-648.

Barker, H; Solomon, R. 1990. Evidence of simple genetic control in potato ability to restrict potato leaf roll virus concentration. *Theor. Appl. Genet.* 80: 188-192.

Barker, H; Reavy, B; Kumar, A; Webster, K; Mayo, M. 1992. Restricted virus multiplication in potatoes transformed with the coat protein gene of potato leafroll virus: similarities with a type of host gene-mediated resistance. *Ann. Appl. Biol.* 120: 55-64.

Barry, G; Rogers, S; Fraley, R; Brand, L. 1984. Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene, *PNAS USA* 81: 4776-4780.

Barton, K; Whiteley, H; Yang, N. 1987. *Bacillus thuringiensis*  $\gamma$ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteran insects. *Plant Physiol.* 85: 1103-1109.

Beachy, R; Abel, P; Oliver, M; De, B; Fraley, R; Rogers, S; Horsch, R. 1985. Potential for applying genetic transformation to studies of viral pathogenesis and cross-protection. In: Zaitlin, M; Day, P; Hollaender, A (eds). Biotechnology in plant science: relevance to agriculture in the nineteen eighties. Academic Press, New York, p 265.

Beachy, R; Loesch-Fries, S; Tumer, N. 1990. Coat protein-mediated resistance against virus infection. Annu. Rev. Phytopathol. 28: 451-474.

Beatty, J; Powell, G; Lica, L; Regier, D; MacDonald, E; Hommes, N; Morris, R. 1986. *Tzs*, a nopaline Ti plasmid gene from *Agrobacterium tumefaciens* associated with transzeatin biosynthesis. Mol. Gen. Genet. 203: 274-280.

Bernardi, A; Spahr, P. 1972. Nucleotide sequence at the binding site for coat protein on RNA of bacteriophage R17. PNAS USA 69: 3033-3037.

Bevan, M; Flavell, R; Chilton, M. 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature 304: 184-187.

Bidney, D, Scelongo, C, Martich, J, Burrus, M, Sims, L y Huffman, G. (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens* Plant Molecular Biology 18: 301-313.

Bouzoubaa, S; Ziegler, V; Beck, D; Guilley, H; Richards, H; Jonard, G. 1986. Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA-2. J. Gen. Virol. 67: 1689-1700.

Braun, A. 1947. Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown gall. Am. J. Bot. 34: 234-240.

Braun, C; Hemenway, C. 1992. Expression of amino-terminal portions or full-length viral replicase genes in transgenic plants confers resistance to potato virus X infection. The Plant Cell 4: 735-744.

Breyne, P; Van Montagu, M; Depicker, A; Gheysen, G. 1992. Characterization of a DNA fragment that normalizes transgene expression in tobacco. Plant Cell 4: 463-471.



Brierley, I; Digard, P; Inglis, S. 1989. Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshift signal: requirement of an RNA pseudoknot. *Cell* 57: 537-547.

Catherall, P; Hayes, J. 1966. Assessment of varietal reaction and breeding for resistance to the yellow dwarf virus in barley. *Euphitica* 15: 39-51.

Chaleff, R; Ray, T. 1984. Herbicide-resistant mutants from tobacco cells cultures. *Science* 223: 1148-1151.

Cheo, P; Gerrard, J. 1971. Differences in virus replicating capacity among plant species inoculated with tobacco-mosaic virus. *Phytopathology* 61: 1010-1012.

Citovsky, V; Wong, M; Zabriski, P. 1989. Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA: implications for the T-DNA transfer process. *PNAS USA* 86: 1193-1197.

Comai, L; Facciotti, D; Hiatt, W; Thompson, G; Rose, R; Stalker, D. 1985. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* 317: 741-744.

Couzzo, M; O'Connell, K; Kaniewski, W; Fang, R; Chua, N; Tumer, N. 1988. Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technology* 6: 549-557.

Day, K. 1984. Resistance to bean common mosaic virus in *Phaseolus vulgaris* L. PhD thesis, Univ. birmingham, UK. 172 pp.

Deblaere, R; Bytchier, B; De Greve, H; Deboeck, F; Schell, J; Van Montagu, M; Leemans, J. 1985. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *NAR* 13: 4777-4788.

De Block, M; Botterman, J; Vanderwiele, M; Dockx, J; Thoen, C; Gosselé, V; Rao Movva, N; Thompson, C; Van Montagu, M; Leemans, J. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* (6) 9: 2513-2518.

- De Block, M. 1988. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Theor. Appl. Genet. 76: 767-774.
- De Greef, W; Delon, R; De Block, M; Leemans, J; Botterman, J. 1989. Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field conditions. Bio/Technology 7: 61-64.
- de Haan, P; Gielen, J; Prins, M; Wijkamp, I; van Schepen, A; Peters, D; van Grinsven, M; Goldbach, R. 1992. Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants. Bio/Technology 10: 1133-1137.
- Delannay, X; La Vallee, B; Proksch, R; Fuchs, R; Sims, S; Greenplate, J; Marrone, P; Dodson, R; Augustine, J; Layton, J; Fischhoff, D. 1989. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki insect control protein. Bio/Technology 7: 1265-1269.
- del Vas, M; Ceriani, M. F; O'Connor, A; Hopp, H. E. 1992. *Agrobacterium* mediated transformation of potato cultivars of local interest in Latin America using leaf explants. Proceedings of the first workshop on Plant Transformation from the Plant Genetic Engineering Network. BIOLAC/UNU. United Nations University press, Hong Kong (en prensa).
- de Zoeten, G; Fulton, R. 1975. Understanding generates possibilities. Phytopathology 65: 221
- D'Halluin, K; Botterman, J; De Greef, W. 1990. Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions. Crop Science 30: 866-871.
- D'Halluin, K; Bossut, M; Bonne, E; Mazur, B; Leemans, J; Botterman, J. 1992. Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. Bio/Technology 10: 309-314.
- Dodds, J; Hamilton, R. 1976. Structural interactions between viruses as a consequence of mixed virus infections. Adv. Virus Res. 20: 33-86.
- Drijfhout, E. 1978. Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* and bean common mosaic virus with implications for strain identification and breeding for resistance. Agric. Res. Rep. Wageningen No 872: 98 pp.

- Duffus, J. 1977. Aphids, viruses, and the yellow plague. Aphids as virus vectors, ed. K. Harris; K. Maramorosch: 361-383. New York: Academic.
- Dürrenberger, F; Cramer, A; Hohn, B; Koukolikova-Nicola, Z. 1989. Covalently bound VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation. PNAS USA 86: 9154-9158.
- Edwards, M; McMullen, M. 1988. Variation in tolerance to wheat streak mosaic virus among cultivars of hard red spring wheat. Plant Dis. 72: 705-707.
- Eichholtz, D; Rogers, S; Horsch, R; Klee, H; Hayford, M; Hoffmann, N; Bradford, S; Fink, C; Flick, J; O'Connell, K; Fraley, R. 1987. Expression of mouse dihydrofolate reductase gene confers methotrexate resistance in transgenic petunia plants. Som. Cell Mol. Genet. 13: 67-76.
- Eskandari, F; Sylvester, E; Richardson, J. 1979. Evidence for lack of propagation of potato leafroll virus in its aphid vector, *Myzus persicae*. Phytopathology 69: 45-47.
- Fischhoff, D; Bowdish, K; Perlak, F; Marrone, P; McCormik, S; Niedermeyer, J; Dean, D; Kusano-Kretzmer, K; Mayer, E; Rochester, E; Rogers, S; Fraley, R. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. Bio/Technology 5: 807-813.
- Fitch, M; Manshardt, R; Gonsalves, D; Slighton, J; Sanford, J. 1992. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. Bio/Technology 10: 1466-1472.
- Flor, H. 1956. The complementary genetic systems in flax and flax rust. Adv. Genet. 8: 29-54.
- Fraley, R; Rogers, S; Horsch, R; Sanders, P; Filck, J; Adams, S; Bittner, M; Brand, L; Fink, C; Fry, J; Gallup, G; Goldberg, S; Hoffman, N; Woo, S. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. PNAS USA 80: 4803-4807.
- Fraser, R; Loughlin. 1980. Resistance to tobacco mosaic virus in tomato: effects of the *Tm-1* gene on virus multiplication. J. Gen. Virol. 48: 87-96.
- Fraser, R. 1985. Mechanisms of induced resistance to virus disease. In Mechanisms of Resistance to Plant Diseases, ed. R. Fraser, pp. 373-404. Dordrecht: Nijhoff/Junk.

- Fraser, C. 1989. Site-directed mutagenesis of adrenergic receptors. Identification of conserved cysteine residues that independently affect ligand binding and receptor activation. *J. Biol. Chem.* 264: 9266-9270.
- Fraser, R. 1990. The genetics of resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 179-200.
- Gerlach, W; Llewellyn, D; Haseloff, J. 1987. Construction of a plant disease resistance gene from the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Nature* 238: 802-805.
- Gibbs, A. 1969. Plant virus classification. *Adv. Virus Research* 14: 263-328.
- Gielen, J; De Haan, P; Kool, A; Peters, D; Van Grinsven, M; Goldbach, R. 1991. Engineered resistance to tomato spotted wilt virus, a negative-strand RNA virus. *Bio/Technology* 9: 1363-1367.
- Goelet, P; Lomonossoff, G; Butler, P; Akam, M; Gait, M; Karn, J. 1982. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *PNAS USA* 79: 5818-5822.
- Golemboski, D; Lomonossoff, G; Zaitlin, M. 1990. Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *PNAS USA* 87: 6311-6315.
- Halk, E; Merlo, D; Liao, L; Jarvis, N; Nelson, S. 1989. Resistance to alfalfa mosaic virus in transgenic tobacco and alfalfa. In *Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions*, ed. B. Staskawicz; P. Ahlquist; O. Yoder, 101: 283. New York: Liss.
- Hall, G; Allen, G; Loer, D; Thompson, W; Spiker, S. 1991. Nuclear scaffolds and scaffold-attachment regions in higher plants. *PNAS USA* 88: 9320-9324.
- Hamilton, R. I. 1980. Defenses triggered by previous invaders - viuruses. In: Horsfall J. G, Cowling E.B (eds). *Plant disease: an advanced treatise*. Vol 5. Academic Press, NY: 279.
- Harrison, D; Mayo, M; Baulcombe, D. 1987. Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature* 328: 799-802.

- Hemenway, C; Fang, R; Kaniewski, W; Chua, N; Tumer, N. 1988. Analysis of the mechanism of the protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO J.* 7: 1273-1280.
- Hill, K; Jarvis-Eagan, N; Halk, E; Krahn, K; Liao, L. 1991. The development of virus resistant alfalfa *Medicago sativa* L. *Bio/Technology* 9: 373-377.
- Hille, J; Wullems, G; Schilperoort, R. 1983. Non-oncogenic T-region mutants of *Agrobacterium tumefaciens* do transfer T-DNA into plant cells. *Plant Mol. Biol.* 2:155-163.
- Hoekema, A; Hirsch, P; Hooykaas, P; Schilperoort, R. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature* 303: 179-180.
- Hoekema, A; Huisman, M; Molendijk, L; Van den Elzen, P; Cornelissen, B. 1989. The genetic engineering of two commercial potato cultivars for resistance to potato virus X. *Bio/Technology* 7: 273-278.
- Höfgen, R; Willmitzer, L. 1988. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *NAR* 16 (20): 9877.
- Hooykaas, P; Schilperoort, R. 1992. *Agrobacterium* and genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* 19: 15-38.
- Hopp, H. E; Bravo Almonacid, F; Arese, A; Tozzini, A; Ceriani M. F; Saladrigas, M. V; Orman, B; Celnik, R; del Vas, M; Mentaberry, A. N. 1990. Development and application of a non radioactive nucleic acid hybridization system for the simultaneous detection of four potato pathogens. *Journal of Virological Methods* 31: 11-30 .
- Horsch, R; Fry, N; Hoffmann, D; Eichholtz, S; Rogers, S; Fraley, R. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
- Huisman. 1988. *J. Gen. Virol.* 69:1789-1798.

- Ishida, B; Snyder, G; Belknap, W. 1989. The use of *in vitro*-grown microtuber discs in *Agrobacterium*-mediated transformation of Russet Burbank and Lemhi Russet potatoes. *Plant Cell Reports* 8: 325-328.
- Jacks, T; Power, M; Masiarz, F; Luciw, P; Barr, P; Varmus, H. 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 *gag-pol* expression. *Nature* 331: 280-283.
- Janssen, B; Gardner, R. 1989. Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. *Plant Mol. Biol.* 14: 61-72.
- Jefferson, R; Kavanagh, T; Bevan, M. 1987 a). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- Jefferson, R. 1987 b). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Reporter* 5 (4): 387-405.
- Jin, S; Prusti, R; Roitsch, T; Ankenbauer, R; Nester, E. 1990. The VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* is phosphorylated by the autophosphorylated VirA protein and this is essential for its biological activity. *J. Bact.* 172: 4945-4950.
- Johansen, D; Knutson, K; Slack, S; Jones, E. 1984. Recommendations for standards and guidelines for acceptance of tissue cultured potato seed stocks into certification programs. *American Potato Journal* 61: 368-370.
- Kanemoto, R; Powell, A; Akiyoshi, D; Regier, D; Kerstetter, R; nester, E; Hawes, M; Gordon, M. 1989. Nucleotide sequence and analysis of the plant-inducible locus *pinF* of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bact.* 171: 2506-2512.
- Kawchuk, L; Martin, R; Rochon, D; McPherson, J. 1989. Identification and characterization of the Potato Leafroll Virus Putative Coat Protein Gene. *J. Gen. Virol.* 70: 783-788.
- Kawchuk, L; Martin, R; McPherson, J. 1990. Resistance in transgenic potato expressing the potato leafroll virus coat protein gene. *Mol. Plant-Microbe Int.* 3 (5): 301-307.

Kawchuk, L; Martin, R; Mc Pherson, J. 1991. Sense and Antisense RNA-Mediated Resistance to Potato Leafroll Virus in Russet Burbank Potato Plants. 1991. Mol. Plant-Microbe Int. 4 (3): 247-253.

Keese, P; Martin, R; Kawchuk, L; Waterhouse, P; Gerlach, W. 1990. Nucleotide sequences of an Australian and a Canadian isolate of potato leafroll luteovirus and their relationships with two European isolates. J. Gen. Virol. 71: 719-724.

Kiho, Y; Nishiguchi, M. 1984. Unique nature of an attenuated strain of tobacco mosaic virus: Autoregulation. Microbiol. Immunol. 28: 589-599.

Klein, T; Wolf, E; Wu, R; Sanford, J. 1987. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature 327: 70-73.

Klapwijk, R; Scheulderman, T; Schilperoort, R. 1978. Coordinated regulation of octopine degradation and conjugative transfer of Ti plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*: evidence for a common regulatory gene and separate operons. J. Bact. 136: 775-785.

Kozak, M. 1986. Regulation of protein synthesis in virus-infected animal cells. Adv. Virus Res. 31: 229-292.

Kozziel, M; Beland, G; Bowman, C; Carozzi, N; Crenshaw, R; Crossland, L; Dawson, J; Desai, N; Hill, M; Kadwell, S; Launis, K; Lewis, K; Maddox, D; McPherson, K; Meghji, M; Merlin, E; Rhodes, R; Warren, G; Wright, M; Evola, S. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. Bio/Technology 11: 194-200.

Krens, F; Mans, R; van Slogteren, T; Hoge, J; Wullems, G; Schilperoort, R. 1985. Structure and expression of DNA transferred to tobacco via transformation of protoplasts with Ti-plasmid DNA: co-transfer of T-DNA and non-T-DNA sequences. Plant Mol. Biol. 5: 223-234.

Lambert, B; Peferoen, M. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. BioScience 42 (2): 112-122.

- Larrafn, P. 1986. Eficacia de insecticidas y frecuencia de aplicación basada en niveles poblacionales críticos de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick), en tomates. Agricultura técnica 46: 329-333.
- Lawson, C; Kaniewski, W; Haley, L; Rozman, R; Newell, C; Sanders, P; Tumer, N. 1990. Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus Y in transgenic Russet Burbank. Bio/Technology 8: 127-134.
- Lindbo, J; Dougherty, W. 1992. Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. Mol. Plant-Microbe Int. 5 (2): 144-153.
- Ling, K; Namba, S; Gonsalves, C; Slighton, J; Gonsalves, D. 1991. Protection against detrimental effects of potyvirus infection in transgenic plants expressing the papaya ringspot coat protein gene. Bio/Technology 9: 752-758.
- Lippincot, B; Lippincot, J. 1969. Bacterial attachment to a specific wound site as an essential stage in tumor initiation by *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bact. 97: 620-628.
- Loesch-Fries, L; Halk, E; Merlo, D; Jarvis, N; Nelson, S. 1987a). Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene and antisense cDNA en transformed tobacco tissue. Arntzen, G eds. Molecular Strategies for Crop Protectionn. NY:Liss: 221-238.
- Loesch-Fries, L. S; Merlo, D; Zinnen, T; Burhop, L; Hill, K; Krahn, K; Jarvis, N; Nelson, S; Halk, E. 1987b). Expression of alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance. EMBO J. 6: 1845-1851.
- Loyola Vargas, V; Sanchez De Jimenez, E. 1984. Differential role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of maize tissues. Plant Physiol. 76: 536-540.
- MacKenzie, D; Tremaine, J. 1990. Transgenic *Nicotiana debneyii* expressing viral coat portein are resistant to potato virus S infection. J. Gen. Virol. 71: 2167-2170.
- MacKenzie, D; Ellis, P. 1992. Resistance to tomato spotted wilt virus infection in transgenic tobacco expressing the viral nucleocapsid gene. Mol. Plant-Microbe Int. 5: 34-40.



- Maniatis, T; Fritsch, E; Sambrook, J. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Martin, R; Keese, P; Young, M; Waterhouse, P; Gerlach, W. 1990. Evolution and molecular biology of Luteoviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 341-363.
- Mayo, M; Robinson, D; Jolly, C; Hyman, L. 1989. Nucleotide sequence of Potato Leafroll Luteovirus RNA. *J. Gen. Virol.* 70: 1037-1051.
- McDonnell, R; Clark, R; Smith, W; Hinchee, M. 1987. A simplified method for the detection of neomycin phosphotransferase II activity in transformed plant tissues. *Plant Mol. Biol. Reporter* 5: 380-386.
- McGaughey, W; Whalon, M. 1992. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science* 258: 1451-1455.
- McKinney, H. 1929. Mosaic diseases in Canary Islands, West Africa, and Gibraltar. *J. Agric. Res.* 39: 557.
- Melchers, L; Regensburg, Yuink, A; Schilperoort, R; Hooykaas, P. 1989. Specificity of signal molecules in the activation of *Agrobacterium* virulence gene expression. *Mol. Microbiol.* 3: 969-977.
- Melchers, L; Maroney, M; den Dulk-Ras, A; Thompson, D; van Vuuren, H; Schilperoort, R; Hooykaas, P. 1990. Octopine and nopaline strains of *Agrobacterium tumefaciens* differ in virulence; molecular characterization of the *virF*-locus. *Plant Mol. Biol.* 14: 249-259.
- Messens, E; Dekeyser, R; Stachel, S. 1990. A nontransformable *Triticum monococcum* monocotyledonous culture produces the potent *Agrobacterium* vir-inducing compound ethyl ferulate. *PNAS USA* 87: 4368-4372.
- Miller, W; Waterhouse, P; Gerlach, W. 1988. Sequence and organization of barley yellow dwarf virus genomic RNA. *NAR* 16 (13): 6097-6111.
- Moore, J. 1983. Control of tomato leafminer (*Scrobipalpus absoluta*) in Bolivia. *Tropical Pest Management* 29 (3): 231-238.

- Moraes, G; Normanha, J. 1982. Surto de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) em tomateiro no trópico semi-árido. Pesq. agropec. bras., Brasília 17: 503-504.
- Mouches, C; Candresse, T; Bove, J. 1984. Turnip yellow mosaic virus RNA-replicase contains host and virus-encoded subunits. Virology 134: 78-90.
- Murakami, T; Anzai, H; Imai, S; Satoh, A; Nagaoka, K; Thompson, C. 1986. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster. Mol. Gen. Genet. 205: 42-50.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Phisiol. Plant. 15: 473-497.
- Nejdat, A; Beachy, R. 1990. Transgenic tobacco virus coat protein gene are resistant to some tobamoviruses. Mol. Plant-Microbe Interact. 3: 247-251.
- Nelson, R; Powell Abel, P; Beachy, R. 1987. Lesions and virus accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of tobacco mosaic virus. Virology 158: 126-132.
- Nelson, R; Mc Cormick, S; Delannay, X; Dub, P; Layton, J; Anderson, E; Kaniewska, M; Proksch, R; Horsch, R; Rogers, S; Fraley, R; Beachy, R. 1988. Virus tolerance, plant growth and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. Bio/Technology 6: 403-409.
- Newell, C; Rozman, R; Hinchee, M; Lawson, E; Haley, L; Sanders, P; Kaniewski, W; Tumer, N; Horsch, R; Fraley, R. 1991. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Solanum tuberosum* L. cv. Russet Burbank. Plant Cell Reports 10: 30-34.
- Nixon, B; Ronson, C; Ausbel, F. 1986. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. PNAS USA 83: 7850-7854.
- Ooms, G; Hooykaas, P; van Veen, R; van Beelen, P; Regensburg-Tuink, A; Schilperoort, R. 1982. Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T region. Plasmid 7:15-29.

- Ooms, G; Karp, A; Roberts, J. 1983. From tumor to tuber: tumor cell characteristics and chromosome numbers of crown gall delivered tetraploid potato plants (*Solanum tuberosum* cv. Maris Bard). Theor. and Appl. Gen. 66: 169-172.
- Ottaviani, M; Smits, T; Hänisch ten Cate, C. 1993. Differential methylation and expression of the  $\beta$ -glucuronidase and neomycin phosphotransferase genes in transgenic plants of potato cv. Bintje. Plant Science 88: 73-81.
- Paje-Manalo, L; Lommel, S. 1989. Independent replication of red clover necrotic mosaic virus RNA-1 in electroporated host and nonhost *Nicotiana* species protoplasts. Phytopathology 79: 457-461.
- Palukaitis, P; Zaitlin, M. 1984. A model to explain the "cross protection" phenomenon shown by plant viruses and viroids. Plant-Microbe Interactions: Molecular and Genetic Perspectives. Kosuge, T and Nester, E. W. eds. Macmillan, NY: 420.
- Pazour, G; Das, A. 1990. Vir G, an *Agrobacterium tumefaciens* transcriptional activator, initiates translation at a UUG codon and is a sequence-specific DNA-binding protein. J. Bact. 172: 1241-1249.
- Pheroen, M; Jansens, S; Reynaerts, A; Leemans, J. 1990. Potato plants with engineered resistance against insect attack. Vayda and Park, eds. Molecular and Cellular Biology of the Potato. C.A.B. International, Wallingford, UK. Pag: 193-204.
- Perlak, F; Deaton, R; Armstrong, T; Fuchs, R; Simson, S; Greenplate, J; Fishhoff, D. 1990. Insect resistant cotton plants. Bio/Technology 8: 939-943.
- Potrykus, I. 1991. Gene transfer to plants: assessments of published approaches and results. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 205-225.
- Powell-Abel, P; Nelson, R; De, B; Hoffmann, N; Rogers, S; Fraley, R; Beachy, R. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science 232: 738-743.
- Prill, B; Maiss, U; Casper, R. 1989. Nucleotide sequence of the potato leafroll virus coat protein gene. Nucleic Acid Research 17: 1768.

- Register, J; Beachy, R. 1988. Tobacco mosaic virus infection of transgenic plants is blocked at an early event in infection. *Virology* 166: 524-532.
- Rich, A. 1983. *Potato Diseases*. New York: Academic Press.
- Ripa, R. 1981. Avances en el control de la polilla del tomate *Scrobipalpus absoluta* (Meyr.). II. Ensayos de control químico. *Agricultura técnica (Chile)* 41: 113-119.
- Robaglia, C; Vilaine, F; Pautot, V; Raimond, F; Anselm, L; Jouanin, L; Casse Delbart, F; Tepfer, M. 1987. Expression vectors based on the *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid transformation system. *Biochimie* 69: 231-237.
- Rocha-Sosa, M; Sonnewald, U; Frommer, W; Stratmann, M; Schell, J; Willmitzer, L. 1989. Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J* 8: 23-29.
- Rochow, W; Duffus, J. 1981. Luteovirus and yellow diseases. *Handbook of Plant Virus Infections and comparative Diagnosis*. E. Kurstaki (ed). Elsevier/North Holland Biomedical Press.
- Rogers, S; Bendich, A. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5: 69-76.
- Ross, A. F. 1974. Interaction of viruses in the host. *Acta Hortic.* 36: 247.
- Ross, H. 1986. Potato Breeding - problems and perspectives. In: *Adv. Plant. Breeding* 13: 1-132. P. Parley, Berlin, Hamburg.
- Rychlik, W; Rhoads, R. 1989. A computer program for choosing oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and *in vitro* amplification of DNA. *NAR* 17: 8543-8551.
- Sanders, P; Kaniewski, W; Haley, L; LaVallee, B; Delannay, X; Tumer, N. 1992. Field resistance of transgenic tomatoes expressing the tobacco mosaic virus or tomato mosaic virus coat protein genes. *Phytopathology* 82: 683-690.

- Sahi, S; Chilton, M; Chilton, W. 1990. Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. 1990. PNAS USA 87: 3879-3883.
- Sanford, J; Johnston, S. 1985. The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasite's own genome. J. Theor. Biol. 113: 395-405.
- Sanger, F; Nicklen, S; Coulson, A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. PNAS USA 74: 5463-5467.
- Schnepf, E; Whiteley, H. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. PNAS USA 78: 2893-2897.
- Schröder, G; Waffenschmidt, S; Weiler, E; Schröder, J. 1984. The T-region of Ti-plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. Eur. J. Biochem. 138: 387-391.
- Scott. Reader's Digest. 1976. Dec. p205.
- Sequeira, L. 1984. Cross protection and induced resistance: their potential for plant disease control. Trends in Biotechnology 2: 25-29.
- Shah, D; Hightower, R; Meagher, R. 1982. Complete nucleotide sequence of a soybean actine gene. PNAS USA 79: 1022-1026.
- Shah, D; Horsch, R; Klee, H; Kishore, G; Winter, J; Turner, N; Hironaka, C; Sanders, P; Gasser, C; Aykent, S; Siegel, N; Rogers, S; Fraley, R. 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. Science 233: 478-481.
- Shaner, D; Anderson, P. 1985. Biotechnology in Plant Science. Relevance to Agriculture in the Eighties. Zaitlin, M; Day, P y Hollaender, A (eds), Academic Press Inc., New York, p 287.
- Sheerman, S., Bevan, M. 1988. A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors. Plant Cell Reports 7: 13-16.
- Shepherd, R; Franki, R; Hirth, L; Hollings, M; Inouye, T; et al. 1976. New group of plant viruses approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses. Intervirology 6: 181-184.

- Sherwood, J. L; Fulton, R. W. 1982. The specific involvement of coat protein in tobacco mosaic virus cross protection. *Virology* 119: 150-158.
- Shimoda, N; Toyoda-Yamamoto, A; Nagamine, J; Usami, S; Katayama, M; Sakagami, Y; Möachida, Y. 1990. Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *PNAS USA* 87: 6684-6688.
- Smith, E; Townsend, C. 1907. A plant tumor of bacterial origin. *Science* 25: 671-673.
- Song, Y; Shibuya, M; Ebizuka, Y; Sankawa, U. 1991a. Identification of plant factors inducing virulence gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. *Chem. Pharm. Bull.* 39: 2347-2350.
- Song, Y; Shibuya, M; Ebizuka, Y; Sankawa, U. 1991b. Synergistic action of phenolic signal compounds and carbohydrates in the induction of virulence gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. *Chem. Pharm. Bull.* 39: 2613-2616.
- Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Spencer, P; Towers, G. 1991. Restricted occurrence of acetophenone signal compounds. *Phytochemistry* 30: 2933-2937.
- Stachel, S; Messens, E; Van Montagu, M; Zambirski, P. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318: 624-629.
- Stachel, S; Zambirski, P. 1986 a). *virA* and *virG* control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *Agrobacterium tumefaciens*. *Cell* 46: 325-333.
- Stachel, S; Timmerman, B; Zambirski, P. 1986 b). Generation of single-stranded T-DNA molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 322: 706-712.
- Stark, D; Beachy, R. 1989. Protection against potyvirus infection in transgenic plants: evidence for broad spectrum resistance. *Bio/Technology* 7: 1257-1262.

Steck, T; Cloose, T; Kado, C. 1989. High levels of double-stranded transferred DNA (T-DNA) processing from an intact nopaline Ti plasmid. PNAS USA 86: 2133-2137.

Stiekema, W; Heidekamp, F; Louwerse, J; Verhoeven, H; Dijkhuis, P. 1988. Introduction of foreign genes into potato cultivars Bintje and Désirée using an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. Plant Cell Reports 7: 47-50.

Sulzinski, M; Zaitlin, M. 1982. Tobacco mosaic virus replication in resistant and susceptible plants: in some resistant species virus is confined to a small number of initially infected cells. Virology 121: 12-19.

Tacke, E; Sarkar, S; Salamini, F; Rohde, W. 1989. Cloning of the gene for the capsid protein of potato leafroll virus. Archives of Virology 105: 153-163.

Takanami, Y; Kubo, S. (1979). Enzyme-assisted purification of two phloem-limited plant viruses: tobacco necrotic dwarf and potato leafroll. J. Gen. Virol. 44: 153-159.

Tavazza, R; Tavazza, R; Ordas, R; Ancora, G; Benvenuto, E. 1988. Genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum*): an efficient method to obtain transgenic plants. Plant Science 59: 175-181.

Tempé, J; Goldmann, A. 1982. Occurrence and biosynthesis of opines. En: Kahl, G; Schell, J (Eds) Molecular Biology of Plant Tumors, pp. 427-449. Academic Press, New York.

Tendille, C; Lecerf, M. 1974. Multiplication végétative de l'asperge (*Asparagus officinalis* L.). Ann. Amélior. Plantes 24: 268.

Thomashow, M; Hugly, S; Buchholz, W; Thomashow, W. 1986. Molecular basis for the auxin-independent phenotype of crown gall tumor tissues. Science 231: 616-618.

Tumer, N; O'Connell, K; Nelson, R; Sanders, P; Beachy, R. 1987. Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants. EMBO J. 6: 1181-1188.

- Urban, L; Sherwood, J; Rezende, J; Melcher, U. 1990. Examination of mechanisms of cross protection with non-transgenic plants. *Recognition and Response in Plant Virus Interactions*. Heidelberg: Springer Verlag. pp 417-428.
- Vaeck, M; Reynaerts, A; Höfte, H; Jansens, S; De Beuckeleer, M; Dean, C; Zabau, M; Van Montagu, M; Leemans, J. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 327: 33-37.
- Vancanneyt, G; Schmidt, R; O'Connor-Sanchez, A; Willmitzer, L; Rocha-Sosa, M. 1990. Construction on an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet* 220: 245-250.
- van den Elzen, P; Townsend, J; Lee, K; Bedbrook, J. 1985. A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Mol. Biol.* 5: 299-302.
- Van der Wilk, F; Huisman, M; Cornelissen, B; Huttinga, H; Goldbach, R. 1989. Nucleotide sequence and organization of potato leafroll virus genomic RNA. *FEBS Letters* 245 (1,2): 51-56.
- Van der Wilk, F; Posthumus-Luke Willink, D; Huisman, M; Huttinga, H; Goldbach, R. 1991. Expression of the potato leafroll luteovirus coat protein gene in transgenic plants inhibits viral infection. *Plant Mol. Biology* 17:431-439.
- Van Dun, C. M. P; Bol, J. F; Van Vloten-Doting, L. 1987 a). Expression of alfalfa mosaic virus and tobacco rattle virus coat protein genes in transgenic tobacco plants: Evidence of broad spectrum resistance. *Bio/Technology* 7:1257-1262.
- Van Dun, C; Bol, J; van Vloten-Doting, L. 1987 b). Expression of alfalfa mosaic virus and tobacco rattle virus protein genes in transgenic tobacco plants. *Virology* 159: 299-305.
- Van Dun, C. M. P; Overduin, B; Van Vloten-Doting, L; Bol, J. F. 1988 a). Transgenic tobacco expressing tobacco streak virus or mutated alfalfa mosaic virus infection. *Virology* 164: 383-389.



- Van Dun, C; Bol, J. 1988 b). Transgenic tobacco plants accumulating tobacco rattle virus coat protein resist infection with tobacco rattle virus and pea early browning virus. *Virology* 167: 649-652.
- Van Haute, E; Joos, H; Maes, M; Warren, H; Van Montagu, M; Schell, J. 1983. Intergenic transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: a novel strategy for the reversed genetics of the Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 2: 411-417.
- van Slogteren, G; Hoge, J; Hooykaas, P; Schilperoort, R. 1983. Clonal analysis of heterogeneous crown gall tumor tissues induced by wildtype and shooter mutant strains of *Agrobacterium tumefaciens* expression of T-DNA genes. *Plant. Mol. Biol.* 2:321-333.
- van Slogteren, G; Hooykaas, P; Schilperoort, R. 1984. Silent T-DNA genes in plant lines transformed by *Agrobacterium tumefaciens* are activated by grafting and by 5-azacytidine treatment. *Nature* 333: 866-869.
- Vargas, H. 1970. Observaciones sobre biología y enemigos naturales de la polilla del tomate, *Gnorimoschema absoluta* (Meyrick). Lep. Gelechiidae. Dept. Agricultura Universidad del Norte-Arica. IDESIA: 75-110.
- Veidt, I; Lot, H; Leiser, M; Scheidecker, D; Guilley, H; Richards, K; Jonard, G. 1988. Nucleotide sequence of beet western yellow virus RNA. *NAR* 16: 9917-9932.
- Ward, J; Dale, E; Nester, E; Binns, A. 1990. Identification of a VirB10 protein aggregate in the inner membrane of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bact.* 172: 5200-5210.
- Waterhouse, P; Gildow, F; Johnstone, G. 1988. Luteovirus group. *Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol. Descr. Plant Viruses* No 339. Kew, Surrey, England.
- Waterhouse, P; Martin, R; Gerlach, W. 1989. BYDV-PAV virions contain readthrough protein. *Phytopathology* 79: 1215.
- Wenzler, H; Mignery, G; May, G; Park, W. 1989. A rapid and efficient transformation method for the production of large numbers of transgenic potato plants. *Plant Science.* 63: 79-85.

Wilson, T. 1984. Cotranslational disassembly of tobacco mosaic virus *in vitro*. Virology 137: 255-265.

Wilson, T; Watkins, P. 1986. Influence of exogenous viral coat protein on the cotranslational disassembly of tobacco mosaic virus (TMV) particles *in vitro*. Virology 149: 132.

Wilson, F; Flint, H; Deaton, W; Fischhoff, D; Perlak, F; Armstrong, T; Fuchs, R; Stapp, B. 1992. Resistance of cotton lines containing a *Bacillus thuringiensis* toxin to Pink Bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) and other insects. J. of Economic Entomology 85: 1516-1521.

Wisniewski, L; Powell, P; Nelson, R; Beachy, R. 1990. Local spread of tobacco mosaic virus in transgenic tobacco. The Plant Cell 2: 559-567.

Yanofsky, M; Porter, S; Young, C; Albright, L; Gordon, M; Nester, E. 1986. The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. Cell 47: 471-477.

Zaenen, I; Van Larebeke, N; Teuchy, H; Van Montagu, M; Schell, J. 1974. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. J. Mol. Biol. 86: 109-127.

Zambriski, P. 1992. The *Agrobacterium*-plant cell transfer story. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 465-490.

Zerback, R; Dressler, K; Hess, D. 1989. Flavonoid compounds from pollen and stigma of *Petunia hybrida*: inducers of the *vir* region of the *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Sci. 62: 83-91.

Resumen

La papa es el cuarto cultivo en orden de importancia mundial luego del trigo, el maíz y el arroz. El cultivo resulta seriamente afectado por virus, insectos y malezas que aumentan los costos de producción, reducen el rendimiento y la calidad y obligan al uso de agroquímicos. La técnica de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* permite la transferencia de genes de interés agronómico al fondo genético de los cultivares apreciados por el productor sin modificación del mismo. Se utilizó esta técnica para la obtención de plantas resistentes al virus del enrollamiento de la hoja (PLRV), al ataque por larvas de la polilla del tomate y al herbicida total fosfinotricina.

#### 1) Resistencia a PLRV por expresión del gen de la cápside.

Para realizar el clonado del gen de cápside viral, así como también parte de los extremos 5' y 3' no codificantes aledaños a este gen, se amplificó el fragmento de interés por la técnica de PCR usando RNA total de planta infectada como templado. Esto evita la purificación viral, que es particularmente difícil en el caso de PLRV que replica solamente en células de floema y acompañantes. Se secuenció el fragmento en estudio, encontrándose entre 89 y 53 % de homologías (a nivel de nucleótidos) con las secuencias de cápsides de aislamientos recientemente publicados. Se construyó un vector binario recombinante, de manera que el gen de cápside de PLRV quedara bajo la regulación de un promotor y un terminador adecuados para la expresión de este gen en plantas. Utilizando la técnica de transformación de hoja mediada por *Agrobacterium* previamente puesta a punto para un cultivar de uso local (Huinkul-MAG), se obtuvieron 84 plantas transgénicas. Se confirmó que algunas expresaban el mRNA de el gen de cápside por Northern blot. Asimismo, se hizo un ensayo de multiplicación viral (cuantificada por ELISA) en plantas transgénicas y control (sin transformar) infectadas mediante áfidos que previamente se habían alimentado en plantas de papa con infección secundaria de PLRV.

#### 2) Resistencia a insectos por expresión de la toxina de *Bacillus thuringiensis* (BT).

La plantas transgénicas Alfa 1 y Alfa 2 fueron el resultado de la transformación del cultivar Alfa de papa con un vector que lleva el gen que codifica para la toxina de BT bajo el control de un promotor inducible por daño. Se confirmó que el gen de interés estaba integrado en el genoma por Southern blot, y que se expresaba por Northern blot.

Para determinar si las plantas Alfa 1 y Alfa 2 presentaban actividad insecticida frente a un lepidóptero minador, se hicieron ensayos de actividad biológica estudiando la sensibilidad de larvas de polillas de tomate (*Scrobipalpus absoluta* Meyrik) frente a la toxina que estas plantas, teóricamente expresan. A las dos semanas de la eclosión de las larvas, se observaron galerías y larvas vivas tanto en las hojas de las plantas transgénicas como en los controles sin transformar. Si embargo el daño observado (tamaño y número de galerías) en las plantas transgénicas fue considerablemente menor que el registrado en las plantas control. Asimismo el desarrollo de las larvas criadas sobre plantas transgénicas fue menor que el observado en las plantas control ya que no alcanzaron el estadio de pupa, y por lo tanto tampoco el de adulto, lo que sí ocurrió normalmente en las plantas control.

3) Resistencia a fosfinotricina (PPT, principio activo del herbicida total Basta®) por expresión de una enzima detoxificante.

Se obtuvo una planta transgénica (llamada AE2) que expresa el gen *bar* que codifica para una enzima capaz de inactivar a la fosfinotricina por acetilación. AE2 presentó resistencia a fosfinotricina tanto *in vitro* como *in vivo*.

MARIAH DELAS