



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS VEGETALES  
TESIS DE MAGISTER**

**EVALUACIÓN DE RESISTENCIA EN TUBÉRCULOS TRANSGÉNICOS  
DE PAPA SOLANUM TUBEROSUM VAR. DESIRÉE A ERWINIA  
CAROTOVORA SPP ATROSÉPTICA**

**CORALI SILVA ROJAS**

**SANTIAGO - CHILE  
1997**

**FACULTAD DE AGRONOMIA**



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE  
FACULTAD DE AGRONOMÍA E INGENIERÍA FORESTAL  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS VEGETALES  
POSTGRADO CIENCIAS AGROPECUARIAS  
(PRODUCCIÓN DE CULTIVOS)

---

**EVALUACIÓN DE RESISTENCIA EN TUBÉRCULOS TRANSGÉNICOS DE  
PAPA SOLANUM TUBEROSUM VAR DESIRÉÉ A ERWINIA  
CAROTOVORA SPP ATROSEPTICA**

Trabajo de investigación presentado como parte  
de los requisitos para optar al grado de  
Magister en Producción de Cultivos

**CORALI SILVA ROJAS**

Profesor guía:

Patricio Arce Johnson. Ph.D.

Profesores Informantes:

Gastón Apablaza Hidalgo. Ph.D.  
Marlene Gebauer. M.Sc.

SANTIAGO-CHILE

1997

---

SIBUC  
BIBLIOTECA SAN JOAQUÍN  
COLECCIONES ESPECIALES

## DEDICATORIA

A mis padres

A mis tios

A mis hermanos

A mis sobrinos

A Luis

A mi querida

Hermana Hilda

**AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi sincero agradecimiento:

- Al Dr. Patricio Arce Johnson, patrocinador de la presente tesis, por su ayuda intelectual y apoyo recibido durante la conducción del presente trabajo.
- A la Dra. Pauline Oliguer Gonzales, responsable del proyecto Fondef-An 95, quien me permitió el ingreso al mundo de la Biotecnología Vegetal.
- Al profesor informante, Dr. Gastón Apablaza, Director del Programa de Postgrado en Producción de Cultivos, por su valioso aporte durante el trabajo experimental y en la corrección del presente escrito .
- A la M.Sc. Marlene Gebauer, profesora informante y Andrea Stipo por su importante colaboración durante la instalación y evaluación de los experimentos.
- Al Dr. Luis Barrales, Jefe de la Unidad de Biometría y Computación, e Ivan Peña, por sus valiosas observaciones y contribución en la elaboración del análisis estadístico.
- Al Dr. Peter Hirsch-Reinshagen, representante del Servicio Académico de Intercambio Alemán (DAAD), por el apoyo recibido durante mi estadía en Chile.
- A los profesores del Departamento de Producción de Cultivos de la facultad, por sus valorables consejos durante mi formación profesional.

## INDICE

	pag
Lista de figuras	6
Lista de cuadros	7
I. INTRODUCCIÓN	8
II. REVISIÓN DE LITERATURA	13
2.1. Generalidades	13
2.2. <i>Erwinia</i>	14
2.2.1. Características generales de la especie	14
2.2.2. Ecología y distribución	16
2.2.3. Histopatología	17
2.2.4. Sintomatología	18
2.2.5. Ciclo de la enfermedad y epidemiología	21
2.2.6. Patogenicidad	23
2.2.7. Secreción de enzimas extracelulares	25
2.2.8. Identificación de genes de virulencia	25
2.2.9. Resistencia	26
2.2.9.1. Mecanismos de defensa natural	26
2.2.9.2. Variación genotípica	27
2.2.9.3. Respuesta a heridas	28
2.2.9.4. Azúcares y otros solutos	30
2.3. Métodos de evaluación de la resistencia	30
2.4. <i>Solanum tuberosum</i> var. <i>Desirée</i>	32
2.4.1. Origen de las papas cultivadas	32
2.4.2. Variedad <i>Desirée</i>	33
2.5. Ingeniería Genética	33
2.5.1. Antecedentes	33
2.5.2. Inmunidad humoral en insectos	37
2.5.2.1. Mecanismo de resistencia a bacterias	38

2.5.3. Caracterización de los péptidos bactericidas	38
2.6. Mecanismo de control de la expresión de los genes	41
2.7. Logros	43
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>48</b>
3.1. Procedencia y mantenimiento de la cepa de <i>Erwinia carotovora atroseptica</i>	48
3.2. Construcciones genéticas	49
3.3. Procedencia de los tubérculos transgénicos	49
3.4. Tratamiento a los tubérculos	52
3.5. Método de inoculación.	52
3.6. Método de evaluación.	54
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>65</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>74</b>
<b>VII. REFERENCIAS</b>	<b>75</b>
<b>VIII ANEXOS</b>	<b>80</b>

## LISTA DE FIGURAS

No	Descripción	Pág.
1.	Pudrición bacteriana blanda, <i>E. carotovora</i> , infección del tubérculo	46
2.	Pierna negra y pudrición blanda causada por <i>Erwinia carotovora atroseptica</i> .	46
3.	Representación esquemática de factores importantes en la fitopatogenicidad de <i>Erwinia carotovora spp atroseptica</i>	47
4.	Blanco de las principales clases de proteínas antibacteriales y péptidos inducidos hacia la cubierta bacterial.	47
5.	Construcción del T-DNA que contiene los genes de Atacina, Cecropina y Lisozima, con sus respectivo promotor CaMV 35S y terminador NOS.	50
6.	Transformación y regeneración de plantas a partir de discos de hojas conteniendo el gen foraneo transferido presente dentro de los bordes del T-DNA del vector.	51

7. Análisis de resistencia a <i>Erwinia carotovora spp</i> <i>atroséptica</i> en tubérculos transgénicos de <i>Solanum</i> <i>tuberosum var. Desirée</i> que expresan el gen de Atacina	59
8. Análisis de resistencia a E.c.a. en tubérculos transgénicos de <i>S. tuberosum var. Desirée</i> que expresan el gen de Cecropina.	60
9. Análisis de resistencia a <i>Erwinia carotovora spp</i> <i>atroséptica</i> en tubérculos transgénicos de <i>Solanum</i> <i>tuberosum var. Desirée</i> que expresan el gen de Lisozima	61
10. Líneas transgénicas de papa que expresan los genes de Atacina, Cecropina ó Lisozima con resistencia superior al testigo.	64

#### LISTA DE CUADROS

No	Descripción	Pág.
1.	Principales características de <i>Erwinias</i> de la pudrición blanda que ocasionan daños en papa.	16
2.	Temperaturas de desarrollo(°C) para distinguir diferentes spp de <i>Erwinia</i> de la pudrición blanda	31
3.	Plantas transgénicas producidas	35
4.	Escala de evaluación para resistencia a pudrición blanda en tubérculos de papa.	54

## EVALUACIÓN DE RESISTENCIA EN TUBÉRCULOS DE PAPA TRANSGÉNICA VAR.

DESIRÉE A *Erwinia carotovora* spp *atroseptica*.

## I - INTRODUCCIÓN

La papa *Solanum tuberosum* L. constituye uno de los productos básicos en la alimentación de la población mundial. Este cultivo tiene gran importancia social puesto que es producido por pequeños agricultores. La calidad de semilla que utilizan los pequeños agricultores en Chile es baja debido a la alta incidencia de patógenos (virus, bacterias, hongos etc.) los que permanecen en forma latente y se manifiestan al ser cultivados (Fainguembaum., 1988).

La papa es un cultivo tradicional de clima frío, que actualmente se siembra en regiones cálidas, debido a su excelente calidad nutricional y alto rendimiento por unidad de área y tiempo, donde los problemas de enfermedades bacterianas vienen a ser de gran importancia (Bain y Pérombelon., 1988)

La "pudrición blanda", enfermedad ocasionada por la bacteria *Erwinia* spp, es la mayor causa de pérdidas de tubérculos de papa durante el transporte y almacenamiento. El riesgo de las pudriciones blandas de tubérculos en almacén es una constante preocupación particularmente para el productor de papa.

A diferencia de las enfermedades en almacén causadas por hongos, no hay un efectivo control químico para evitar las pudriciones blandas ( Lapwood y Read, 1985 ).

Estudios realizados en semilleros de papa en certificación de las categorías básica y prebásica en la X región, indican que el potencial de infección latente en tubérculos varía entre 40% y 100 % para ambas categorías, demostrándose que existe una alta cantidad de semillas con la bacteria presente. La principal bacteria aislada fue identificada como *Erwinia carotovora spp atroseptica* (Acuña y Riffo, 1991). En Chile se estima que *Erwinia spp* causa pérdidas de alrededor del 10% en almacenamiento y 5% de la producción de tubérculos en campo (Ciampi y Passalacqua, 1983).

*Erwinia carotovora spp atroseptica*, desarrolla la enfermedad denominada pudrición blanda de los tubérculos y pie negro en la base de los tallos. El daño causado por esta bacteria es de gran importancia económica para Chile. (Kalazich y Santos, 1990). La poca aceptación y disponibilidad de bactericidas comerciales, ha incrementado el interés en desarrollar cultivares de papa resistentes al pie negro y pudrición blanda (Bisht, et al. 1993). El mejoramiento de las características deseables mediante el uso de técnicas tradicionales, tienen ciertas limitaciones, ellas pueden tomar 10 años para introducir, seleccionar y establecer una característica particular en un cultivar.

La resistencia a enfermedades es un área que ha tomado mucha fuerza en los últimos años. En este sentido Lyon (1989), reporta que durante el desarrollo de la planta se diferencian genes de resistencia específicos (contra ciertas razas de un patógeno) y genes de resistencia general (efectivos contra numerosos genotipos). A la fecha no se conoce resistencia vertical contra bacterias de la pudrición blanda en papa. Toda la variación de resistencia en cultivares de papa, se debe a genes de resistencia horizontal.

Debido a la existencia de un gran número de especies y tipos de bacterias patógenas, se hace difícil mediante el mejoramiento tradicional conseguir resistencia a la mayoría de ellas. La ingeniería genética vegetal, ofrece la posibilidad de introducir una característica simple, modificando caracteres de importancia agronómica en la planta de una variedad muy aceptada o tradicional (Jaynes, et al., 1986). Varios genes pueden ser introducidos simultáneamente mediante la transformación de papa o de otras plantas cultivadas (Dale and McParttlan, 1992; Stieckema, et al. 1988).

La Ingeniería Genética es un método alternativo que permite conferir resistencia biológica, utilizando un gran rango de proteínas bactericidas procedentes de otros organismos. Uno de estos organismos es el gusano de seda gigante *Hyalophora cecropia*, en el cual la pupa inmunizada responde a la infección por bacterias, sintetizando proteínas antibacterianas.

La probabilidad que una bacteria patógena pueda ser naturalmente resistente a todas estas proteínas antibacteriales es extremadamente remota (Jaynes et al., 1987 ; Hultmark, 1993; Düring, 1993). La papa ha sido usada como un sistema modelo para la manipulación de genes, no sólo por su plasticidad celular, la que le permite una fácil regeneración a partir del cultivo de tejidos, sino también porque es un cultivo de importancia mundial (Jaynes, et al. 1986).

La técnica para insertar genes foráneos en las células de los tejidos vegetales y a partir de ellos regenerar plantas en forma viable, estable y fértil, ha significado una gran oportunidad para el mejoramiento de plantas (Shain-down Kung & Ray Wu., 1993). Las plantas transgénicas obtenidas, se deben evaluar en condiciones controladas para obtener información sobre la expresión y eficiencia de los genes introducidos que codifican para función específica de resistencia a bacterias (Dale y McPartlan, 1992).

El presente trabajo de Tesis, formó parte del Proyecto FONDEF AN-95, cuyo objetivo fue producir y evaluar líneas transgénicas de papa variedad Desirée que portaban uno de los 3 genes que codifican para los péptidos bactericidas de Atacina ácida, Cecropina-B de *Hyalophora cecropia* y Lisozima de pollo. Las plantas se evaluaron en cuanto a su posible actividad antibacteriana utilizando los tubérculos de papa cultivados en cámara de crecimiento.

## HIPÓTESIS

Puesto que los tubérculos de papa almacenados son susceptibles a la enfermedad conocida como pudrición blanda provocada por bacterias del género *Erwinia*, se propone como hipótesis que: La expresión de los péptidos bactericidas en los tejidos de las plantas transgénicas de papa deberían afectar el crecimiento bacteriano, de tal manera que su presencia se podría traducir en una mayor dificultad de que la bacteria infecte la planta y ésta manifieste los síntomas de la enfermedad.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los niveles de resistencia a *Erwinia* en tubérculos transgénicos de papa (*Solanum tuberosum*) que expresan genes bactericidas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la resistencia de minitubérculos de distintas líneas transgénicas de papa (*Solanum tuberosum* var. *Desirée*), inoculadas con la bacteria patógena *Erwinia carotovora* spp *atroseptica* (E.c.a.), Cepa T.
2. Seleccionar las líneas transgénicas de papa con mayor grado de resistencia a la infección de E.c.a. en relación a los testigos *Desirée* positivo y negativo.
3. Adquirir conocimiento científico y adiestramiento tecnológico sobre las nuevas herramientas biotecnológicas utilizadas en el mejoramiento del cultivo de la papa, en Chile.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 GENERALIDADES

Las bacterias son organismos unicelulares que presentan una delgada pared celular, relativamente firme y rígidas que le permite el intercambio de nutrientes, desechos, enzimas digestivas y otros productos emitidos por la célula bacteriana. Se reproducen asexualmente mediante fisión binaria con una rapidez asombrosa. Su importancia como patógenos radica principalmente en que pueden producir enormes cantidades de células en breve tiempo.

Se conocen alrededor de 200 especies de bacterias que producen enfermedades en las plantas. Todas estas bacterias patógenas son organismos saprófitos anaerobios facultativos que no forman endosporas y pueden cultivarse artificialmente en medios de cultivos.

En condiciones favorables las bacterias, pueden dividirse cada 20 minutos, a esta velocidad una sólo bacteria podría producir un millón de ellas en 10 horas. No obstante las bacterias pueden alcanzan enormes números en corto tiempo y producir cambios químicos o bioquímicos considerables en su medio ambiente, estos cambios tienen un gran significado en el desarrollo de enfermedades bacterianas de las plantas (Agrios., 1986).

## 2.2. ERWINIA

### 2.2.1. Características generales de la especie

Erwinia es una bacteria Gram-negativa y es una de los mayores patógenos de plantas. Conocidos como el grupo de bacterias causantes de las pudriciones blandas, *Erwinia carotovora* subespecies: *carotovora* (E.c.c.); subespecie *atroseptica*(E.c.a.); subespecie *Chrysanthemi* (E.Chr.), causando importantes daños al cultivo de la papa (Robert-Baudouy, J.; CIP., 1979).

*Erwinia carotovora* var. *atroseptica* (Hellmers & Dowson) Dye (1969) pertenece al Grupo de los Bacilos anaerobios facultativos gram-negativos y a la Familia Enterobacteriaceae, según el Bergey's Manual Buchanan & Gibbons, 1974. (CIP., 1979) (Agrios., 1986).

Los grupos taxonómicos de estas Erwinias están basadas principalmente en reacciones bioquímicas y no en hospedantes específicos (Pérombelon y Kelman., 1980 ).

La característica más importante que distingue las Erwinias de la pudrición blanda de otras Erwinias, es su habilidad para producir grandes cantidades de enzimas pécticas la cual macera el tejido parenquimatoso, ellas no forman esporas, son anaerobias facultativas, la mayor parte de las razas no producen grandes cantidades de polisacáridos extracelulares cuando están en medios ricos en azúcar.

En regiones de temperatura fría, el pie negro es generalmente causado por la spp. *atroseptica*, sin embargo también se puede presentar en zonas con climas templados a calurosos (CIP., 1979).

El número de cultivos que sufren consecuentes y severos ataques antes o después de la cosecha es considerablemente menor que el número conocido de especies que pueden llegar a infectarlos (Pérombelon y Kelman, 1980).

French y De Lindo (1979) reportan que pequeñas poblaciones de *Erwinia* que se encuentran en el suelo, agua o tejido de plantas pueden incrementarse en un medio enriquecido conteniendo polipeptato de sodio (CIP, 1980). En este medio de cultivo sólido, las colonias de *Erwinia* forman hoyos profundos en 48 horas a 27°C, permitiendo su fácil recuperación. En estos medios también se desarrollan algunas especies de *Pseudomonas* y *Flavobacterium pectinovorum* las cuales también son pectolíticas.

*Erwinia carotovora* spp *atroseptica* forma ácido a partir de maltosa, alfa metil glucósido y productos de reducción de la sacarosa y no se desarrolla sobre los 36° C en agar o caldo nutriente. Por el contrario las razas de *Erwinia carotovora* spp *carotovora* si se desarrollan por encima de los 36°C en agar o caldo nutriente pero no forman ácido a partir de maltosa alfa metil glucosido y productos de reducción de la sacarosa

Cuadro 1. Principales características de *Erwinias* de la pudrición blanda que ocasionan daños en papa.

Característica\ spp.	E.c.c.	E.c.a.	E.chry.
Forma Acido a partir de			
Maltosa	-	+	-
Alfa metil glucosido	-	+	-
Palatinosa	-	+	-
Reducción de sacarosa	-	+	-

Fuente: Pérombelon 1979.

### 2.2.2. Ecología y distribución.

Las pudriciones blandas ocasionadas por bacterias del género *Erwinia* producen gran parte de sus poblaciones en el suelo y pueden desarrollarse y mantenerse en actividad en una amplia variedad de temperaturas. La temperatura mínima, óptima y máxima para que se desarrolle la enfermedad son 5, 22 y 36 °C, respectivamente (Agrios., 1986)

Las enfermedades bacterianas de las plantas se producen en cualquier sitio que sea suficientemente húmedo y cálido afectando casi todo los tipos de plantas, y bajo condiciones ambientales favorables, pueden ser extremadamente destructivas.

Las *Erwinias* de la pudrición blanda tienen una amplia distribución en el mundo y una o más de estas están presentes en stock de papa almacenada. La subespecie *atroseptica* es específica

de papa, sin embargo es común encontrarlas en regiones frías y su presencia es ocasional en regiones calurosas, probablemente asociadas a semillas importadas. Los requerimientos de temperatura de la subespecie *atroseptica* y su distribución, está restringida al cultivo de la papa, el que usualmente se desarrolla en zonas frías (Pérombelon, 1979) (Bain y Pérombelon, M.C.M. 1988).

### 2.2.3. Histopatología

A diferencia de los hongos fitopatógenos, es imposible que las bacterias de la pudrición blanda penetren en la cutícula de las plantas directamente. Sin embargo, pueden ingresar a través de heridas superficiales producidas durante la cosecha, lavado, clasificación o transporte de las papas, o puede ocurrir naturalmente durante el desarrollo de la planta a través de las lenticelas de los tubérculos. Las heridas no solamente son las vías físicas para la penetración del patógeno, también proporcionan nutrientes fácilmente disponibles para el crecimiento bacteria. La variación de la respuesta a heridas entre cultivares, se cree que afecta la susceptibilidad a la infección.

La pudrición de los tubérculos puede ser iniciada en las lenticelas, heridas, en los puntos de unión con el estolón o en las lesiones causadas por el sol y tubérculos afectados por heladas o enfermedades fungosas (Pérombelon y Kelman, 1980). Una vez dentro del tubérculo, la bacteria se propaga a los tejidos vía los espacios intercelulares del parénquima de almacenamiento y puede ocurrir una infección restringida de los elementos del floema y xilema (Lyon, 1989).

#### 2.2.4 Sintomatología

Los síntomas de **pie negro (soft rot)** se presentan en cualquier estado de desarrollo de la planta. Tallos de plantas afectadas muestran pudrición típica que tiene la apariencia de una tinta negra, la misma que se deriva de la semilla deteriorada. El daño puede abarcar todo el tallo o estar restringido a unos milímetros de la base. La porción del tejido medular del tallo sobrepasa la zona decolorada por efecto de la enfermedad y el tejido vascular se ennegrece (figura 2). Las plantas afectadas detienen su desarrollo, y el follaje se vuelve clorótico. Inicialmente los folíolos tienden a enrollarse con los márgenes laterales hacia arriba y posteriormente la planta se marchita lentamente y eventualmente muere. Los brotes y retoños pequeños al ser invadidos por la bacteria pueden morir antes de emerger.

Factores medio ambientales juegan un importante rol en el desarrollo de daños de pie negro. El desarrollo de la enfermedad está frecuentemente asociado a condiciones de alta humedad. Estos factores probablemente son la causa de la combinación de efectos directos sobre el patógeno, así como la pérdida de resistencia del hospedero.

En climas húmedos, la parte afectada toma consistencia blanda y viscosa puede llegar a extenderse hasta la mayor parte de la planta, sin embargo en clima seco, el tejido afectado se encuentra a menudo restringido a la parte subterránea del tallo presentando una apariencia seca y arrugada.

Se ha detectado diferencia en la susceptibilidad a pie negro causados por E.c.a. en tallos de diferentes cultivares de papa. Las respuestas son diferentes en tubérculos (parte subterránea) que en tallos (parte aérea); hay una fuerte evidencia que existen mecanismos de control de la resistencia a bacterias en los tallos, asociados con factores bioquímicos (Lyon, 1989). Bain and Pérombelon, (1990), trabajaron con tubérculos semilla de papa y determinaron que se redujo la emergencia de brotes con altas cantidades de bacteria sobre los tubérculos durante la siembra. Las pérdidas estuvieron posiblemente relacionadas a la incidencia de pie negro en siembra tardía.

#### **Pudrición blanda (soft rot)**

La pudrición blanda de la papa, afecta los tubérculos y parte de la planta que se encuentra sobre la superficie del suelo. El ataque a tubérculos se produce en almacén o en el suelo antes de la cosecha y aquellos tubérculos infectados que se usan como semilla, se deterioran después de la siembra. El síntoma más común es la pudrición de tubérculos, que se observa, varias semanas después de iniciado el almacenamiento.

En muchos casos al momento de la cosecha, los tubérculos aparentemente sanos están infectados en forma latente. Tales tubérculos no muestran síntomas, pero llevan bacterias sobre la superficie, en las lenticelas y heridas. Mas tarde, estas bacterias pueden infectar el tejido del tubérculo (Elphinstone, J.G. 1986).

Las lesiones asociadas con daño mecánico son hundidas o irregulares, el tejido afectado es húmedo y generalmente de color crema a castaño oscuro y de consistencia blanda ligeramente granular. Existe una profunda demarcación entre el tejido sano y enfermo, por lo que la parte afectada puede desprenderse con facilidad. Cerca de los márgenes de las lesiones se forma a menudo un pigmento de color castaño a negro (figura 1).

Los tubérculos que provienen de plantas infectadas pueden mostrar síntomas típicos de una pudrición blanda en la región medular, cuyos síntomas varían desde una ligera decoloración vascular al extremo del estolón, hasta una pudrición que compromete todo el tubérculo. Aunque el tejido enfermo es inodoro, a medida que la pudrición avanza adquiere un olor desagradable debido a la acción de organismos secundarios particularmente activos a 25°C (Hooker, 1980).

Bajo condiciones anaeróbicas resultantes de exceso de humedad, los tubérculos se vuelven susceptibles, las bacterias se empiezan a multiplicar y causan pudrición. (Pérombelon y Kelman, 1980). Si se siembran tubérculos semilla enfermos, quedarán fallas en los surcos debido a la pudrición de los tubérculos antes de su brotación. El número de *E. carotovora* que han sido detectadas naturalmente en las lenticelas son menores a 100, una simple invasión de bacterias puede conducir a una severa infección y multiplicación dentro de la planta (Pérombelon, 1982).

Aunque la pudrición blanda y el pie negro son generalmente descritas por separado, el pie negro es frecuentemente una extensión de la pudrición blanda del tubérculo (Elphinstone, J.G. 1986).

#### 2.2.5. Ciclo de la enfermedad y epidemiología

El inóculo primario se encuentra sobre o dentro de la semilla, después de la siembra el tubérculo madre o fracción de tubérculo sembrado que se va deteriorando liberando hacia el suelo gran cantidad de bacterias eventualmente produciendo plantas infectadas (CIP, 1980).

La importancia del tubérculo madre como fuente de contaminación, se ha demostrado por la extensión de la contaminación a los tubérculos hijos sólo después del deterioro del tubérculo madre. Pérombelon (1979), sugiere que el agua del suelo probablemente es el mayor factor responsable de esta enfermedad. Esta no sólo afecta el movimiento de la bacteria desde el tubérculo madre deteriorado en el suelo a los tubérculos hijos; si no además, los niveles de contaminación de los tubérculos hijos durante la época de crecimiento.

Los factores que conducen al deterioro temprano del tubérculo madre, están asociados con los altos niveles de pudrición y pie negro (Pérombelon, 1979).

Los estudios sobre la ecología de *Erwinia sp.* que causa la pudrición blanda, han demostrado que en suelos anegados las malezas

contienen grandes poblaciones de estas bacterias (CIP, 1988). Estas pueden sobrevivir en el tubérculo contaminado durante todo el período de almacenaje (CIP, 1980). En regiones templadas donde sólo la subespecie *atroseptica* causa pie negro, los tubérculos semilla son contaminados cuando el patógeno está presente. Se ha demostrado que pie negro está más asociado con tubérculos semillas grandes que con pequeños. Presumiblemente, en un tubérculo madre grande los niveles de inóculo son mayores que los de un tubérculo semilla pequeño. Sin embargo, la no emergencia fue más extensiva cuando se utilizaron para la siembra tubérculos pequeños (Pérombelon, 1979). En regiones frías (18-19°C), la incidencia de pie negro es mayor que en zonas calurosas, especialmente en tubérculos semillas que proceden de zonas calurosas. Altas temperaturas ambientales son más favorables para la expresión de los síntomas (generalmente 30-35°C). Pérombelon, (1979) reporta que la longevidad de E.c.a. en el suelo y está relacionada con la temperatura del suelo y el contenido de humedad. Además E.c.a. sobrevive en el suelo por sólo pocas semanas (3-6) y que la sobrevivencia fue efímera cuando las temperaturas excedieron a 25°C.

La infección por *Erwinia* se ve favorecida por un ambiente anaerobio. Se ha visto que deben existir al menos  $10^2$  bacterias por herida para iniciar la pudrición en anaerobiosis, en cambio en aerobiosis, se necesitan al menos  $10^6$ - $10^7$  microorganismos para provocar la misma respuesta (Deboer & Kelman, 1978).

La pudrición de los tubérculos se inicia cuando abundante agua está disponible y prevalecen condiciones anaeróbicas. El agua tiene dos roles fundamentales: A) Aumenta la turgidez del tejido del tubérculo y B) La presencia de una película de agua ininterrumpida sobre la superficie del tubérculo, rápidamente causa anaerobiosis dentro de todo el tubérculo, agotando el oxígeno por la respiración en 2.5 horas a 22°C. La deficiencia de oxígeno afecta la integridad de la membrana celular lo que se traduce en una salida de agua y solutos desde las células turgentes.

La salida del contenido celular está relacionado con la aparente reducción de la resistencia del tubérculo en condiciones anaerobias. Las Erwinias de la pudrición blanda son patógenos que invaden sus hospederos y causan podredumbre cuando otras condiciones que la susceptibilidad de su hospedero favorece su crecimiento y la producción de grandes cantidades de enzima pépticas (Pérombelon, 1979).

#### **2.2.6. Patogenicidad**

##### **Mecanismo de la patogénesis**

La característica principal que diferencia a las tres Erwinias de la pudrición blanda (**E.c.a.**, **E.c.c.**, **E.chr.**) de otras especies de **Erwinia**, es la capacidad de producir enzimas pépticas en abundancia, las mismas que son capaces de macerar el tejido parenquimatoso alterando la integridad estructural del hospedante (Pérombelon y Kelman, 1980).

Estas bacterias secretan pectinasas que degradan el parénquima vegetal, celulasas, proteinasas y lipasas que depolimerizan los componentes de la pared vegetal (Collmer y Keen, 1986). (figura 3.) Las pectinasas, celulasas y proteasas son consideradas fundamentales en el mecanismo de patogénesis de la pudrición blanda (Robert-Baudouy, J. 1991).

Dos de los factores que conducen al desarrollo de la pudrición blanda son los bajos niveles de oxígeno y las altas temperaturas. Se demostró que ni las condiciones anaeróbicas, ni la temperatura por si mismas predisponen necesariamente a la pudrición de los tubérculos, sino que debe existir agua libre sobre ellos el cual cumple un doble rol, al afectar la actividad bacteriana y las reacciones de defensa del tubérculo (Elphinstone, J.G. 1986)

Las bacterias no pueden penetrar a través del peridermo, lo hacen a través de heridas o lenticelas cuando existe una película de agua. Ambas vías de entrada proporcionan acceso a los espacios intercelulares dentro de los tubérculos. Durante los estadios iniciales de invasión del parénquima cortical, las bacterias están confinadas a los espacios intercelulares, en ellos disuelven porciones de la lámina media permitiendo a las bacterias moverse en los nuevos espacios creados. Si la pudrición no es detenida por un cambio en el ambiente, todo el tubérculo es rápidamente desintegrado. En el caso de infección a través de las lenticelas, la pudrición queda encerrada dentro del tubérculo.

### 2.2.7. Secreción de enzimas extracelulares

Mutantes deficientes en la secreción de enzimas fueron seleccionados de varias razas de *Erwinia*. En los mutantes estudiados, la secreción de pectinasas y celulasas estaban afectadas. Estas enzimas al parecer son secretadas independientemente por 2 componentes del mecanismo involucrado en el transporte desde el periplasma hacia el exterior. (figura 1.)

### 2.2.8. Identificación de genes de virulencia

Mutantes deficientes en su habilidad de macerar una serie de tejidos de plantas, indican el rol fundamental de los genes que intervienen en la patogénesis de la *Erwinia*. Algunos de estos genes, que codifican nuevas enzimas pectinolíticas, son inducidos por productos o elicitores de plantas, confirmando que hay una coordinación bioquímica no muy bien caracterizada, que ocurre en la interfase planta-patógeno.

Los experimento descritos por Kotoujanski, A (1987), demuestran claramente que la secreción de pectinasas causa la maceración del tejido de plantas por las Erwinias de la pudrición blanda. Además, los síntomas pueden ser reproducidos con una sola enzima pectinolítica, en ausencia de cualquier otra actividad de degradación de la pared celular (Robert-Baudouy, 1991).

## 2.2.9. RESISTENCIA

### 2.2.9.1. Mecanismos de defensa natural

Producto de la interacción entre una planta y un potencial agente patógeno se genera una serie de señales moleculares que determinan el establecimiento del cuadro infectivo o la activación de los mecanismos de defensa natural en la planta.

La hipótesis mas aceptada que explicaría la resistencia o susceptibilidad que muestran ciertas variedades frente a un patógeno (hipótesis gen por gen) propone que existen uno o más genes en el patógeno y en la planta, cuyos productos permiten el reconocimiento de ambos organismos, condición que sería necesaria para que se gatillen los mecanismos de defensa de la planta. De acuerdo a esta hipótesis, la resistencia de una planta frente a un patógeno particular, podría estar dada por la ausencia de estos genes en uno de estos organismos, o por su falta de funcionalidad.

La estructura de la pared celular de plantas ha sido investigada para demostrar que los aspectos estructurales confieren resistencia a la infección. Diferencias en la composición de la pared celular puede tener algún rol en limitar la extensión de la infección por patógenos. Es muy probable que en la papa las pectinas estén implicadas en reacciones de reconocimiento entre la planta y el patógeno. Se ha encontrado que tejidos de tubérculos de cultivares resistentes a la pudrición blanda contienen altas cantidades de pectina (Lyon., 1989).

#### 2.2.9.2. Variación genotípica

Existen diferencias en el grado de susceptibilidad a la pudrición blanda causada por *Erwinias* entre tubérculos y tallos (Lapwood et al. 1984). Además se han descrito notables diferencias entre el nivel de resistencia de tubérculos. Sin embargo, alguna de estas diferencias se basan en los distintos métodos de evaluación de resistencia y además por las diferentes condiciones de crecimiento y métodos de inoculación de las plantas.

Métodos para medir la resistencia a *Erwinia* spp., utilizando tubérculos han sido descritos por diferentes autores. Lyon, (1989), reporta los siguientes métodos utilizados:

\* Usando el método de tubérculos fraccionados incubados aerobicamente (Lapwood y Read, 1985) demostró que los cultivares tempranos y tardíos fueron más susceptibles a la infección por *Erwinia*.

\* Wastie, et al. (1988), reportó que esta técnica debe ser usada para detectar consistentes diferencias entre cultivares resistentes a la pudrición blanda de tubérculos causados por Eca.

\* Ibrahim et al. (1979), demostró consistentemente que los tubérculos jóvenes fueron más resistentes que los tubérculos viejos a la infección por *E.c.a.* en diferentes cultivares ensayados.

\* Bain y Pérombelon, (1987) sugieren que en condiciones aeróbicas la resistencia a la pudrición blanda en tubérculos de diferentes cultivares es mayor y menos variable que en condiciones anaeróbicas.

Se han identificado diversos grados de resistencia a la pudrición blanda en el germoplasma del Centro Internacional de la Papa, incluyendo algunas variedades nativas comúnmente cultivadas en el Perú (Elphinstone, J.G. 1986 ).

Especies de papa que presenta una resistencia simple se han reportado previamente (Austin., 1988; reportado por Düring, 1993). *Solanum brevidens* es una especie no tuberosa nativa que presenta resistencia a *Erwinia*. Sin embargo, esta especie no puede ser sexualmente cruzada con *Solanum tuberosum*. Investigaciones mediante tecnologías de genes pueden ser usadas para el desarrollo de resistencia biológica (During, K. 1993).

#### 2.2.9.3. Respuesta a heridas

Las heridas en los tejidos, es la principal vía de ingreso a la planta de la *Erwinia*. Este ingreso se asocia con el suplemento de nutrientes para la bacteria a partir de la planta.

Los tubérculos en estado de dormancia pueden ser cortados y exponer las células internas a la presencia de oxígeno. En estas condiciones el daño se inicia por la salida de carbohidratos lo que incrementa la respiración y gatilla la división celular. En la infección por bacterias que desarrollan la pudrición blanda en el tubérculo, el primer mecanismo de defensa que se estudió en detalle fue la suberización de las heridas ocasionadas en el peridermo, como

respuesta al daño físico. La suberización se desarrolla después de 96 horas, las heridas pueden causar la deposición de lignina y suberina en las paredes de las células adyacentes. La suberización es una barrera efectiva para la invasión de patógenos.

La habilidad para la producción de corcho, en las heridas de las papas, varía entre cultivares. En algunos cultivares la formación de suber o corcho ocurre dentro de las 6 horas después de producirse la herida, mientras que en otros cultivares se requiere de 48 horas o más (Lyon, 1989).

La papa responde al stress por herida activando mecanismos de defensa contra bacterias los cuales pueden ser interrumpidos por hipoxia (Cuozzo y Davis, et al. 1990); en consecuencia el ataque por *Erwinia* se ve favorecida en condiciones de anaerobiosis. Se ha visto que deben existir  $10^2$  bacterias por herida para iniciar la pudrición en anaerobiosis, en cambio en aerobiosis, se necesitan al menos  $10^6 - 10^7$  microorganismos (Deboer y Kelman, 1978).

La pudrición blanda de tubérculos en almacén es mayor cuando el contenido de oxígeno es reducido, esto ha sido atribuido a una reducción en la resistencia de los tubérculos a la infección.

#### 2.2.9.4. Azúcares y otros solutos

El paso de azúcares a través de las membranas hacia los espacios extracelulares (intercelulares) servirían de fuente de carbono para el crecimiento bacterial en estos espacios. Una correlación positiva entre el contenido de azúcares reductores y la severidad de la pudrición blanda, posterior a la infección de la herida, ha sido demostrada en un gran rango de temperaturas, cultivares, porción y edad de tubérculos. Esta relación fue validada solamente sobre condiciones aeróbicas húmedas y secas pero no cuando los tubérculos estuvieron muy mojados o en condiciones anaerobicas (Lyon, 1993). Sin embargo, no se encontró correlación entre los niveles de reducción de azúcar y la resistencia a la pudrición blanda.

### 2.3. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE RESISTENCIA A ERWINIA EN PAPA

Hasta hoy no hay un método estándar para evaluar la resistencia a la pudrición blanda y pie negro en tubérculos y tallos de papa respectivamente. Para el tamizado de tubérculos, los métodos están basados en la inoculación de rodajas o tubérculos enteros, algunos de los cuales son muy útiles debido a que permiten diferenciar niveles de resistencia y son apropiados para pruebas en gran escala. Entre resultados de evaluación de resistencia en tubérculos existe poca correlación debido al uso de diferentes técnicas de tamizado, los cuales pueden estar influenciados por factores como:

condiciones ambientales (temperatura, disponibilidad de agua); edad fisiológica; el potencial de agua del tejido; contenido de calcio en los tubérculos; grado de herida ocasionada durante la inoculación; variación del patógeno; concentración del inóculo.

En el cuadro 2. se muestran las temperaturas de desarrollo (°C) para distinguir la *Erwinia* responsables de la pudrición blanda (Pérombelon, 1979). Para evaluar la resistencia de tubérculos a la pudrición blanda en almacenamiento, se debe tener en cuenta la patogenicidad de la bacteria sobre el tejido hospedante (Lapwood, et al. 1984 ).

Cuadro 2. Temperaturas de desarrollo (°C) para distinguir distintos tipos de *Erwinia* de la pudrición blanda

Temperaturas\spp	Ecc	Eca	Echr
Mínima	6	3	6
Óptima	28-30	22-27	34-37
Máxima	37-42	35-36	45

Kuo-Ching, et al (1990), evaluó 14 cultivares de papa en su resistencia a la pudrición blanda causada por *Erwinia carotovora spp. atroseptica*. Los tubérculos de los diferentes cultivares presentaron considerables diferencias en la resistencia a esta pudrición. Tubérculos con alto contenido tanto de calcio como de materia seca fueron aparentemente menos susceptibles a la enfermedad que aquellos con menores porcentajes de estas variables. Tales diferencias podrían

deberse al contenido de agua total (potencial hídrico del tejido), a la concentración de otros solutos de bajo peso molecular, o a la presencia de material insoluble. Por ejm. pared celular que estimule el crecimiento de *E.c.a.*

Kojkowska y Kelman (1994 ) evaluaron tubérculos de ocho cultivares de papa, en su resistencia a la pudrición blanda, utilizando diferentes técnicas de inoculación. Las técnicas de inoculación: en ciertas zonas de los tubérculos con diferentes niveles de inóculo seguida por incubación bajo condiciones del ambiente o condiciones de baja oxigenación; ó inoculación de tubérculos heridos mecánicamente seguido por incubación en cámara de nebulización, mostraron similares niveles. Ambos métodos son igualmente efectivos en la evaluación y selección de tubérculos de papa en su resistencia a la pudrición blanda bacteriana. Sin embargo para obtener resultados reproducibles, se requieren numerosos tubérculos por ensayo.

## **2.4. *SOLANUM TUBEROSUM* VAR. *DESIRÉE***

### **2.4.1. Origen de las papas cultivadas**

La papa cultivada es originaria del altiplano Andino y de la región cordillerana y costera del Sur de Chile. Estos centros de diversidad lo son no sólo para la papa si no también para la mayoría de las enfermedades y plagas mas importantes en este cultivo(CIP., 1988).

#### 2.4.2. Variedad Desirée

Desirée es una variedad de origen holandés que fue introducida en Chile en 1968 por el INIA, los tubérculos son de periderma roja y parenquima amarillo, de amplia adaptación a los diferentes ambientes de cultivo en Chile y otras regiones del mundo. Con estas características domina ampliamente el mercado nacional registrando en 1990 el 60% de la superficie plantada. Entre las desventajas de esta variedad está la alta susceptibilidad a bacterias como *Pseudomonas* y *Erwinias* (Kalazich y Santos, 1990).

Bourne, et al. (1981) reportan que la susceptibilidad de la variedad Desirée a enfermedades bacterianas probablemente se debe a la lenta cicatrización de sus heridas lo que también la predispone al ataque de otros patógenos:p.e. *Phoma exigua var foveata*

### 2.5. INGENIERÍA GENÉTICA

#### 2.5.1. Antecedentes

El desarrollo en esta área de la biología de plantas se inició alrededor de 1940 cuando se iniciaron experimentos que condujeron a determinar el principio biológico que causa la formación de tumoraciones en plantas dicotiledóneas, ha demostrado ser un plásmido bacteriano que forma parte de una bacteria llamada *Agrobacterium tumefaciens*, la cual infecta plantas.

SECRET  
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIONES  
AGROPECUARIAS Y PISCICULTIVAS  
CORPORACIÓN TECNOLÓGICA

Un punto de partida en la Ingeniería Genética de plantas fue descubrir que *Agrobacterium tumefaciens* podía insertar un pequeño fragmento de su plásmido bacteriano dentro del núcleo de la planta, así el plásmido inserto era incorporado y funcionaba como cualquier otro gen de la planta. Este descubrimiento abrió la puerta para usar el plásmido de *Agrobacterium* como un vehículo para introducir DNA foráneo dentro del núcleo de la planta

El conocimiento de la biología de la planta y de la capacidad de ser cultivada *in vitro* y regenerar plantas completas a partir de pequeñas secciones de tejidos fué fundamental mejorar las plantas cultivables, introduciéndole nuevas características, algo no pensado 20 años atrás.

Las primeras plantas transgénicas fueron construidas por Hall y colaboradores (1980), mencionado por Kung y Ray WU, (1993), transfiriendo el gen de la phaseolina-B de haba a plantas de tabaco y girasol. El gran progreso de la Ingeniería Genética se refleja claramente por el incremento en el número de plantas transgénicas producidas todos los años. (cuadro 3).

Los métodos de regeneración de explantes de hojas, tallos y raíces se basan en el principio de la totipotencia celular, esto significa que cualquier célula diferenciada o no tiene la capacidad de regenerar una planta completa. Actualmente, se han simplificado

significativamente las técnicas de transformación que se utilizan en la incorporación de genes a plantas. La mayoría de las plantas transformadas son principalmente dicotiledóneas, particularmente de la familia *Solanaceae*, unas pocas monocotiledóneas y plantas leñosas (Shain-down Kung & Ray Wu., 1993).

Cuadro 3. Plantas transgénicas producidas

Tipo de plantas	Ejemplos
Monocotiledóneas	Espárrago, maíz, arroz, mijo, trigo, centeno.
Dicotiledóneas	
Legumbres	Alfalfa, trébol, soja, arveja.
Solanaceae	petunia, papa, tabaco, tomate.
Vegetales y frutales	zanahoria, uva, frambuesa, pepino, pepino dulce, apio, rábano, col, melón, papaya, frutilla, lechuga.
Cultivos especiales	Algodón, lino, lotus, remolacha, canola, girasol.
Plantas leñosas	Manzana, pera, álamo, nogal, eucaliptus, pino.
Plantas especiales	<i>Arabidopsis</i> .
Otros grupos	<i>Medicago varia</i> , <i>Vignia aconitifolia</i> , <i>Stylosante humilis</i> , entre otros.

Modificado de Shain-down y Wu., (1993).

Las técnicas tradicionales de fitomejoramiento han sido muy eficientes para la obtención de plantas resistentes, sin embargo, en relación a las enfermedades bacterianas que afectan a la papa, a pesar del gran esfuerzo desplegado en la búsqueda de resistencia varietal, no se han obtenido logros significativos.

La existencia de un gran rango de razas de bacterias hace difícil conseguir resistencia a todas ellas usando métodos tradicionales. Vemos a la Ingeniería Genética como un método alternativo para conferir resistencia usando un rango de proteínas bactericidas provenientes de otros organismos.

Uno de estos organismos es el gusano de seda *Hyalophora cecropia*, en el cual la pupa responde a la infección bacteriana sintetizando cerca de 15-20 proteínas antibacterianas que ya han sido purificadas y clasificadas en familias. La familia de las lisozimas, son proteínas antibacterianas que se encuentra en la clara de huevo y en los lágrimales del ser humano y de otros animales. Otras familias de péptidos bactericidas son las cecropinas y las atacinas.

El reciente desarrollo de las técnicas de manipulación genética de plantas permite introducir genes foráneos a la información genética de la propia planta o de la variedad tradicional, lo cual le confiere a la planta la capacidad de producir una nueva proteína cuya función es beneficiosa para la planta.

### 2.5.2. Inmunidad humoral en insectos

Boman, (1991); citado por Hultmark, (1993) fue el pionero en estudiar la pupa del gusano de seda gigante *Hyalophora cecropia*. Jaynes, et al., (1986) menciona que Boman y colaboradores trabajaron en la purificación de estas proteínas de inmunización y en el aislamiento de sus correspondientes mRNA. Luego de un corto periodo de síntesis de RNA, los insectos respondían a la presencia de bacterias mostrando una potente actividad antibacteriana, sintetizando tres tipos de proteínas bactericidas: cecropinas, atacinas y lisozima.

En un estudio posterior en 1993, se analizó la reacción antibacteriana en *Drosophila melanogaster* que se presenta luego de pocas horas de una exposición a bacterias, se observó la presencia de proteínas antibacterianas y péptidos que se acumulan en la hemolinfa del insecto (Hultmark., 1993).

La inmunidad humoral en insectos puede ser inducida por exposición a una bacteria patogénica o por otros patógenos. Este fenómeno ha sido estudiado en diferentes insectos, principalmente en los órdenes *Lepidoptera* y *Diptera*. La pupa del gusano de seda *H. cecropia*, ha demostrado ser útil para estudiar los mecanismos de defensa humoral en insectos. Cuando la pupa de *H. cecropia*, es inmunizada, induce la producción de un set de 15 proteínas que no se encontraban presentes previamente en la hemolinfa del insecto.

Esta respuesta se induce luego de exponer bacterias en la hemolinfa de los insectos. La respuesta se caracteriza por una rápida reacción en la que frecuentemente se manifiestan muchos otros factores bactericidas que se encuentran presentes en la hemolinfa del insecto (Hultmark., 1993).

#### 2.5.2.1.Mecanismo de resistencia a bacterias

Una característica importante de la actividad humoral de *H. cecropia* es que todas estas proteínas antibacterianas parecen actuar sobre diferentes blancos de las células bacterianas. Algunos péptidos descritos en el sistema inmune del insecto *H. cecropia*, con actividad bactericida son: **Atacina**, con actividad sobre la membrana externa de bacterias gram negativas, **Lisozima**, una molécula pequeña con actividad bactericida sobre la pared celular de bacterias gram positivas y **Cecropina**, con actividad bactericida sobre la membrana interna de bacterias gram positivas y negativas (figura 4). Para introducir estos genes a plantas de papa *Solanum tuberosum* var. Desirée, se han descrito técnicas de transformación mediada por bacterias *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rizógenes*.

#### 2.5.3.Caracterización de los péptidos bactericidas

##### **Atacina**

Las atacinas son las más grandes moléculas antibacterianas encontradas en la hemolinfa de la pupa inmunizada de *H. Cecropia*, con un peso molecular de alrededor a 2,000 Daltons.

Se han identificado 6 diferentes atacinas. Los resultados al comparar las secuencias de aminoácidos del extremo N-terminal de 5 de estas atacinas indican la presencia de 3 regiones básicas y 2 ácidas las que son claramente diferentes una de otra. La forma de la sexta atacina encontrada en la hemolinfa, es probablemente el producto de la modificación secundaria de las 2 moléculas precursoras (Jaynes., et al 1987).

### **Cecropinas**

Cecropinas son una familia de péptidos homólogos de 35 a 37 residuos antibacterianas que proceden de la pupa inmunizada del gusano de seda gigante *Hyalophora Cecropia* (Boman., et al. 1991 citado por Hultmark (1993).

Es el más potente grupo de agentes antibacteriales, su espectro de acción es contra bacterias gram positivas y gram negativas. Las cecropinas son pequeñas, su peso molecular es 4,000 daltons (4 k Da) y son básicas, representan un componente clave en la respuesta inmune de diversos insectos (Jaynes et al. 1987), (Florack., et al. 1995).

Estos péptidos presentan tres formas denominadas A, B y D. Al parecer las cecropinas son productos de 3 genes, que como en el caso de las atacinas, se han originado por duplicación de genes (Jaynes., et al. 1987).

Las 3 principales cecropinas A, B y D son proteínas pequeñas básicas con una región hidrofóbica comparativamente larga (Jaynes., et al. 1987). Su actividad bactericida está ligada a su arquitectura molecular consistiendo en una corta región N-terminal y una larga hidrofóbica (Gururaj., 1995).

Cuando se comprobó que la actividad de las cecropinas se limitó a las células procarióticas (bacterias) y no tuvo efecto contra ningún organismo eucarionte, esta información insentivó a los investigadores a seguir con la experimentación, clonación e integración de las cecropinas dentro del genoma de plantas. (Jaynes, et al. 1987)

El principal rol de la estructura de la Cecropina, en relación a su actividad biológica, ha sido confirmada. La actividad antimicrobial de la Cecropina B contra bacterias patógenas del melocotón se demostró que es patogénica a concentraciones que no afectan a las células vegetales.

#### **Lisozima**

Las lisozimas son una de las mas grandes e importantes familias de enzimas que tienen actividad lítica específica contra dirigidas hacia las paredes celulares de la bacteria (Düring, et al 1993). En varias especies de plantas se han detectado enzimas con actividad tipo Lisozima localizadas en vacuolas o asociadas a paredes celulares (Audy., et al. 1988, mencionado por Düring, 1993).

La Lisozima inicialmente fue purificada a partir de la hemolinfa inmune de *Hyalophora cecropia* e identificada como un tipo de Lisozima parecida a la que se encuentra en la clara de huevo de pollo (Jaynes, et al. 1993). Las Lisozimas están estrechamente relacionadas con el tipo-c de Lisozimas de vertebrados, el efecto que estas moléculas ocasionan son nuevos y fueron primero descritos en insectos (Hultmark, et al. 1993).

La Lisozima tiene un amplio espectro de acción, son efectivas contra diferentes tipos de bacterias incluyendo *Erwinia* y *Pseudomonas*. La probabilidad que una bacteria patógena sea naturalmente resistente a todas estas proteínas antibacterianas es extremadamente remota.

Está claro que ellas son solamente efectivas contra bacterias y no afectan a células de plantas superiores. La lisozima T4 del bacteriófago del mismo nombre es la enzima mas activa que se conoce contra bacterias gram positivas y gram negativas (Düring, et al. 1993).

## 2.6. MECANISMOS DE CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

El descubrimiento de la estructura del DNA (ácido desoxirribonucleico) por Watson y Crick en 1953 se inicia el campo del conocimiento biológico del desarrollo de la biología molecular. El DNA es el material genético de cualquier ser vivo y determina sus características fenotípicas; esta molécula almacena toda la información para que la célula sintetize todas sus proteínas.

La alteración del DNA de una célula, mediante técnicas de Ingeniería Molecular puede modificar en forma permanente la información contenida en estas moléculas, transfiriendo a las hijas dicha característica. La síntesis de proteínas a partir de la información presente en el DNA se realiza mediante dos mecanismos: 1) La transcripción, en la que se sintetiza una molécula de mRNA a partir de la información presente en el DNA. 2) La traducción, que es la que permite la síntesis de la proteína mediante la lectura del mRNA en los ribosomas.

Cuando la expresión de los genes es cuantitativamente aumentada, la regulación es positiva; en cambio si la expresión de los genes es disminuída, la regulación es negativa. Los elementos que median ambos tipos de regulación suelen ser productos difusibles (proteínas y mRNA), que reconocen secuencias específicas del DNA. También en algunos casos, las secuencias de nucleótidos en el DNA son capaces de modular por sí mismas la expresión de los genes.

El desarrollo de un organismo multicelular requiere de un mecanismo de control de la expresión genética de modo que las células diferenciadas realicen sus funciones de manera adecuada. Se han descrito diversas secuencias a las que se les han atribuido alguna función regulatoria en el control transcripcional ó control traduccional.

**A. Control transcripcional.** En las células eucarióticas varios sistemas genéticos y enzimáticos permiten la regulación de la transcripción de la información del DNA en copias de mRNA, entre los más relevantes están las secuencias de nucleótidos que posibilitan la transcripción en asociación con proteínas de la planta. También existen proteínas que frenan o que aumentan los niveles de transcripción dependiendo de los requerimientos de la célula en un momento.

**B. Control traduccional.** Los mRNA maduros se desplazan hacia el citoplasma atravesando la membrana nuclear, para ser posteriormente traducidos por los ribosomas. El mRNA en organismos eucariontes no posee la secuencia de unión a los ribosomas, a diferencia de los mRNA procariontes que poseen la secuencia Shine-Dalgarno, lo cual conduce a pensar que existen diferencias importantes respecto al mecanismo de unión del mRNA con los ribosomas y al inicio de la síntesis de proteínas (Balbas, P. y Bolivar, Z., 1989)

## 2.7. LOGROS

Dentro de los logros más importante alcanzados con el uso de la manipulación genética vegetal, se cuenta la obtención de plantas resistentes a enfermedades virales. Se ha logrado obtener plantas de tomate, tabaco, papa y alfalfa resistentes al virus TMV (Virus del mosaico del tabaco), AIMV (Virus del mosaico de la alfalfa), CMV (Virus del mosaico del pepino), PVX (Virus de la papa X), PVY (Virus de la papa Y).

Varios prototipos de cDNA han sido preparados y están siendo insertados en *Agrobacterium*. Estos incluyen prototipos para la producción de la proteína tóxica del *Bacillus thuringiensis*, la producción de quitinasa para resistencia a insectos, y la producción de la familia de las cecropinas para resistencia a las bacterias (CIP 1988).

Progresos recientes en técnicas de transformación de plantas podrían facilitar la expresión de péptidos antimicrobiales incrementando el mecanismo de resistencia en plantas. Sin embargo, en la actualidad se considera que una de las etapas limitantes es la disponibilidad de las construcciones génicas adecuadas y los ensayos de campo necesarios para corroborar que las plantas transgénicas mantienen en el campo sus características agronómicas que la hacen productiva. Esta etapa es necesaria para cumplir con los requisitos que permitan la certificación y comercialización de estos productos, lo cual se prevee para los próximos años.

De una población de 57 líneas transgénicas en cultivo de tejidos, se observó que sólo cuatro de ellas mantenían las principales características agronómicas y de calidad del material progenitor (Belknap, et al. 1994 ).

La introducción de un nuevo gen de resistencia dentro de la papa por tecnología de genes conduce a una reducción de la susceptibilidad de las plantas transgénicas a la infección de *Erwinia carotovora atroseptica* (Düring et al., 1993 ).

Carmona et al (1993), mencionado por Gururaj (1995), reportó sobre el refuerzo de la resistencia a bacterias patógenas en tabaco transgénico.

Jaynes, et al. (1993) mencionado por Gururaj, (1995). expresaron el péptido Cecropina B modificado Shiva-1, en tabaco, reportaron la importante resistencia de las plantas transgénicas a *Pseudomonas solanacearum*.

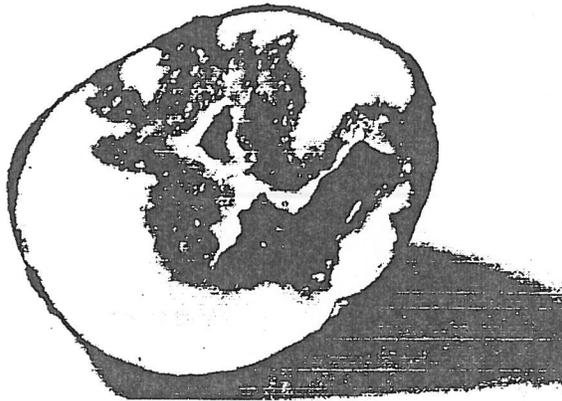


Figura 1. Pudrición bacteriana blanda, *E. carotovora*  
infección del tubérculo

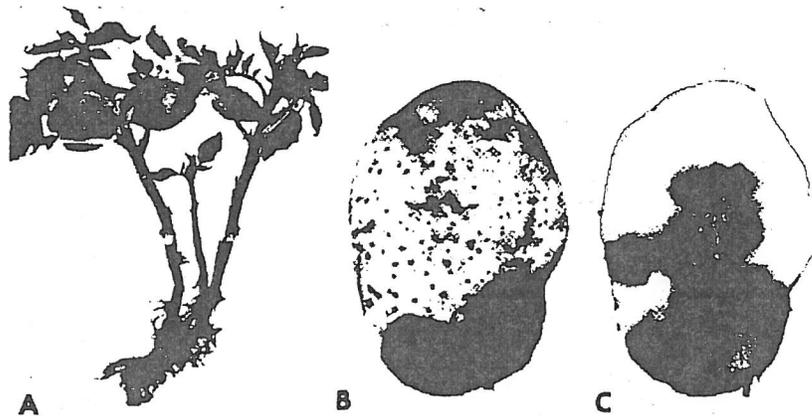


Figura 2. Pierna negra causada por *Erwinia carotovora* var.  
*atroseptica*. (A) infección que proviene de la porción de  
semilla deteriorada y progresa hacia el tallo. (B, C)  
infección que proviene de la planta enferma y progresa  
hacia el tubérculo a través del estolón

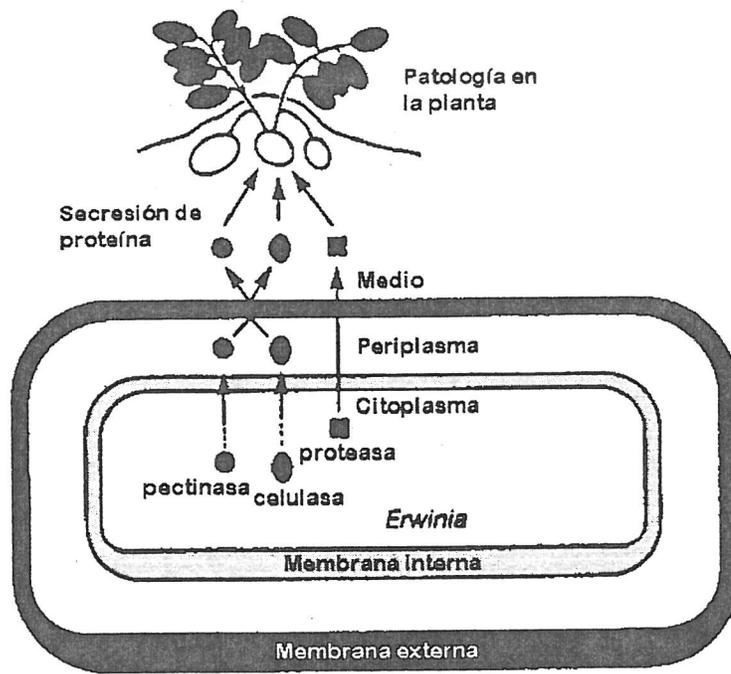


Figura 3. Representación esquemática de factores importantes en la fitopatogenicidad de *Erwinia*

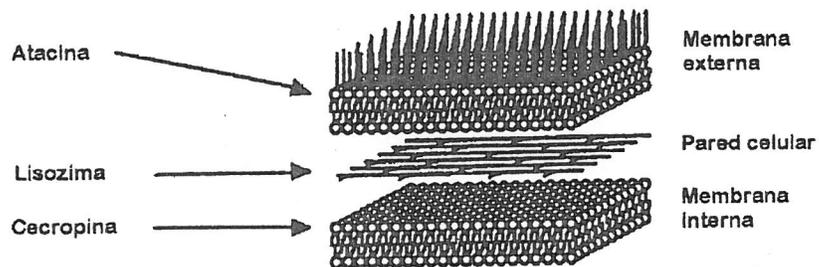


Figura 4. Blanco de las las principales familias de proteínas bactericidas inducidas en la cubierta bacteriana.

### III. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Agropecuaria en la Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Chile. La siembra e inoculación se realizó el 29 de abril de 1996 y el experimento finalizó el 24 de agosto del mismo año. El material vegetal a evaluar fueron minitubérculos (posteriormente serán llamados tubérculos) de cada línea transgénica y dos testigos Desirée sin transformar: con (+) y sin (-) inoculación.

#### MATERIALES

Tubérculos pre-brotados provenientes de líneas transgénicas.

Cultivo de *Erwinia carotovora spp atroseptica* (E.c.a.) Cepa T.

Suelo, proveniente de la X Región.

Arena de lepanto.

#### METODOLOGÍA

##### 3.1. Procedencia y mantenimiento de la cepa de *Erwinia carotovora atroseptica*

Se utilizó el aislamiento de la Cepa T de *E.c.a.* obtenido de un tubérculo de papa infectado, con síntomas de pudrición blanda X Región. Las colonias se seleccionaron por su capacidad en formar hoyos profundos en placas conteniendo el medio selectivo Cristal Violeta Polipeptato, a 23°C.

### 3.2. Construcciones genéticas.

Se contó con las construcciones genéticas proporcionadas por el Centro Internacional de la papa (CIP). Estas construcciones contienen los cDNAs que codifican las proteínas cecropina (3 genes), atacinas (2 genes) y lisozimas (3 variantes alélicas), aislados de pupa del gusano de seda gigante (*Hyalophora cecropia*). Estas proteínas han sido purificadas de Hemolinfa de *H. Cecropia*. y ensayadas *in vitro* confirmándose que si presentan actividad antibacteriana. (Jaynes et al., 1987; Destéfano-Beltrán et al., 1990). Tres construcciones, las cuáles unicamente se diferenciaban por el gen que codifica la proteína bactericida (Atacina, Cecropina ó Lisozima) fueron utilizadas en la transformación de papa *Solanum tuberosum var Desirée*, el promotor que regula la expresión genética (CaMV 35S) fué igual para todas, Los genes marcadores NPT II y GUS contienen los mismos promotores y terminadores en las diferentes construcciones (figura 5).

### 3.2. Procedencia de los tubérculos transgénicos.

Los tubérculos transgénicos de papa provinieron de plantas transgénicas obtenidas de cultivo *in vitro*, seleccionadas de acuerdo a criterios bioquímicos e inmunoquímicos que confirman la presencia y expresión del gen introducido. Posteriormente, estas plantas, fueron transferidas a suelo hasta la obtención de tubérculos los cuales fueron mantenidos en refrigeración (3°C) hasta el momento de la siembra e inoculación.

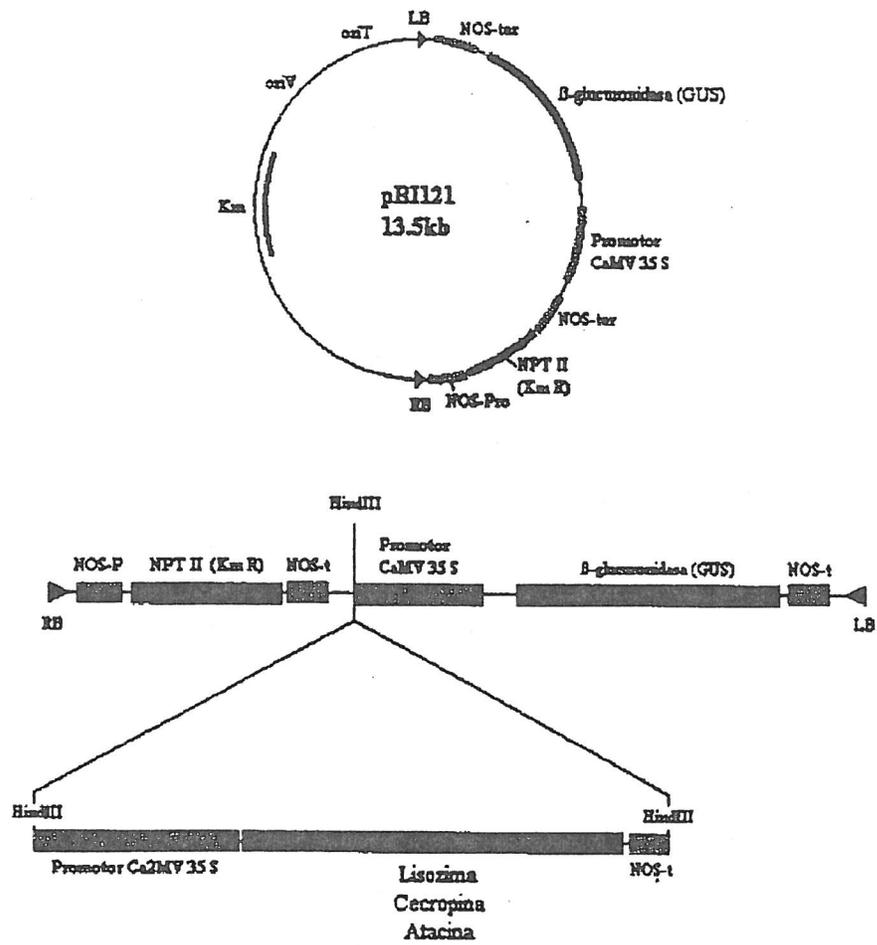


Figura 5. Construcción de T-DNA que contiene los genes de Atacina, Cecropina y Lisozima, con sus respectivo promotor CaMV 35S y terminador NOS.

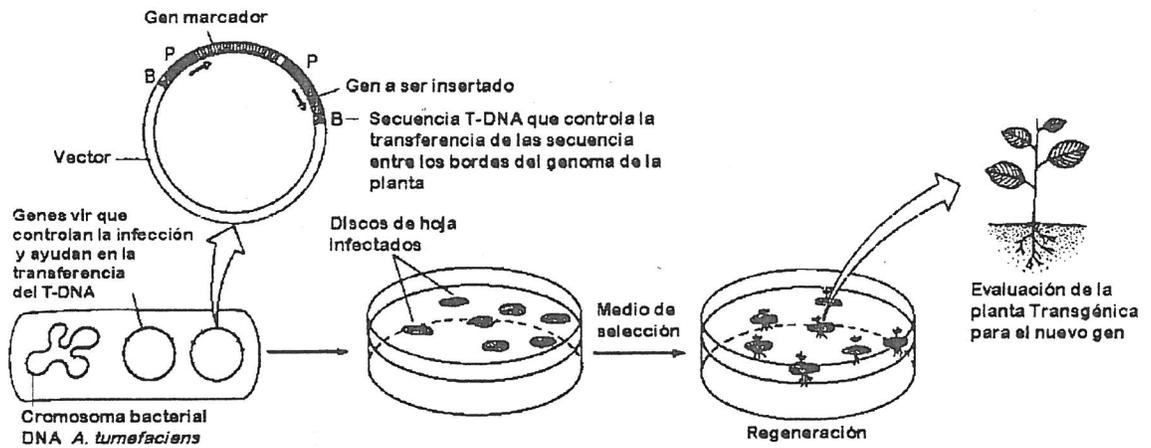


Figura 6. Transformación y regeneración de plantas a partir de discos de hojas conteniendo el gen foráneo transferido dentro de los bordes del T-DNA del vector.

### 3.4. Tratamiento a los tubérculos

Aquellos tubérculos que no presentaron brotación fueron sumergidos durante 2 horas en una solución de GA<sub>3</sub> a una concentración de 10 mg/lt, para romper la dormancia de las yemas. La desinfección de los tubérculos se realizó aplicando Captan en polvo, en forma homogénea para prevenir el desarrollo de enfermedades fungosas. Se evaluaron 132 líneas transgénicas que expresaban los genes de Atacina(36), Cecropina(27) ó Lisozima(69). Para cada líneas transgénica se leyeron 6 hemitubérculos con un total de 792 observaciones en cada lectura.

### 3.5. Método de inoculación

#### Preparación del Inóculo

La bacteria fue crecida en 20 ml de medio de enriquecimiento (anexo 1), incubándose por 24 horas a 23°C y posteriormente se lavó dos veces seguido de centrifugación y resuspensión en agua destilada estéril. Se determinó la concentración bacteriana midiendo la absorbancia de una suspensión a 600 nm en un espectofotómetro Shimatzu UV-240 Graphicord. La absorbancia 0,1 correspondió a una concentración de  $10^7$  u.f.c./ml a partir de la cual se efectuaron diluciones de 10 hasta obtener  $10^5$  ufc/ml. La nueva suspensión se mantuvo homogénea con ayuda de un agitador magnético.

#### Inoculación

El método utilizado fué el reportado por Düring, et al (1993), y consistió en cortar los tubérculos en 2 mitades las que se sumergieron en 20 ml de suspensión de bacteria a una concentración de  $10^5$  ufc/cc,

por 2 horas. Se montaron 6 repeticiones de medio tubérculo por cada línea.

### **Siembra**

Cada hemitubérculo se sembró por separado en un vaso de plástico transparente, teniendo cuidado de poner la superficie cortada en el fondo del vaso para observar el desarrollo de la sintomatología en la zona de corte. Luego, se cubrió cada hemitubérculo con sustrato (suelo-arena 1:1) previamente esterilizada en autoclave (121°C y 15 lb de presión). Los hemitubérculos inoculados y sembrados fueron crecidos en cámara de crecimiento en la Unidad de Biotecnología de la P.U.C, durante 6 semanas.

### **Riego**

Para asegurar la infección bacteriana se proporcionó alta humedad al sustrato (100%) y se cubrió por 7 días con bolsa plástica para provocar condiciones anaeróbicas. Aunque las especies de *Erwinia* son anaerobias facultativas, la multiplicación de estos organismos se ve considerablemente reducida en condiciones de aerobiosis. La película continua de agua sobre la superficie del tubérculo aumenta la turgidez en las células causando la ruptura de la capa suberizada y se consume el oxígeno en tan sólo 2.5 h a 22°C; la herida y la escasez de oxígeno facilitan la liberación de nutrientes de las células e inhiben los mecanismos fisiológicos de resistencia del tubérculo (Perombelón y Kelman, 1980). El primer riego se realizó durante la siembra utilizando agua destilada estéril, saturando el sustrato para darle condiciones de

anaeróbiosis, los riegos posteriores se realizaron con agua corriente sólo para mantener la humedad del suelo.

### 3.6. Método de Evaluación

Puesto que la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* permite la inserción de genes al azar en el genoma de la planta, fue necesario evaluar cada línea transgénica con las distintas construcciones genéticas. Los tubérculos evaluados para seleccionar aquellas líneas transgénicas de papa con resistencia al daño ocasionado por *E.c.a.* fueron evaluados con una escala operacional de evaluación para pudriciones blandas en la que se estimó el porcentaje de hemitubérculos enfermos y sanos (cuadro 4).

Cuadro 4. Escala de evaluación de resistencia a pudriciones blandas

Grado relativo	Nivel de resistencia	resistencia(%)
6	Muy resistente( MR )	100
5	Resistente( R )	83
4	Medianamente resistente( mR )	66
3	Resistencia intermedia( I )	50
2	Medianamente susceptible( mS )	33
1	Susceptible( S )	16
0	Muy susceptible( MS )	0

Se evaluó la sintomatología de daño cada 7 días y los parámetros considerados fueron: número promedio de hemitubérculo resistentes al daño(sin síntomas de pudrición blanda), expresados en porcentaje.

## V. RESULTADOS

### Análisis de Resistencia

El presente experimento se realizó con el propósito de estudiar la expresión de proteínas bactericidas en los tejidos de papas transgénicas que contienen los genes de Atacina, Cecropina ó Lisozima. La adecuada expresión de los genes en estudio en la planta y tubérculo podría reducir considerablemente los daños ocasionados por *Erwinia carotovora atroseptica*, organismo causal de pudrición blanda y pie negro en el cultivo de la papa.

Los genes de atacina, cecropina y lisozima están bajo el control del gen promotor del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV 35S) y el terminador del gen de la Nopalina sintetasa (NOS) de *Agrobacterium*. Además la construcción contiene un gen marcador NPT II que le confiere resistencia al antibiótico Kanamicina y el gen reportero GUS B-glucuronidasa el que permite demostrar la incorporación del gen mediante una reacción colorimétrica. *Agrobacterium tumefaciens* fue utilizado como vector para introducir información hacia *Solanum tuberosum* variedad *Desirée* mediante cocultivo de explantes de hojas y tallo utilizando la metodología de Horsch et al, (1985)

La regeneración de algunos explantes presentaron variación somaclonal (Dale and Mc Partlan., 1992). Aquellas líneas que presentaron esta variación no fueron consideradas para el análisis

de resistencia por perder características agronómicas de la variedad Desirée. Se utilizó como controles minitubérculos que contenían el T-DNA sin el gen que codifica para alguna de las proteínas bactericidas.

Para analizar la resistencia n el material transgénico, se utilizó la cepa T de *Erwinia carotovora spp atroséptica* obtenida de la estación experimental INIA-Remehue en Osorno, X Región.

Los anexos 2, 3 y 4 presentan la relación de líneas de papa transgénica portando el gen de Atacina, Cecropina ó Lisozima, luego de 6 semanas de evaluaciones. La respuesta de resistencia a la infección y el desarrollo de brotes sanos a partir de los tubérculos sanos e infectados, se expresa en porcentaje para cada una de las líneas.

En el anexo 2, se observa que el rango de respuesta de resistencia en las líneas transgénicas que expresan el gen de Atacina vario entre 0 - 100%. El 14 % de las líneas analizadas presentaron importantes niveles de resistencia a *Erwinia* en el ensayo en cámara de crecimiento. Se consideró como líneas muy promisorias y calificadas como muy resistente la 71/4/4 y como resistentes las 105/4/7, 105/9/1, BD473, BD631. Luego de 6 semanas de evaluación se pudo observar enraizamiento en aquellos tubérculos que no presentaban síntomas de la enfermedad.

En el anexo 3 se observa resultados para las líneas transgénicas que expresan el gen de Cecropina. Para este gen sólo el 11% de los tubérculos de papa presentaron alta resistencia a *Erwinia*. Hay que hacer notar, que sólo se evaluaron 27 líneas que portan este gen por lo que el porcentaje de plantas resistentes puede cambiar al analizar todas las plantas producidas. La línea B822Z se consideró como muy resistente y las líneas B878Z y B8D15 como resistentes.

El anexo 4 muestra el porcentaje de tubérculos y brotes sanos en líneas transgénicas de papa que portan el gen de Lisozima. Se encontró que el 9% de 69 líneas analizadas fue muy resistentes o resistentes a la infección por *Erwinia*. Muy resistente fue la línea 79/19/2 y resistentes las líneas 79/1/5, 79/10/3, 79/16/1 y B9D42.

La respuesta de resistencia de las líneas transgénicas que portan el gen de Lisozima varió entre 0 y 100% de resistencia en tubérculo, además se puede observar que el mismo rango se presentó para la presencia de brotes.

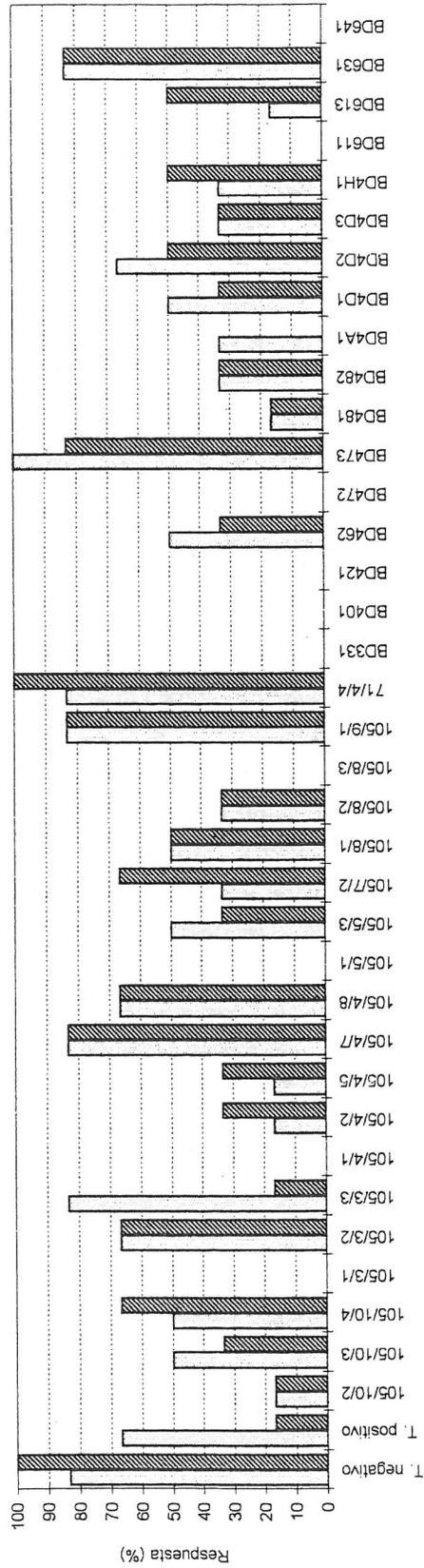
Los resultados de los anexos 2, 3 y 4, se han resumido en el anexo 5 en el cual se muestra el número y porcentaje de líneas transgénicas seleccionadas por su nivel de resistencia a la infección de *E.c.a.* Se observa que el 2,3% y 8,3 % de líneas presentaron los niveles de muy resistentes y resistentes, respectivamente.

Las figuras 7, 8 y 9 muestran el porcentaje de resistencia a la infección por *E.c.a.* en tubérculo sano y tubérculos brotados de las líneas transgénicas que portan el gen de Atacina, Cecropina ó Lisozima, respectivamente, comparadas con la respuesta de los testigos Desirée negativo y positivo.

La figura 7. muestra la distribución de las respuestas a las líneas de Atacina respecto a los testigos que no portaban el gen antibacteriano. Las figuras 8 y 9 respectivamente muestran las repuestas de resistencia y brotación, de las líneas de Cecropina y Lisozima.

El porcentaje de líneas transgénicas muy susceptibles a la infección por *E.c.a.* evaluadas por este método para los genes de Atacina, Cecropina y Lisozima fue de: 30.5%, 26.1%, y 22.5%, respectivamente. Sin embargo el porcentaje de líneas muy resistentes de Cecropina 3.7% seguida por Atacina con 2.77% y finalmente el de Lisozima con 1.45 %.

**Figura 7. Análisis de resistencia a E.c.a. en tubérculos transgénicos de *Solanum tuberosum* var. Désirée que expresan el gen de Atacina 6 semanas d.d.s.**



□ Tubérculos sanos    ▨ Tubérculos brotados

Líneas transgénicas y testigos

**Figura 8. Análisis de resistencia a E.c.a. en tubérculos transgénicos de Solanum tuberosum var. Desirée que expresan el gen de Cecropina, 6 semanas d.d.s.**

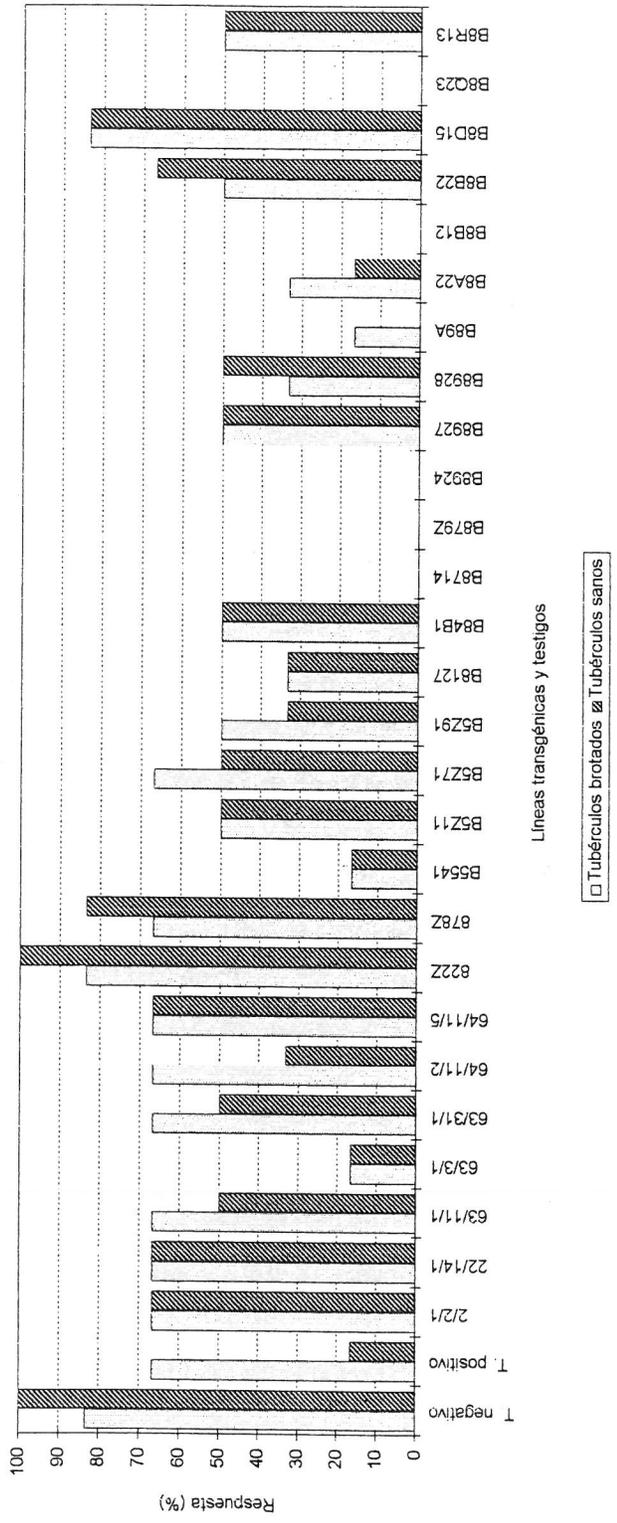
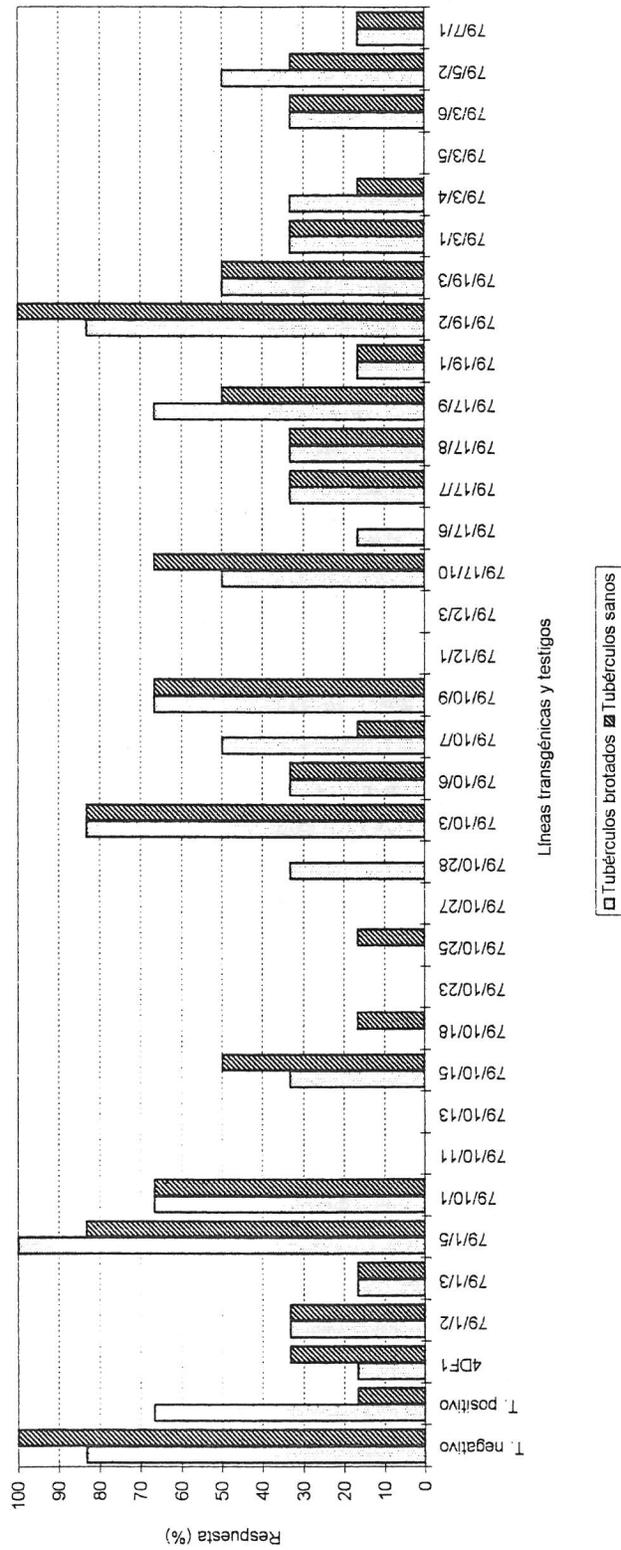
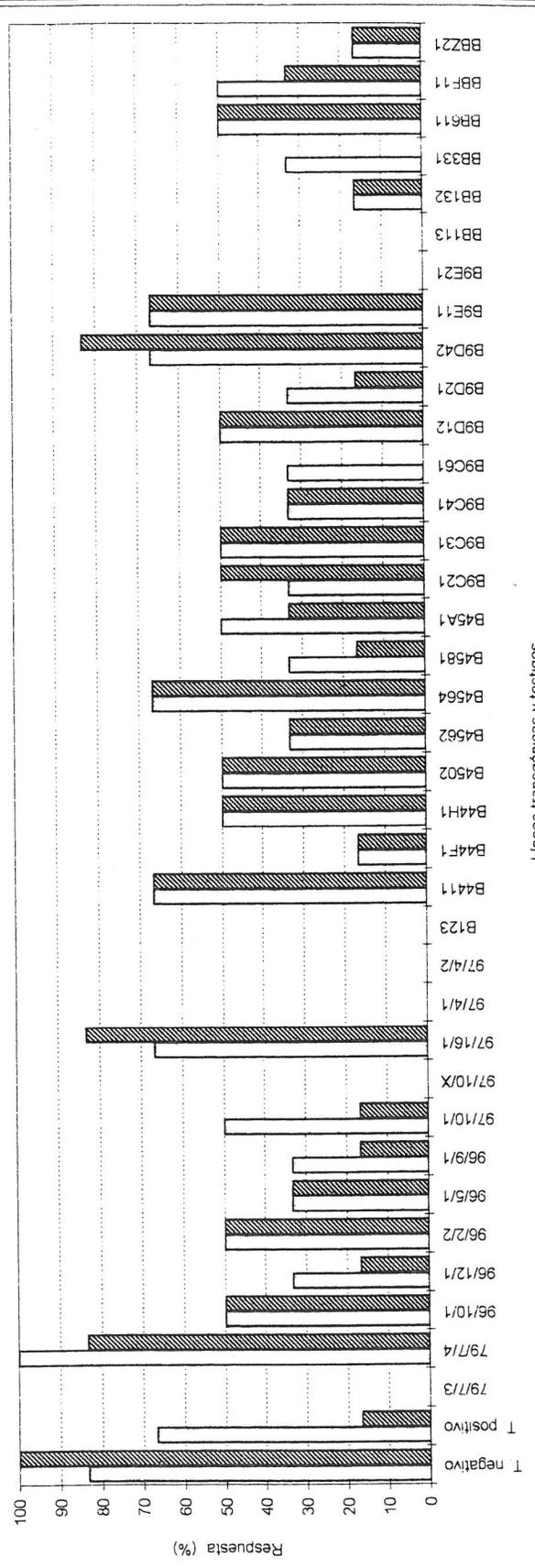


Figura 9. Análisis de resistencia a E.c.a. en tubérculos de papa transgénica *Solanum tuberosum* var. Desirée que expresan el gen de Lisozima, 6 semanas d.d.s.



Continuación...



□ Tubérculos sanos ▨ Tubérculos brotados

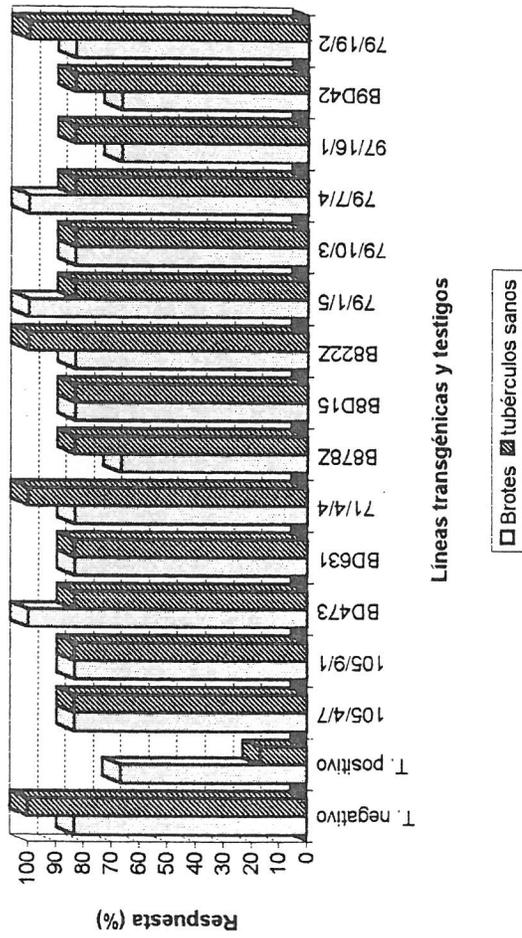
Líneas transgénicas y testigos

La figura 10. presenta la respuesta de los testigos Desirée positivo y negativo, con y sin inoculación respectivamente, comparados con la expresión de las líneas transgénicas de Atacina, Cecropina ó Lisozima que presentaron los grados mas altos de resistencia (5 y 6).

El porcentaje de tubérculos resistentes de las líneas transgénicas muy resistentes y resistentes estuvo más cercana al porcentaje de tubérculos resistentes del testigo Desirée negativo. Se observa una ventajosa respuesta del material transgénico frente a la expresión de resistencia del testigo Desirée positivo, inoculados con ***Erwinia carotovora atroseptica***.

La respuesta de las líneas transgénicas frente al testigo Desirée negativo es muy importante, considerándolas en este análisis de resistencia como líneas muy promisorias y se espera un comportamiento similar en los ensayos de campo. El análisis estadístico no fué significativo para la variable tubérculo sano, para los genes Atacina, Cecropina ó Lisozima (anexo 6).

**Figura 10. Líneas transgénicas de papa que expresan los genes de Atacina, Cecropina y Lisozima, con resistencia superior al testigo positivo .**



## V. DISCUSIÓN

Una de las metas de la biotecnología vegetal es desarrollar plantas cultivables con características superiores para resistir las enfermedades causadas por patógenos y de esta manera aumentar su productividad. La inserción de genes de Atacina, Cecropina y Lisozima, dentro de los tejidos de *Solanum tuberosum var. Desirée* para el manejo de la resistencia a enfermedades bacterianas en el cultivo, es aplicable si la expresión del gen se refleja en niveles suficientemente altos del péptido como para inhibir el crecimiento del patógeno en los tejidos donde este se distribuye.

En el presente experimento se evaluó la inserción genética de los materiales producidos en su resistencia a *Erwinia carotovora atroseptica*. La hipótesis que sustenta esta posible resistencia se basa en que la expresión de los genes antibacteriales deberían afectar el crecimiento bacteriano por distintos mecanismos.

De las 132 líneas transgénicas de papa transgénica analizadas se encontró variabilidad de respuestas a la infección por *E.c.a.*. Es importante mencionar la expresión de tres líneas transgénicas (una de cada gen) calificadas según la escala de evaluación como muy resistentes, expresando 100% de resistencia al daño y casi completa brotación de los tubérculos.

Se expresaron como muy susceptibles: 30% de las líneas de Atacina, 26% de las líneas de Lisozima y 23% de las líneas de Cecropina. El control sin transformar Desirée positivo expresó 30% de resistencia en tubérculo y 50% de brotes; al ser inoculados, con  $10^5$  ufc/ml de E.c.a., por el método de tubérculo fraccionado, descrito por Düring, et al. (1993).

Este método permitió encontrar claras diferencias de resistencia y habilidad para brotar desde tejidos de tubérculos inoculados en comparación con los controles. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Düring en 1993, quien estableció un ensayo similar con E.c.a. para evaluar resistencia en plantas transgénicas de papa que expresan el gen Lisozima T4.

Düring, et al. ( 1993 ), postuló que al introducir nuevos genes de resistencia dentro de la papa conduciría a reducir la susceptibilidad de las plantas transgénicas contra la infección del patógeno. Utilizando la misma concentración del inóculo (que la utilizada en el presente experimento), observó una reducción significativa de los tejidos macerados en discos de tubérculos y habilidad para brotar. Los materiales transgénicos expresaron 95% de resistencia, sin embargo otro grupo expresó 40 % de resistencia, siendo menos eficientes, el tratamiento control presentó 25% de resistencia; con lo cual concluyeron que esta variación probablemente se debe a efectos de posición del gen en el genoma de la planta.

Sin embargo Florack, et al. (1995), al analizar plantas de tabaco transgénico que expresan el gen de Cecropina-B para resistencia a *Pseudomonas solanacearum*, observó que no hubo diferencia al comparar las respuestas del material transgénico con los controles con lo cual concluyen que estos resultados probablemente se debe a una ineficiente traducción del respectivo mensajero, ó que el péptido fue degradado por proteasas endógenas de la planta y por lo tanto no pudo realizar su función.

Las proteínas tipo atacinas, desarrollan importantes y variados efectos moleculares en bacterias. Estudios determinaron que estas proteínas afectan la división celular de *Escherichia coli* y algunas otras bacterias gram negativas. Su mecanismo de acción consiste en bloquear la síntesis de la mas importante proteína de la membrana externa en *E. coli* conduciendo a la destrucción de la integridad de la membrana externa. (Florack., 1995).

Respecto al gen de Cecropina, se ha determinado *in vitro* que todas las cecropinas muestran actividad contra varias bacterias gram positivas y gram negativas, ellas presentan una configuración adaptadas para interactuar con las membranas de las bacteria. Probablemente las proteínas de Cecropina destinadas a la secreción, están constituidas por un amino terminal (N-terminal) que actua como péptido señal, la cual es removida por una peptidasa durante o poco después del ingreso de la proteína al interior del retículo endoplasmático.

La Cecropina B proveniente de *H. cecropia* presenta una alta toxicidad para bacterias patógenas de plantas. Estas secuencias que codifican para Cecropina B, desempeñan un importante papel en el manejo de resistencia a enfermedades bacterianas en los cultivos.

Un pre-requisito para el manejo de resistencia a enfermedades bacterianas dentro de los cultivos utilizando genes de Cecropina B es la expresión del gen y la síntesis del péptido a nivel suficiente para matar al patógeno (Florack et al. 1995); (Montanelli y Nascari 1991, citado por Gururaj, 1995). Se ha reportado un estudio en plantas de tabaco transgénico que expresan Shiva-1, (una Cecropina con 46% de homología en su secuencia a la molécula natural), que presenta resistencia a la bacteria patógena *P. solanacearum*. Sin embargo, plantas que expresaron SB-37, un análogo con 95% de homología en la secuencia de Cecropinas B natural, no fue resistente (Florack., 1995 ), lo cual conduce a pensar que el grado de homología a la molécula natural no es una característica que determina la expresión de resistencia.

Como la inserción de los genes en el genoma de la planta, utilizando como vector *A. tumefaciens*, se realiza al azar, es necesaria una evaluación de los materiales transgénicos para obtener datos respecto a la expresión de los genes introducidos, los cuales se pueden localizar en cualquier parte del genoma de la célula vegetal y la expresión puede estar dada por la ubicación del gen dentro del genoma de la planta y el número de copias insertadas.

Balbas y Bolivar( 1989 ), mencionan que la expresión insuficiente de los genes introducidos probablemente se debe a deficiencias en la codificación de cDNA así como en la traducción del respectivo mRNA.

El protocolo utilizado para la transformación y regeneración de los explantes fue de discos de hoja y entrenudo de tallo reportado por Horsch, et al. (1985). El promotor para la expresión del gen fue del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV 35S ). Se supone que con este promotor se obtienen altos niveles de expresión. Se ha llegado a determinar valores de hasta el 0.1% de la proteína soluble total, para NPT II ó GUS. No se dispone aún de información sobre el nivel de expresión de los péptidos en las plantas analizadas; sin embargo en algunas líneas al parecer se tiene niveles de expresión adecuados, los que se traducen en resistencia a *Erwinia*.

Düring., (1993), al integrar la lisozima (T4) en los tejidos de papa usando una construcción con el promotor CaMV 35S, (que permite un nivel de expresión del orden de 0.1% de proteína soluble total para los genes reporteros NPT o GUS), obtuvo en las plantas transgénicas un nivel de expresión cercano al 0.001 % de proteína soluble total. Este bajo nivel de expresión puede deberse a una ineficiente transcripción del gen, así como a una deficiente traducción del correspondiente mRNA. Aunque los niveles de proteína foránea fueron bajos, se obtuvo una significativa resistencia a bacteria bajo alta presión de selección .

Dale, et al. ( 1992 ) reportaron que las plantas transgénicas que pasan por una fase de cultivo de tejidos da como resultado variación somaclonal en algunas de las plantas regeneradas. Según Stiekema, et al. ( 1988 ), al parecer la papa es más susceptible a variación somaclonal que otras especies. En el presente analisis de resistencia el material transgénico que presentó variación somaclonal no fue considerado.

Una efectiva transformación fue mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, tomando como referencia el aspecto normal de las plantas evaluadas y la generación de resistencia al patógeno. Estos resultados coinciden con los reportes de Stiekema, et al. (1988 ) utilizando *A. tumefaciens* como vector para la transformación del cultivo de papa. Ellos reportaron una eficiente transformación y observaron en el cultivo características indistinguibles de los cultivares padres. En el presente experimento el testigo Desiree positivo expresó 70% de daño al ser inoculado con *E.c.a.*, con lo cual se comprueba alta susceptibilidad de esta variedad frente a las infecciones bacterianas.

Bourne, et al. (1981), reportaron que la susceptibilidad de la variedad Desiree a las infecciones bacterianas, probablemente se debe a la lenta cicatrización de sus heridas, la cual la predispone también para el ataque de otros patógenos. Según Pérombelon & Kelman (1980), la variación de la respuesta a heridas entre cultivares, se cree que afecta la susceptibilidad a la infección.

La condición de alta humedad en el sustrato, herida fresca en el tubérculo, temperatura de 22 mas menos 2°C, favorecieron la infección del patógeno, confirmando lo mencionado por Bain y Pérombelon. 1988. Estos autores reportaron que la pudrición blanda de tubérculos en almacén es mayor cuando el contenido de oxígeno es reducido. Lyon en 1989, concluyó que la suberización de las heridas producidas por daños físicos se desarrolla después de 96 horas de producida la herida. Agrios en 1986, reportó que las bacterias en condiciones ambientales favorables se dividen cada 20 minutos. Cuozzo- Davis et al. 1990, en sus experimentos observaron que la papa responde al stress por heridas activando mecanismos de defensa contra bacterias los cuales pueden ser interrumpidos por falta de oxígeno.

Como este experimento se desarrolló inicialmente en condiciones aneróbicas para favorecer la infección por *Erwinia*, el hecho de haber encontrado resistencia en alguna de estas líneas transgénicas seguramente está correlacionado con el nivel de expresión del péptido, lo que no depende de la concentración de oxígeno del medio.

De Lindo y French. 1979, reportaron que condiciones anaeróbicas resultantes de una mala aireación, inundación del suelo, temperaturas entre 21 a 23°C favorecen el desarrollo de la enfermedad. Los reportes anteriormente mencionados confirman que los factores ambientales que prevalecieron durante el experimento favorecieron la actividad del patógeno y la susceptibilidad del tubérculo.

El número mínimo de bacterias necesarias para iniciar la infección en los tubérculos depende de la susceptibilidad de los cultivares de papa. Deboer y Kelman, (1978), reportaron que deben existir al menos  $10^2$  bacterias por herida para iniciar la pudrición en condiciones de anaerobiosis; en cambio en aerobiosis, se necesitan al menos  $10^6 - 10^7$  microorganismos por herida.

Se observó en el presente experimento que los brotes emergidos procedían mayormente de aquellos tubérculos sin síntomas de daño. Sin embargo, hubo brotación en tubérculos totalmente infectados con *E.c.a.*, mostrando síntomas de pie negro, los cuales morían de acuerdo con el avance de la infección. Lyon. (1989), reporta que la diferencia que existe en la susceptibilidad a pie negro en tallos causados por *E.c.a.* se debe a mecanismos de control de la resistencia asociados con factores bioquímicos y anatómicos de los tallos. En este experimento se evaluó una sólo variedad cuyas plantas transgénicas se generaron *in vitro* a partir de una sola célula.

Sin embargo las diferencias en resistencia o susceptibilidad encontrada al daño por *Erwinia* no se puede asociar a características anatómicas, debido a que la expresión de los péptidos en la célula vegetal gatillan cambios bioquímicos asociados a la pared y membrana de la bacteria que finalmente se traducen en resistencia a bacterias.

Los resultados de la inoculación permitieron seleccionar los materiales que expresaron resistencia al patógeno. La resistencia se basa en un mecanismo bioquímico, por lo que se pueden encontrar plantas que expresen mayor o menor cantidad de péptidos en estudio. Düring, et al. (1993), observó resistencia de plantas de papa transgénica contra *E. carotovora* a bajos niveles de expresión del péptido, en condiciones naturales. Reporta además que esta investigación puede ser fácilmente transferida a otros daños causados por bacteria porque la interacción bioquímica es de naturaleza no específica.

Respecto al número de materiales transgénico evaluados, Belknap, (1994), sugiere que estos experimentos deben iniciarse con un gran número de clones transgénicos debido a que la probabilidad de encontrar material transgénico con las características deseadas, es relativamente baja. En este trabajo se evaluó 132 líneas diferentes de papa transgénica y sólo el 2.3% de ellas presentó niveles de resistencia muy altos lo que está de acuerdo a lo enunciado por Belknap.

No obstante, por la facilidad de propagación que presenta la papa, fácilmente se podrían producir las cantidades de tubérculos o plantas necesarias para utilizarse en forma comercial si se comprueba en ensayos de campo esta alta resistencia, corresponde esperar la evaluación en terreno de estos materiales para continuar con la selección de líneas que nos permitan disminuir o corregir las importantes pérdidas, por bacterias, que experimenta la papa en almacenaje.

## VI. CONCLUSIONES

1. La secreción de péptidos bactericidas foráneos en los espacios intercelulares de papa transgénica var. Desirée se tradujo en resistencia contra la infección de *Erwinia carotovora atroseptica*, reduciendo en algunas líneas evaluadas el daño por esta bacteria.
2. Las líneas transgénicas calificadas como muy resistentes (100% tubérculos sanos). Estas líneas corresponden a: 71/4/4 (Atacina), B822Z (Cecropina) y 79/19/2 (Lisozima) y cuya respuesta de brotación fue de 83%.
3. Entre las líneas transgénicas resistentes (83 % de tubérculos sanos), figuran las Atacinas : 105/4/7, 105/9/1, BD473, BD631; Cecropina: B878Z, B8D15, Lisozima: 79/1/5, 79/10/3, 79/7/4, 97/16/1 y B9D42.
4. Se estima que los genes de Atacina, Cecropina y Lisozima estuvieron presentes y a la vez fueron eficientes en su traducción del mRNA, en los ribosomas, para la producción de péptido.
5. La característica de brotación por si sola no es un buen parámetro para evaluar resistencia.

## VII. REFERENCIAS

- Acuña, I., Riffo, P. 1991. Prospección de Pie Negro y Pótenzial De Infección Latente (*Erwinia spp*) En Semilleros de Papa En Certificación De Las Categorías Básica y Prebásica En La Décima Región de Chile. Segundo Congreso Nacional de Fitopatología. Valdivia, Chile 70p.
- Agrios, G.N. 1986. Fitopatología. Editorial Limusa. Distrito Federal, México 756p.
- Bain, R.A.; Pérombelon, M.C.M.; Tsrer, L. and Nachmias, A. 1990. Blackleg development and tuber yield in relation to numbers of *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* on Seed potatoes. Plant Pathology 39, 125-133.
- Bain, R.A. and Pérombelon, M.C.M. 1988. Methods of testing potato cultivars for resistance to soft rot of tubers caused by *Erwinia carotovora Subsp.atroseptica*. Plant Pathology 37, 431-437.
- Balbás, P. y Bolívar, Z.F. 1989. Ingeniería Genética y Biotecnología. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional del Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D.C. 86p.
- Belknap, W.R.; Corsini, D.; Pavék, J.J.; Snyder, G.W.; Rockhold, D.R. and Vayda, M.E. 1994. Field Performance of Transgenic Russet Burbank and Lemhi Russet Potatoes. American Potato Journal vol(71)285-296.

- Bisht, V.S.; Bains, P.S. and Letal, J.R. 1993. Efficient Method To Assess Susceptibility of Potato To Steam Rot By *Erwinia carotovora* Subspecies. American Potato Journal vol. 70 611-616.
- Bourne, W.F.; D.C. McCalmont and Wastie, R.L. 1981. Assessing potato tubers for susceptibility to bacterial Soft rot (*Erwinia carotovora subsp. atroseptica*). Potato Research 24: 409-415.
- Centro Internacional de la Papa. 1988. Informe Anual. Lima, Perú 226p.
- Centro Internacional de la Papa. 1983. Manual de Plagas y Enfermedades de la Papa. Lima, Perú 93p.
- Ciampi, L & Passalacqua, P.K. 1983. Bacterias del género *Erwinia* (grupo Carotovora) aisladas de plantas y tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*). Fyton 43:221-226.
- Collmer, A. & Keen, N.T. 1986. The Role of Pectic Enzymes in Plant Pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathology 24:383-409.
- Cuozzo-Davis, M.; Butler, W. & Vayda, M.E. 1990. Molecular responses to environmental stresses and their relationship to soft rot En: The Molecular and Cellular Biology of Potato. Ed.: Vayda, M.E. & Park, W.D. pp. 71-87.
- Dale, P.J. and McPartlan, H.C. 1992. Field performance of transgenic potato plants compared with controls regenerated from tuber discs and shoot cuttings. Theor. Appl. Genet. 84:585-591.
- DeBoer, S.H. & Kelman, A. 1978. Influence of oxygen concentration and storage factors on the susceptibility of potato tubers to Soft Rot. Potato Research 21:65-80.

- Düring, K.; Porsch, P.; Fladung, M.; Lorz, H. 1993. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *The Plant Journal* 3(4), 587-589.
- Elphinstone, J.G. and Pérombelon, M.C.M. 1986. Contaminación of potatoes by *Erwinia carotovora* during grading 35, 25-33.
- Fainguebaum, M.H. 1988. Producción de Cultivos en Chile Cereales-Leguminosas e Industriales. Publicitaria Torrelodores Ltda. Santiago. 132p.
- Florack, D.; Allefs, S.; Bollen, R. ; Bosch, D.B. and Stiekema, W. 1995. Expresión of giant silkmoth cecropin-B genes in tobacco. *Transgenic Research* 4,132-141.
- French, E.R. & De Lindo, L. 1979. The Erwinias Of Potatoes In Perú. International Potato Center. Report of a Planning Conference. Lima, Perú. 88-93.
- Gururaj, R.A. 1995. Antimicrobial Peptides. The American Phytopathological Society. MPMI Vol.8, No1,6-13.
- Hooker, W.J. 1980. Compendium of Potato Diseases. The American Phytopathological Society Press. First Edition. pp166.
- Horsch, R.B.; Fry, J.E.; Hoffman, N.L.; Eichholtz, D.; Rogers, S.C.; Fraley, R.T. (1985) *Science* 227:1229-1231.
- Hultmark, D. 1993. Inmune Reaction in *Drosophila* and Other insects: a model for innate immunity. *Annu Reviews TIG* vol.9, No 5.178-183.
- Jaynes, J.M.; Kleanthis, G.X.; Destéfano-Beltrán, L. ; and Dodds, J.H. 1987. Increasing Bacterial Disease Resistance in Plants Utilizing Antibacterial Genes From Insects. *Bioessays* 6(6) 263-270.

- Jaynes, J.M.; Yang, M.S.; Espinoza, N. and Dodds, J.H. 1986. Plant Protein Improvement by Engineering: Use of Synthetic Genes. Tibtech, December 314-320.
- Kalazich, J.C. y Santos, J. 1990. Características generales del Cultivo de la Papa en Chile. Documento preparado para el Cuarto Curso Internacional Producción y Almacenamiento de Semilla de Papa. INIA/CIP/PNUP.
- Kojkowska, E. and Kelman, A. 1994. Comparison of the Effectiveness of Different Methods Of Screening For Bacterial Soft Rot Resistance of Potato Tubers. American Potato Journal Vol.71 99-113.
- Kuo-Ching Tzeng, Raymond G. McGuire, and Arthur Kelman. 1990. Resistance of Tuber From Different Potato Cultivars To Soft Rot Caused by *Erwinia carotovora* spp. *atroseptica*. American Potato Journal. vol 67 287-305.
- Lapwood, D.H.; Read, P.J. and Spokes, J. 1984. Methods for assesing the susceptibilitis of potato tubers of different cultivars to rotting by *Erwinia carotovora* Subspecies *atroséptica* and *carotovora*. Plant pathology 33, 13-20.
- Lapwood, D.H. and Read, P.J. 1985. A simplified slice method for assessing tuber susceptibility of potato cultivars to *Erwinia carotovora* subsp. *atroséptica*. Plant pathology 34, 284-286.
- Lyon, G.D. 1989. The biochemical basis of resistance of potatoes to soft rot *Erwinia* spp. Plant Pathology vol.38, 313-339.
- Pérombelon, M.C. & Kelman, A. 1980. Ecology of the Soft Rot *Erwinias*. Annu.Rev. Phytopathol. 18:361-387. CIP., 1979).

- Pérombelon, M.C.M. 1979. Ecology Of Soft-Rot *Erwinias* In Relation To Potatoes. Centro International Potato Center. Report of a Planning Conference. Lima-Perú 94-119
- Robert-Baudouy, J. 1991. Molecular biology of *Erwinia*: from soft-rot to antileukaemics. Reviews. Tibtech vol.9
- Shain-dow, K.; Wu, R. 1993. Transgenic plants. Engineering and Utilization. Academic Prees vol.1 265p.
- Venegas, A.; Santibañez, E.; Gómez, Y.; Urra, S.; Martínez, M.; Calderón, I.; Mora, G. 1993. Estudios biológicos y genéticos en Cepas de *Erwinia carotovora* para evaluar el uso de peptidos bactericidas como control biológico de este patógeno. 3er Congreso Latinoamericano y Nacional de Biotecnología. Santiago, Chile 129-137.
- Stiekema, W.J.; Heideckamp, F.; Louwerse, J.D.; Verhoeven, H.A. and 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.

VIII ANEXOS

**Anexo 1. Medio de enriquecimiento (medio mínimo)**

(para 1000 ml. de solución)

0.32 g de  $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 1.08 g de  $NH_4 SO_4$ 1.08 g de  $K_2HPO_4$ 

2.7g de polipeptato de sodio

Disolver cada sal antes de agregar polipeptato de sodio, disolver este ultimo en baño maria. Ajustar pH a 7.2 y esterilizar.

**Anexo 5.** Número y porcentaje de 132 líneas transgénicas de papa que expresan el gen de Atacina, Cecropina ó Lisozima seleccionadas por su nivel de resistencia a *E.c.a.*

Grado relativo	Nivel de resistencia	No de líneas	Porcentaje (%)
6	MR	3	2.3
5	R	11	8.3
4	mR	14	10.6
3	I	23	17.4
2	mS	25	18.9
1	S	21	15.9
0	MS	35	26.5
Total		132	100

Anexo 2. Porcentaje de tubérculos sanos y tubérculos brotados de 36 líneas transgénicas de papa que portan el gen de Atacina, inoculadas con *Erwinia carotovora* spp. atroseptica (\*).

Clave	línea	% tubérculos sano	% tubérculos brotados
A-1	105/10/2	17	17
A-2	105/10/3	33	50
A-3	105/10/4	67	50
A-4	105/3/1	0	0
A-5	105/3/2	67	67
A-6	105/3/3	17	83
A-7	105/4/1	0	0
A-8	105/4/2	33	17
A-9	105/4/5	33	17
A-10	105/4/7	83	83
A-11	105/4/8	67	67
A-12	105/5/1	0	0
A-13	105/5/3	33	50
A-14	105/7/2	67	33
A-15	105/8/1	50	50
A-16	105/8/2	33	33
A-17	105/8/3	0	0
A-18	105/9/1	83	83
A-19	71/4/4	100	83
A-20	BD331	0	0
A-21	BD401	0	0
A-22	BD421	0	0
A-23	BD462	33	50
A-24	BD472	0	0
A-25	BD473	83	100
A-26	BD481	17	17
A-27	BD482	33	33
A-28	BD4A1	0	33
A-29	BD4D1	33	50
A-30	BD4D2	50	67
A-31	BD4D3	33	33
A-32	BD4H1	50	33
A-33	BD611	0	0
A-34	BD613	50	17
A-35	BD631	83	83
A-36	BD641	0	0
Máximo		100	100
Mínimo		0	0
Promedio		34,7	36,1
Desv.est.		30,7	31,2

(\*) 6 semanas d.d.s.

Anexo 3. Porcentaje de tubérculos sanos y tubérculos brotados de 36 líneas transgénicas de papa que portan el gen de Cecropina, inoculadas con *Erwinia carotovora* spp. atroseptica (\*).

Clave	línea	% tubérculos sano	% tubérculos brotados
C-1	2/2/1	67	67
C-2	22/14/1	67	67
C-3	63/11/1	50	67
C-4	63/3/1	17	17
C-5	63/31/1	50	67
C-6	64/11/2	33	67
C-7	64/11/5	67	67
C-8	822Z	100	83
C-9	878Z	83	67
C-10	B5541	17	17
C-11	B5Z11	50	50
C-12	B5Z71	50	67
C-13	B5Z91	33	50
C-14	B8127	33	33
C-15	B84B1	50	50
C-16	B8714	0	0
C-17	B879Z	0	0
C-18	B8924	0	0
C-19	B8927	50	50
C-20	B8928	50	33
C-21	B89A	0	17
C-22	B8A22	17	33
C-23	B8B12	0	0
C-24	B8B22	67	50
C-25	B8D15	83	83
C-26	B8Q23	0	0
C-27	B8R13	50	50
Máximo		100	83
Mínimo		0	0
Promedio		40	43
Desv.est.		29	27

(\*) 6 semanas d.d.s.

Anexo 4. Porcentaje de tubérculos sanos y tubérculos brotados de 36 líneas transgénicas de papa que portan el gen de Lisozima, inoculadas con *Erwinia carotovora* spp. atroseptica (\*).

Clave	línea	% tubérculos sano	% tubérculos brotados
L-1	4DF1	33	17
L-2	79/1/2	33	33
L-3	79/1/3	17	17
L-4	79/1/5	83	100
L-5	79/10/1	67	67
L-6	79/10/11	0	0
L-7	79/10/13	0	0
L-8	79/10/15	50	33
L-9	79/10/18	17	0
L-10	79/10/23	0	0
L-11	79/10/25	17	0
L-12	79/10/27	0	0
L-13	79/10/28	0	33
L-14	79/10/3	83	83
L-15	79/10/6	33	33
L-16	79/10/7	17	50
L-17	79/10/9	67	67
L-18	79/12/1	0	0
L-19	79/12/3	0	0
L-20	79/17/10	67	50
L-21	79/17/6	0	17
L-22	79/17/7	33	33
L-23	79/17/8	33	33
L-24	79/17/9	50	67
L-25	79/19/1	17	17
L-26	79/19/2	100	83
L-27	79/19/3	50	50
L-28	79/3/1	33	33
L-29	79/3/4	17	33
L-30	79/3/5	0	0
L-31	79/3/6	33	33
L-32	79/5/2	33	50
L-33	79/7/1	17	17
L-34	79/7/3	0	0
L-35	79/7/4	83	100
L-36	96/10/1	50	50
L-37	96/12/1	17	33
L-38	96/2/2	50	50
L-39	96/5/1	33	33
L-40	96/9/1	17	33
L-41	97/10/1	17	50
L-42	97/10/X	0	0
L-43	97/16/1	83	67
L-44	97/4/1	0	0
L-45	97/4/2	0	0

... continuación

L-46	B123	0	0
L-47	B4411	67	67
L-48	B44F1	17	17
L-49	B44H1	50	50
L-50	B4502	50	50
L-51	B4562	33	33
L-52	B4564	67	67
L-53	B4581	17	33
L-54	B45A1	33	50
L-55	B9C21	50	33
L-56	B9C31	50	50
L-57	B9C41	33	33
L-58	B9C61	0	33
L-59	B9D12	50	50
L-60	B9D21	17	33
L-61	B9D42	83	67
L-62	B9E11	67	67
L-63	B9E21	0	0
L-64	BB113	0	0
L-65	BB132	17	17
L-66	BB331	0	33
L-67	BB611	50	50
L-68	BBF11	33	50
L-69	BBZ21	17	17
Máximo		100	100
Mínimo		0	0
Promedio		31	34
Desv.est.		27	26

(\*) 6 semanas d.d.s.

Anexo 6. Prueba de Chi-cuadrado Y Duncan para los genes de Atacina,  
Cecropina Y Lisozima.

Genes	No hemitub.	hemitub.sanos	hemitub.con daño	p.obs.	P.esp.	X obs.	Duncan
Atacina	216	75	141	0,34	0,12	0,40	A
Cecropina	162	65	97	0,40	0,13	0,56	A
Lisozima	414	129	285	0,31	0,10	0,44	A