

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS



“Análisis de los niveles de expresión de los genes *iaaH* y *C-prot* de *Agrobacterium* spp. encontrados en el genoma de *Ipomoea batatas* L. “camote” (cv. Jewel)”

Presentada por:

Bruno Lértora Briceño

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima-Perú

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Análisis de los niveles de expresión de los genes *iaaH* y *C-prot* de
Agrobacterium spp. encontrados en el genoma de *Ipomoea batatas*
L. “camote” (cv. Jewel)”**

Presentada por:

Bruno Lértora Briceño

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Mg. Sc. César López Bonilla
PRESIDENTE

Dr. Raúl Blas Sevillano
MIEMBRO

M. Sc. Katty Ogata Gutiérrez
MIEMBRO

Mg. Sc. Roberto Mansilla Samaniego
ASESOR

Ph.D. Jan Kreuze
CO – ASESOR

DEDICATORIA

A mis padres Hugo y Patricia, a mis hermanos y a Gisell por su incondicional apoyo, esfuerzo y comprensión durante todo este tiempo de aprendizaje que inició con mis estudios en la carrera de Biología.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Internacional de la Papa (CIP) por el financiamiento y apoyo brindado para la realización de la presente tesis.

Al Dr. Jan Kreuze, Jefe de Virología del Centro Internacional de la Papa (CIP) y asesor de la presente tesis, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo esta investigación.

Al Mg. Sc. Milton Untiveros y la Mg. Sc. Dora Quispe por su amistad, constante apoyo y por todas las sugerencias durante el desarrollo de mi investigación.

A todos mis amigos y personal del Laboratorio de Biotecnología Aplicada por permitirme trabajar en un ambiente agradable y lleno de familiaridad.

Al Mg. Sc. Roberto Mansilla por aceptar ser mi asesor universitario y haberme guiado en el desarrollo y sustentación de la presente investigación, así mismo a mi jurado calificador, el Mg. Sc. César López, la Blga. Katty Ogata y el Dr. Raúl Blas por sus consejos y recomendaciones para el desarrollo y redacción de la presente tesis.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
	1.1 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	2
	1.2 OBJETIVO GENERAL.....	2
	1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
II.	REVISION DE LITERATURA	3
	2.1 EL CAMOTE (<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam).....	3
	2.1.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN.....	4
	2.1.2 DESCRIPCIÓN Y CLASIFICACIÓN	4
	2.1.3 IMPORTANCIA DEL CULTIVO Y SU PRODUCCIÓN AGRÍCOLA	5
	2.2 TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES (THG).....	9
	2.2.1 THG EN BACTERIAS	9
	2.2.2 THG EN EUCARIOTAS.....	9
	a. THG en plantas.....	10
	2.2.3 TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES Y SU ROL EN LA EVOLUCIÓN	11
	2.3 <i>Agrobacterium</i> spp.....	12
	2.3.1 REGIÓN T-DNA	14
	2.3.2 MECANISMO DE INFECCIÓN DE <i>Agrobacterium</i>	15
	2.4 GEN <i>iaaH</i>	19
	2.4.1 PRESUNTAS RUTAS DE BIOSÍNTESIS DE AUXINAS (Mano <i>et al.</i> , 2009).....	20
	2.5 GEN <i>C-prot</i>	21
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
	3.1 MATERIALES.....	24
	3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO	24
	3.1.2 INICIADORES Y REACTIVOS	24
	3.1.3 PROGRAMAS INFORMÁTICOS	24
	3.2 MÉTODOS.....	25

3.2.1	DISEÑO DEL CAMPO DE SIEMBRA DE <i>I. batatas</i> (L.) cv. Jewel.....	25
3.2.2	SECUENCIAMIENTO DE LOS GENES <i>iaaH</i> Y <i>C-prot</i> EN <i>Ipomoea batatas</i> (L.) cv. Jewel MEDIANTE PCR.....	26
a.	Extracción de DNA genómico	26
b.	Ligación, clonación y secuenciación de fragmentos de PCR.....	27
c.	Análisis de restricción	29
d.	Secuenciamiento y ensamblaje de los fragmentos obtenidos.....	29
3.2.3	DISEÑO DE INICIADORES	30
3.2.4	EXTRACCIÓN DE RNA	30
3.2.5	TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE RNA CON DNAsa.....	30
3.2.6	SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)	31
3.2.7	ELECCIÓN DEL GEN DE REFERENCIA PARA RT-qPCR EN TIEMPO REAL	32
3.2.8	PCR CUANTITATIVO DE TRANSCRIPTASA REVERSA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR).....	32
3.2.9	CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS CON EL SOFTWARE REST 2009 (Pfaffl <i>et al.</i> , 2002).....	35
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
4.1	DISEÑO DEL CAMPO DE <i>Ipomoea batatas</i> (L.) cv. Jewel.....	37
4.2	SECUENCIAMIENTO DE LOS GENES <i>iaaH</i> Y <i>C-prot</i> EN <i>Ipomoea batatas</i> (L.) cv. Jewel MEDIANTE PCR	37
4.2.1	EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	37
4.2.2	LIGACIÓN, CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE FRAGMENTOS DE INTERÉS.....	38
4.2.3	ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN	39
4.2.4	SECUENCIACIÓN Y ENSAMBLAJE DE LOS FRAGMENTOS OBTENIDOS	40
4.3	DISEÑO DE INICIADORES	41
4.4	EXTRACCIÓN DE RNA	42

4.5	ELECCIÓN DEL GEN DE REFERENCIA PARA RT-qPCR EN TIEMPO REAL	42
4.6	PCR CUANTITATIVO DE TRANSCRIPTASA REVERSA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)	43
4.7	CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS CON EL SOFTWARE REST 2009 (Pfaffl <i>et al.</i> , 2002)	45
4.7.1	EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES <i>iaaH</i> Y <i>C-prot</i> EN DISTINTOS PUNTOS DE TIEMPO DURANTE EL DESARROLLO DE HOJAS EN COMPARACIÓN A LA PLANTA MADRE	45
4.7.2	EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES <i>iaaH</i> Y <i>C-prot</i> EN DISTINTOS PUNTOS DE TIEMPO DURANTE EL DESARROLLO DE ÁPICES EN COMPARACIÓN A LA PLANTA MADRE	50
4.7.3	EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES <i>iaaH</i> Y <i>C-prot</i> EN DISTINTOS PUNTOS DE TIEMPO DURANTE EL DESARROLLO DE RAÍCES EN COMPARACIÓN A LA PLANTA MADRE	54
4.7.4	EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES <i>iaaH</i> Y <i>C-prot</i> EN DISTINTOS PUNTOS DE TIEMPO DURANTE EL DESARROLLO DE RAÍCES TUBEROSAS EN COMPARACIÓN A LA PLANTA MADRE	58
4.7.5	REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA EXPRESIÓN RELATIVA POR TEJIDO DE LOS GENES <i>iaaH</i> Y <i>C-prot</i> DURANTE EL DESARROLLO DE LA PLANTA	61
V.	CONCLUSIONES	69
VI.	RECOMENDACIONES	70
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	71
VIII.	ANEXOS	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Genes de <i>Agrobacterium</i> spp. encontrados en <i>Ipomoea batatas</i>	1
Tabla 2.	Áreas cultivadas, producción y rendimiento de camote por continentes	5
Tabla 3.	Composición química del <i>Ipomoea batatas</i> (L.)	6
Tabla 4.	Características del cultivo <i>Ipomoea batatas</i> (L.).....	8
Tabla 5.	Mezcla inicial (ARN+iniciadores) para la síntesis de ADNc (Mezcla 1).....	31
Tabla 6.	Mezcla complementaria para la síntesis de ADNc (Mezcla 2)	32
Tabla 7.	Secuencia de iniciadores para la amplificación por RT-qPCR de los genes <i>iaaH</i> , <i>C-prot</i> y <i>COX</i>	33
Tabla 8.	Mezcla para el RT-qPCR	33
Tabla 9.	Programa de RT-qPCR para los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i>	33
Tabla 10.	Condiciones de PCR para la amplificación de las regiones génicas e intergénicas del T-DNA.....	38
Tabla 11.	Secuenciamiento de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> de <i>Ipomoea batatas</i> (L.) cv. Jewel.....	40
Tabla 12.	Diseño de iniciadores para RT-qPCR	41
Tabla 13.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 1 durante el desarrollo de HOJAS en comparación a la planta madre	45
Tabla 14.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 2 durante el desarrollo de HOJAS en comparación a la planta madre	46
Tabla 15.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 3 durante el desarrollo de HOJAS en comparación a la planta madre	47
Tabla 16.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 4 durante el desarrollo de HOJAS en comparación a la planta madre	47
Tabla 17.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 5 durante el desarrollo de HOJAS en comparación a la planta madre	48
Tabla 18.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 6 durante el desarrollo de HOJAS en comparación a la planta madre	48
Tabla 19.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 7	

	durante el desarrollo de HOJAS en comparación a la planta madre	49
Tabla 20.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 8 durante el desarrollo de HOJAS en comparación a la planta madre	49
Tabla 21.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 1 durante el desarrollo de APICES en comparación a la planta madre	50
Tabla 22.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 2 durante el desarrollo de APICES en comparación a la planta madre	50
Tabla 23.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 3 durante el desarrollo de APICES en comparación a la planta madre	51
Tabla 24.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 4 durante el desarrollo de APICES en comparación a la planta madre	51
Tabla 25.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 5 durante el desarrollo de APICES en comparación a la planta madre	52
Tabla 26.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 6 durante el desarrollo de APICES en comparación a la planta madre	52
Tabla 27.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 7 durante el desarrollo de APICES en comparación a la planta madre	53
Tabla 28.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 8 durante el desarrollo de APICES en comparación a la planta madre	53
Tabla 29.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 1 durante el desarrollo de RAICES en comparación a la planta madre	54
Tabla 30.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 2 durante el desarrollo de RAICES en comparación a la planta madre	55
Tabla 31.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 3 durante el desarrollo de RAICES en comparación a la planta madre	55
Tabla 32.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 4 durante el desarrollo de RAICES en comparación a la planta madre	56
Tabla 33.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 5 durante el desarrollo de RAICES en comparación a la planta madre	56
Tabla 34.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 6 durante el desarrollo de RAICES en comparación a la planta madre	57

Tabla 35.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 7 durante el desarrollo de RAICES en comparación a la planta madre	57
Tabla 36.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 4 durante el desarrollo de RAICES TUBEROSAS en comparación a la planta madre.....	58
Tabla 37.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 5 durante el desarrollo de RAICES TUBEROSAS en comparación a la planta madre.....	58
Tabla 38.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 6 durante el desarrollo de RAICES TUBEROSAS en comparación a la planta madre.....	59
Tabla 39.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 7 durante el desarrollo de RAICES TUBEROSAS en comparación a la planta madre.....	60
Tabla 40.	Expresión relativa de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en la toma 8 durante el desarrollo de RAICES TUBEROSAS en comparación a la planta madre.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam “camote” A) Raíces tuberosas, B) Planta de camote.....	4
Figura 2.	Producción anual de camote en el Perú.....	7
Figura 3.	Plantas infectadas con especies del género <i>Agrobacterium</i> : A) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y B) <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	14
Figura 4.	Estructura del plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
Figura 5.	Mecanismo de infección de <i>Agrobacterium</i> (Modificado de Tzfira y Citovsky, 2008)	16
Figura 6.	Presuntas rutas de la biosíntesis de IAA	21
Figura 7.	Algunos genes del plásmido Ti de <i>A. tumefaciens</i> C58	22
Figura 8.	Experimentos de co-infección en <i>K. tubiflora</i> con el pTiC58 mutante con delección de genes del fragmento b-e. Las fotos fueron tomadas 6 semanas después de la infección. 1) Control con el vector vacío, 2) Gen b, 3) Gen c, 4) Gen c’, 5) Gen d, 6) Gen e. Sólo el gen c y c’ restauraron la inducción del tallo.....	22
Figura 9.	Retraso del crecimiento y alteración en la morfología de flores y hojas en plantas transgénicas de <i>N. tabacum</i> con sobre-expresión del gen <i>C-prot</i> (<i>Atu6002</i>) comparadas con las de tipo silvestre (WT). (A) Vista general de la planta de 3 semanas de edad. (B) Vista general de la planta de 2 meses de edad. (C) Forma y tamaño de hojas a las 3 semanas de edad. (D) Raíces a las 3 semanas de edad. (E) Vista general de la flor a las 3 semanas de edad. (F-H) Morfología de la flor a los 2 meses de edad.....	23
Figura 10.	Diseño del campo de siembra de <i>I. batatas</i> (L.) cv. Jewel.....	25
Figura 11.	Esquema de la ligación mediante PCR en el plásmido pGem-T Easy (Promega)	28
Figura 12.	Gráfica de fluorescencia vs número de ciclo en RT-qPCR.....	34

Figura 13.	Curvas de melting en un gráfico de fluorescencia vs temperatura en RT-qPCR	35
Figura 14.	Campo de cultivo de <i>Ipomoea batatas</i> (L.) cv. Jewel en el CIP – Lima	37
Figura 15.	Calidad de DNA genómico de <i>I. batatas</i> cv. Jewel	38
Figura 16.	Gradiente de PCR para la amplificación del gen <i>C-prot</i>	39
Figura 17.	Análisis de restricción con <i>EcoRI</i> para plásmidos que contienen el gen <i>C-prot</i>	40
Figura 18.	Corrida electroforética de una gradiente de temperatura para las parejas de iniciadores <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i>	41
Figura 19.	Corrida electroforética de la tercera extracción de RNA donde A es ápice, R es raíz y H es hoja (cada una con tres repeticiones).....	42
Figura 20.	Corrida en gel de agarosa de los iniciadores del gen de referencia <i>COX</i>	43
Figura 21.	Curva de desnaturalización para los iniciadores que amplifican el gen <i>iaaH</i>	43
Figura 22.	Curva de desnaturalización para los iniciadores que amplifican el gen <i>C-prot</i>	44
Figura 23.	Curva de desnaturalización para los iniciadores que amplifican el gen de referencia <i>COX</i>	44
Figura 24.	Curva estándar de eficiencia de iniciadores para los genes <i>iaaH</i> (arriba) y <i>C-prot</i> (abajo)	45
Figura 25.	Expresiones relativas de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en hojas	62
Figura 26.	Expresiones relativas de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en ápices.....	63
Figura 27.	Expresiones relativas de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en raíz.....	64
Figura 28.	Expresiones relativas de los genes <i>iaaH</i> y <i>C-prot</i> en raíz tuberosa	65

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Reactivos para extracción de DNA	82
Anexo 2.	Formulaciones	83
Anexo 3.	Registro de trabajo en campo	84

ABREVIATURAS

C-prot: C-protein

iaaH: Indol-3-Acetoamida Hidrolasa

T-DNA: DNA de transferencia

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

RT-qPCR: PCR cuantitativo con transcriptasa inversa

ADNc: ADN complementario

THG: Transferencia horizontal de genes

Ti: Inductor de tumor

Ri: Inductor de raíz

IAA: ácido indol-3-acético

IAM: indol-3-acetamida

RESUMEN

El camote (*Ipomoea batatas* Lam) es actualmente el séptimo cultivo más importante en el mundo con más de 106 millones de toneladas anuales de producción. *Agrobacterium* es un género de bacterias que causan la formación de tumores en una gran variedad de plantas, incluyendo el camote, y estas infecciones son mediadas por plásmidos que llevan un fragmento de DNA denominado DNA de transferencia o “T-DNA”. Se han encontrado secuencias del T-DNA de *Agrobacterium* integradas naturalmente en el genoma del camote cultivado (Kyndt *et al.*, 2015) y resulta interesante un análisis de las expresiones de los genes encontrados. Con este objetivo, se cuantificó mediante RT-qPCR en tiempo real la expresión de los genes *iaaH* (Indol-3-Acetoamida Hidrolasa) y *C-prot* (C-protein) encontrados en *I. batatas* L. “camote” (cultivar Jewel) provenientes del T-DNA de *Agrobacterium* spp. Las expresiones relativas fueron analizadas en cuatro tejidos: ápice, hojas, raíces y raíces tuberosas durante el desarrollo de la planta (divididos en periodos del uno al ocho, con intervalos de tomas de muestra cada 15 días). Se observó que el gen *iaaH* tuvo una sobreexpresión con respecto al control en los tejidos de raíz y raíz reservante, en el tejido de hoja hubo mucha variación en la expresión y, en el tejido apical, una menor expresión durante toda la etapa de desarrollo. En el caso del gen *C-prot*, hubo una sobreexpresión con respecto al control en el tejido de hoja durante el crecimiento de la planta, en el tejido apical hubo un aumento de expresión durante el último mes de observación, mientras que en los tejidos de raíz y raíz reservante hubo una menor expresión durante toda la etapa de desarrollo de la planta.

Palabras claves: *Ipomoea batatas*, T-DNA, *Agrobacterium*, expresión relativa, gen *iaaH*, gen *C-prot*.

ABSTRACT

Sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam) currently ranks as the seventh most important crop in the world with more than 106 million tons in annual production. *Agrobacterium* is a genus of bacteria that can infect and cause the formation of tumors in a wide variety of plants, including sweet potato. These infections are mediated by plasmids that carry a DNA fragment called transfer DNA or “T-DNA”. Sequences of the *Agrobacterium* T-DNA have been found naturally integrated into the genome of untransformed sweet potato cultivars (Kyndt *et al.*, 2015) and it’s interesting to do an analysis of the expressions of the genes found. With this objective, the expression of the *iaaH* (Indole-3-Acetoamide Hydrolase) and *C-prot* (C-protein) genes found in *Ipomoea batatas* L. “camote” (Jewel cultivar) from the T-DNA of *Agrobacterium* spp. was quantified by real-time RT-qPCR. The relative expressions were analyzed in four tissues: apical shoot, leaves, roots and storage roots during plant development (divided into time points one to eight, each consisting of 15 days intervals). It was observed that the *iaaH* gene had an up-regulation in comparison with the control in the root and storage root tissues, the leaf tissue contained many variations in the expression while the apical tissue had a lower expression during the entire development stage. In the case of the *C-prot* gene, there was an up-regulation in comparison with the control in the leaf tissue during the growth of the plant, and in the apical tissue there was an increase in expression during the last month of observation, whereas the roots and storage root tissues had less expression during the entire stage of plant development.

Key words: *Ipomoea batatas*, T-DNA, *Agrobacterium*, relative expression, *iaaH* gene, *C-prot* gene.

I. INTRODUCCIÓN

La transferencia horizontal de genes (THG) es un proceso que consiste en la transferencia del genoma, o parte de éste, de un organismo a otro que no forma parte de su descendencia. Desde hace mucho tiempo se conoce la importancia de este proceso como fuente de variación genética en procariontes. Sin embargo, en los últimos años se han acumulado evidencias de que este proceso puede abarcar otros grupos de seres vivos, incluyendo plantas superiores y animales, al menos en las primeras etapas de la evolución (Kurland *et al.*, 2003).

El mecanismo de THG mediado por *Agrobacterium* spp. en plantas ha sido bien estudiado, esta bacteria es considerada un fitopatógeno natural y tiene la capacidad de integrar establemente parte de su material genético dentro del genoma de su hospedero (Valderrama *et al.*, 2005). Las cepas virulentas de *Agrobacterium* contienen el plásmido Ti o Ri, de un tamaño que varía entre los 130-230 kb.

Los estudios de los mecanismos de infección de los plásmidos Ti y Ri han tenido un gran impacto en diversos campos de la biología vegetal, agricultura y biotecnología, principalmente en la obtención de organismos genéticamente modificados. En este contexto, Kyndt *et al.* (2015) encontraron que el camote cultivado (*Ipomoea batatas* L.) contiene algunos genes provenientes de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* (tabla 1):

Tabla 1: Genes de *Agrobacterium* spp. encontrados en *Ipomoea batatas*

Gen	Producto
<i>iaaM</i>	Triptófano 2 -Monooxigenasa
<i>iaaH</i>	Indol-3-Acetoamida Hidrolasa
<i>acs</i>	Agrocipina Sintasa
<i>C-prot</i>	C-protein o c

FUENTE: Kyndt *et al.*, 2015

1.1 Justificación de la investigación:

- La relevancia de los hallazgos descritos en cuanto a transferencia de genes procedentes de *Agrobacterium* spp. hacia el camote, aumentan la necesidad de realizar más investigaciones para poder entender el mecanismo de flujo horizontal de genes (THG) a través de bacterias en la evolución de plantas superiores y analizar las posibles ventajas que pueden proporcionar estos genes a la planta, por lo que el presente trabajo de tesis pretende cuantificar y analizar la expresión de los genes *iaaH* y *C-prot* (provenientes del T-DNA de *Agrobacterium* spp.) encontrados en *Ipomoea batatas* L. “camote” (cultivar Jewel) en diferentes tejidos del mismo a través del tiempo.

1.2 Objetivo General:

- Analizar los niveles de expresión de los genes *iaaH* y *C-prot* provenientes de *Agrobacterium* spp. encontrados en el genoma de *Ipomoea batatas* L. “camote” (cultivar Jewel) durante el periodo de crecimiento del cultivo.

1.3 Objetivos Específicos:

- Optimizar las condiciones de RT-qPCR en tiempo real para los genes *iaaH* y *C-prot* en *Ipomoea batatas* L. “camote” (cv. Jewel):
 - Diseñar iniciadores específicos
 - Seleccionar el gen de referencia óptimo

- Determinar y comparar los niveles de expresión de los genes *iaaH* y *C-prot* de *Ipomoea batatas* L. “camote” (cv. Jewel) en diferentes tejidos y durante todo el periodo de crecimiento del cultivo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam)

2.1.1 Origen y distribución

El camote ha sido domesticado en América tropical hace más de 6000 años. Se originó en o cerca de la región noroeste de América de Sur, alrededor de los años 8000 a 7000 A.C. (Austin, 1988); encontrándose los restos arqueológicos de camote más antiguos en el mundo en el Cañón de Chilca (Perú), con una antigüedad aproximada de 8000 años (Woolfe, 1992).

Los países con mayor diversidad de germoplasma de camote en el mundo son Guatemala, Colombia, Ecuador y Perú (Austin, 1983) y también hay centros secundarios de variabilidad genética en Papúa Nueva Guinea, Filipinas y algunos países africanos (Yen, 1982)

El camote es una especie hexaploide cuyo número de cromosomas es $2n = 6x = 90$ (con un número básico de cromosomas $x = 15$). Sin embargo, también se han registrado algunas entradas tetraploides $2n = 4x = 60$ denominadas “camotes 4x” (Bohac *et al.*, 1993).

Trabajos con marcadores moleculares como RFLP, RAPD, y SSR confirmaron la relación filogenética entre *I. batatas* (L.) Lam y la especie silvestre *I. trifida* (Jarret *et al.*, 1992; Jarret y Austin, 1994; Buteler *et al.*, 1999), que fue previamente reportada con el análisis de datos morfológicos (Austin, 1977). Otras evidencias basadas en el análisis de restricción de DNA cloroplástico indicaron que *I. trifida* es probablemente uno de los antecesores de *I. batatas* (L.) Lam (Huang y Sun, 2000). Adicionalmente, estudios basados en la secuencia génica de la β -amilasa, un gen nuclear bastante conservado, sugirieron que *I.*

batatas (L.) Lam, *I. trifida* e *I. tabascanana* forman un grupo monofilético, es decir, descienden del mismo ancestro (Rajapakseet *al.*, 2004).

2.1.2 Descripción y clasificación

El camote o batata pertenece a la familia *Convolvulaceae*, es una planta herbácea y perenne que posee flores simpétalas y hojas lobuladas palmeadas o en forma de corazón (Figura 1A). *I. batatas* es un cultivo de extrema importancia en muchas partes del mundo, siendo cultivado en más de 100 países. El alto contenido de almidón y sabor agradable (dulce) de la raíz tuberosa, hacen de este cultivo, una de las raíces reservantes más importantes (Woolfe, 1992). Las raíces tuberosas (Figura 1B) se comen crudas, cocidas o fritas y presentan una cáscara lisa y colores que varían entre el rojo, morado, marrón y blanco, los brotes y hojas raramente se consumen. Los nombres comunes empleados son camote, batata, chaco, papa dulce, boniato, apichu (quechua) o kumara (Huamán, 1992).

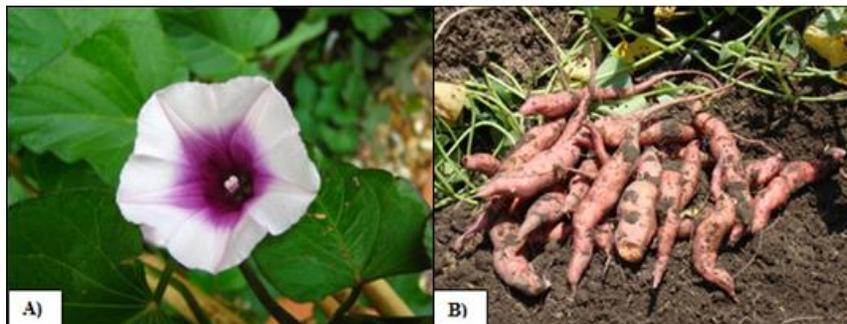


Figura 1: *Ipomoea batatas* (L.) Lam “camote” A) Flor de camote, B) Raíces tuberosas

FUENTE: <http://sustainabilityquest.blogspot.com/2011/05/orange-sweet-potatoes.html>

La clasificación sistemática del camote es la siguiente:

Reino:	Plantae
División:	Magnoliofita
Clase:	Magnoliópsida
Orden:	Solanales
Familia:	Convolvulaceae

Tribu: Ipomoeae
 Género: *Ipomoea L.*
 Subgénero: Eriospermum
 Sección: Eriospermum
 Serie: Batatas
 Especie: *Ipomoea batatas (L.) Lam*

2.1.3 Importancia del cultivo y su producción agrícola

Ipomoea batatas (L.) es el séptimo cultivo más importante en el mundo, después del trigo, arroz, maíz, papa, cebada y yuca con una producción anual de alrededor de 106 Mt (millones de toneladas) y una superficie cultivada de 8 millones de hectáreas. El cultivo de camote es capaz de producir altas tasas de rendimiento de materia seca por unidad de superficie de terreno y mano de obra, y este potencial se puede lograr bajo un amplio rango de climas y sistemas de cultivo, beneficiando así a los pequeños agricultores. El continente asiático, particularmente China, es el principal productor con el 80 por ciento de la producción mundial. En América Latina, destacan en producción Brasil, Argentina, Perú, Cuba y Haití (FAOSTAT, 2014). En la tabla 2 se puede observar información sobre área cultivada, producción y rendimiento del cultivo de camote en todo el mundo:

Tabla 2: Áreas cultivadas (Ha=Hectárea), producción (t=tonelada) y rendimiento de camote por continentes (Hg=Hectogramo)

Continente	Área cultivada (Ha)	Producción (t)	Rendimiento (Hg/Ha)
África	3,887,505	22,630,750	58,214
América del Norte	54,724	1,342,074	245,243
América Central	3,743	50,183	134,076
América del Sur	99,737	1,310,721	131,418
Asia	4,022,702	79,213,661	196,917
Europa	3,966	45,901	115,738
Oceanía	150,305	883,150	58,757
Total	8,352,323	106,601,602	940,363

FUENTE: FAOSTAT, 2014

Las raíces reservantes son una fuente valiosa de fibra, antioxidantes, minerales y vitaminas como β -caroteno (precursor de la vitamina A), por esta razón su uso como alimento-medicamento está indicado para combatir la deficiencia de vitamina A, reconocida por los síntomas de atraso en el crecimiento infantil, la piel áspera, la ceguera nocturna y la úlcera de córnea que puede provocar la pérdida total de la visión. La composición química por cada 100 g de raíz tuberosa se puede ver en la tabla 3 (Diop y Calverley, 2008). Adicionalmente, los camotes de pulpa morada contienen antioxidantes tales como las antocianinas (Bradshaw, 2010)

Tabla3: Composición química del *Ipomoea batatas* (L.)

Constituyente	Porcentaje o (mg/100g)
Agua	50 – 81 %
Proteína	1.0 - 2.4 %
Grasas	1.8 - 6.4 %
Almidón	8.0 – 29 %
Carbohidratos simples	0.5 - 7.5 %
Azúcares reducidas	0.5 - 7.5 %
Ceniza	0.9 - 1.4 %
Caroteno (vitamina A)	4 mg /100 g
Tiamina (vitamina B1)	0.1 mg /100 g
Ácido Ascórbico (vitamina C)	25 mg /100 g
Riboflavina (vitamina B2)	0.06 mg /100 g
Niacina (vitamina B3)	0.55 mg / 100 g
Sodio	41 mg /100 g
Potasio	385 mg /100 g
Fósforo	55 mg /100 g
Calcio	22 g /100 g
Hierro	1 mg /100 g

FUENTE: Diop y Calverley, 2008

El Perú tiene un volumen de producción de aproximadamente 225 mil toneladas anuales, siendo el departamento de Lima, el de mayor producción de camote (75 por ciento de la superficie cultivada); teniendo a Huaral y Cañete como sus principales provincias productoras (aproximadamente 120 mil toneladas métricas anuales). Los departamentos de Lambayeque y la Libertad registran una superficie de cultivo de 2,300 hectáreas, los valles de Ancash 1,500 hectáreas y los valles de Ica y Arequipa 1000 hectáreas. (INIA, 2009) (Figura 2).

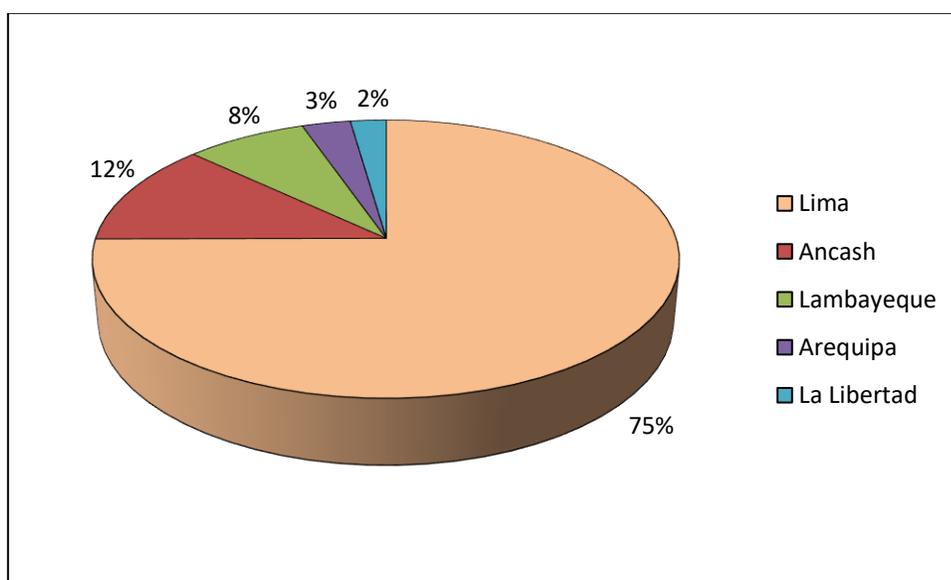


Figura 2: Producción anual de camote en el Perú

FUENTE: INIA, 2009

Una de las ventajas que presenta el manejo del cultivo es su método de propagación, que puede ser por esquejes en vez de semilla, reduciendo los costos de propagación (Karyeija *et al.*, 1998). Otra gran ventaja son las considerables cantidades de biomasa producida, generando más energía comestible que cualquier otro cultivo principal (Scott y Maldonado, 1999). En la tabla 4 podemos observar las características de *Ipomoea batatas*:

Tabla 4: Características del cultivo *Ipomoea batatas* (L.)

Características	<i>I. batatas</i> (planta)
Material de siembra (propágulo)	Esquejes
Periodo de crecimiento (meses)	3-6
Precipitación óptima (mm)	750-1000
Temperatura óptima (°C)	20-25
Resistencia a medicamentos	Sí
Resistencia a inundaciones	No
Tolerancia a la sombra	No
Requerimientos de fertilización del suelo	Bajo
Estacionalidad del ciclo de cultivo	Sí
Tiempo de vida de la raíz tuberosa debajo de la tierra	Moderado
Tiempo de vida de la raíz tuberosa post-cosecha	Corto
Hojas usadas para consumo humano	Sí, poco común en el oeste de África y este Asiático
Hojas usadas para consumo animal	Sí
<i>I. batatas</i> (raíz tuberosa)	
Materia seca (% peso fresco, FW)	20-35
Almidón (% FW)	18-28
Grano de almidón (en micrones)	2-40
Amilosa (% almidón)	8-32
Temperatura de gelatinización (°C)	58-65
Fibras (% FW)	1
Energía (kj/100g/FW)	500
Compuestos anti nutricionales	Inhibidor de tripsina

FUENTE: Lebot, 2009

2.2 Transferencia Horizontal de genes (THG)

La transmisión de genes se da mediante dos formas de transferencia: La transferencia vertical (la más común), en donde un organismo recibe el material genético de sus ancestros, y la horizontal (THG) o transferencia lateral de genes (TLG), que es un proceso en el que un organismo transfiere material genético a otra célula que no es descendiente (Denker *et al.*, 2008).

2.2.1 THG en bacterias

Las bacterias han obtenido una parte significativa de su diversidad genética a través de la adquisición de secuencias de genes de otras bacterias mediante THG (incluso entre bacterias filogenéticamente alejadas), produciendo genomas heterogéneos y dinámicos. Gracias a estas transferencias laterales, las bacterias han sido capaces adquirir resistencia a diferentes antibióticos, capacidades virulentas, y diferentes propiedades metabólicas que les permiten explorar nuevos hábitats (Maiden, 1998; Ochman *et al.*, 2000; Gogarten *et al.*, 2002).

Existen tres mecanismos básicos de THG: **transformación**, mediante la cual la bacteria capta DNA libre en el medio y lo incorpora a su material genético (permite la transmisión de material genético entre especies distantes); **transducción**, mecanismo por el cual un bacteriófago (virus) infecta una bacteria y le transfiere fragmentos de DNA de otra bacteria; y **conjugación**, un proceso por el que una célula bacteriana transfiere material genético a través del contacto físico con otra bacteria mediante una estructura proteica conocida como pilus (Natarajan *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 2009).

2.2.2 THG en eucariotas

La transferencia horizontal de genes en eucariotas tiene una frecuencia más baja que en procariotas y parece estar facilitada por endosimbiontes (llamada transferencia endosimbiótica de genes o TEG; Schmitz-Esseret *et al.*, 2004), desde las mitocondrias y plastos

(Gupta, 2000), pasando por los bien conocidos procesos de transmisión bacteriana a algunos hongos (como *Saccharomyces*) o la bacteria *Wolbachia pipientis* en algunos invertebrados (Nikohet *et al.*, 2008).

En el 2007, Hotopp *et al.*, examinaron los genomas de los hospederos de la bacteria *Wolbachia pipientis* confirmando una transferencia horizontal en los genomas de cuatro insectos y cuatro nematodos, en cantidades que oscilan desde pequeñas inserciones (menos de 500 pares de bases) hasta el genoma entero del parásito (más de 1 megabase). Además, se pudo conocer que algunos de estos genes de *Wolbachia* son transcritos en las células eucariotas que carecen de endosimbiontes, lo que indica que los genes transferidos horizontalmente son heredables, proporcionando así un mecanismo para la adquisición de nuevos genes y funciones que puede representar un importante impulso evolutivo.

En el 2008, Gladyshev *et al.*, encontraron evidencias de transferencia horizontal de genes bacterianos a rotíferos de la clase *Bdelloidea*, reportando la presencia de genes bacterianos a lo largo de las regiones teloméricas con algunos elementos genéticos móviles. Algunos de estos genes foráneos se mantienen intactos y se transcriben; la captura y la asimilación funcional de estos genes exógenos pueden representar una fuerza importante en la evolución de los rotíferos de la clase *Bdelloidea*.

a. THG en plantas

El modelo más estudiado de THG en plantas es el realizado por el género *Agrobacterium*. Muchos trabajos de investigación en el campo de la transformación de plantas mediadas por *Agrobacterium*, revelan que los genomas de algunas plantas contienen secuencias similares a las del T-DNA de *Agrobacterium*.

White *et al.* descubrieron por primera vez la THG en plantas en 1983, detectaron una región homóloga al T-DNA del plásmido Ri de *A. rizhogenes* en el genoma de *Nicotiana glauca* y la llamaron T-DNA celular (T-DNAc). En 1986, Furner *et al.* confirmaron la presencia de T-DNAc en cinco especies más de *N. glauca*, identificando dos genes *rol* y sugiriendo que ha sido resultado de una infección temprana de *Agrobacterium* en la evolución del género *Nicotiana*. En 1995, Meyer *et al.* amplificaron secuencias del genoma de *N. tabacum* (cv. Havana 425) homólogas a los genes pRiA4 *rolB*, *rolC* y *orf13* de

Agrobacterium (llamados *rolB*, *rolC* y *orf13*, respectivamente) y sugirieron que el genoma del tabaco posee al menos una copia de los loci *rolB*, *rolC* y *orf13*. Otras investigaciones como la de Suzuki *et al.* (2002) y el de Intriery y Buiatti (2001), han confirmado mediante análisis de DNA gel blot y PCR la presencia de regiones homólogas a los genes *rolB* y *orf13* en otras especies del género *Nicotiana*. Chen *et al.* (2014) secuenciaron cuatro insertos de T-DNA en *Nicotiana tomentosiformis* (TA, TB, TC y TD), uno de los ancestros de *Nicotiana tabacum*.

Existen otras plantas donde se ha descubierto indicios de secuencias similares al T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium*, *Daucus carota* “zanahoria” contiene secuencias homólogas al T-DNA de pRi1855 (Spano *et al.*, 1982) y *Convolvulus arvensis* al T-DNA de pRi8196 (Tepfer, 1984).

2.2.3 Transferencia horizontal de genes y su rol en la evolución

La transferencia de genes de un organismo a otro generalmente se realiza dentro de una misma progenie, de generación en generación a través de los procesos de mitosis o meiosis, lo que se conoce como transferencia vertical de genes (Rosewich y Kistler, 2000).

Convencionalmente, la THG fue considerada como un proceso con aportaciones muy limitadas para la evolución del organismo; sin embargo, la reciente acumulación de datos de genoma microbiano ha puesto de manifiesto que, en particular en procariotas, la THG es un proceso evolutivo más universal del que se pensó, contribuyendo a la reorganización de los genomas procariotas y adquisición de nuevas funciones biológicas (Koonin *et al.*, 2001). La participación de la THG y su impacto en la evolución de procariotas ha sido estudiada ampliamente (Kado, 2009; Kelly *et al.*, 2009). Mediante la THG las bacterias han sido capaces de adquirir resistencia a diversos antibióticos, modificar sus capacidades virulentas y de metabolismo, para una mayor adaptación, que en algunos casos incluyen las relaciones con plantas hospedadoras (Maiden, 1998; Gogarten *et al.*, 2002; Ochman *et al.*, 2000; Juhas *et al.*, 2009).

Por el contrario, la THG en eucariotas es un proceso considerado relativamente extraño o inusual. De acuerdo con el análisis de Andersson (2005), existen dos tipos de transferencias de genes en eucariotas: (1) la transferencia de genes de las mitocondrias y plastos, que son orgánulos de origen procariota (por transferencia endosimbiótica de genes), y (2) transferencia de genes de organismos no relacionados (THG). La transferencia clásica de genes dentro de las células eucariotas es conocida como la transferencia endosimbiótica de genes (TEG). Un ejemplo de TEG son las mitocondrias y los plástidos, que descienden de los organismos procariotas α -proteobacterias y cianobacterias respectivamente y habrían establecido una relación endosimbiótica luego de haber sido englobados por otro microorganismo (Ellis, 1982; Weeden, 1981).

Hasta el momento se sabe muy poco acerca de la THG en eucariotas entre diferentes individuos de la misma especie o de especies no relacionadas, esto podría ser debido a la limitada disponibilidad de información sobre secuencias genómicas completas de muchas especies, y también debido al hecho de que muchos eventos de THG podrían haber ocurrido hace mucho tiempo en la historia evolutiva y son difíciles de probar debido a las diferentes tasas de evolución que posteriormente se han producido en los organismos donantes y receptores. Sin embargo, con la disposición de nuevas y económicas tecnologías de secuenciación de ADN, ha aumentado el universo de información sobre secuencias de genes enteros, permitiendo una identificación más precisa del DNA foráneo adquirido por THG.

En algunos casos existe evidencia de THG que confieren una ventaja selectiva a la especie receptora. Un buen ejemplo reciente de THG interespecífica es la que se da entre *Stagonospora nodorum* y *Pyrenophora tritici-repentis*, descubierta por Friesen *et al.* (2006). Así mismo, Susuki *et al.* (2002) descubrieron que el origen del T-DNA celular (cT-DNA) en el genoma de *N. glauca* silvestre es el DNA-T de tipo mikimopina Ri plásmido (PRI) albergado en *Agrobacterium rhizogenes* y que estos genes realmente tienen un papel en la evolución de esta planta.

2.3 *Agrobacterium* spp.

Agrobacterium es un género de bacterias gram-negativa que causan la formación de tumores en una gran variedad de plantas, las cuales incluyen: “Tumoraciones en forma de agallas” o “Agalla de corona” (*A. tumefaciens* y *A. vitis*), “Raíces pilosas” (*A. rhizogenes*) y “Agalla de caña” (*A. rubi*) (Escobar, 2003).

Cuando se produce una herida en la superficie de la planta, esta suele formar acumulaciones de tejidos (benignas) llamadas callosidades; sin embargo, el crecimiento inducido por infección de *A. tumefaciens* produce un crecimiento descontrolado del callo. Cuando es infectada por *A. rhizogenes* se induce al crecimiento neoplásico de las células vegetales que se diferencian para formar "raíces pilosas". Morfológicamente, las raíces pilosas son muy similares en estructura a las raíces comunes con algunas excepciones notables: Los pelos de raíz son más largos, más numerosos, y los sistemas de raíces son más ramificados y exhiben un fenotipo agravitrópico (no responden a la gravedad) (Veena, 2007). *A. rhizogenes* en condiciones naturales, infecta a un número limitado de especies como manzana, pepino, tomate y melón (Weller, 2004); sin embargo, bajo condiciones de laboratorio existen más de 450 especies de plantas susceptibles a su infección (Porter, 1991).

El mecanismo de infección de *Agrobacterium* es un fenómeno mediante el cual la bacteria transforma genéticamente células de la planta infectada y depende de la presencia de un plásmido en la bacteria que varía entre 200-800 kb llamado pTi (plásmido inductor de tumores) en los casos de los *Agrobacterium tumefaciens* y *vitis*, o pRi (plásmido inductor de raíces) en el caso de *Agrobacterium. rhizogenes* (Zaenen *et al.*, 1974; Costantino *et al.*, 1994). Estos plásmidos llevan un fragmento de DNA denominado DNA de transferencia “T-DNA” que codifica para las funciones de formación del tumor, metabolismo de opinas y para el proceso de transferencia del T-DNA a la planta; y los genes de virulencia (*Vir*) que codifican factores necesarios para la transferencia e incorporación del fragmento de ADN en el genoma de la planta (Sheng y Citovsky, 1996; Zhou y Christie, 1999).

Este proceso de transferencia de genes ha sido ampliamente estudiado como método para introducir genes de interés en plantas (Tzfira y Citovsky, 2003; Llop 2003; Gelvin, 2009); siendo las especies mejor caracterizadas de este género: *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* (Figura 3).

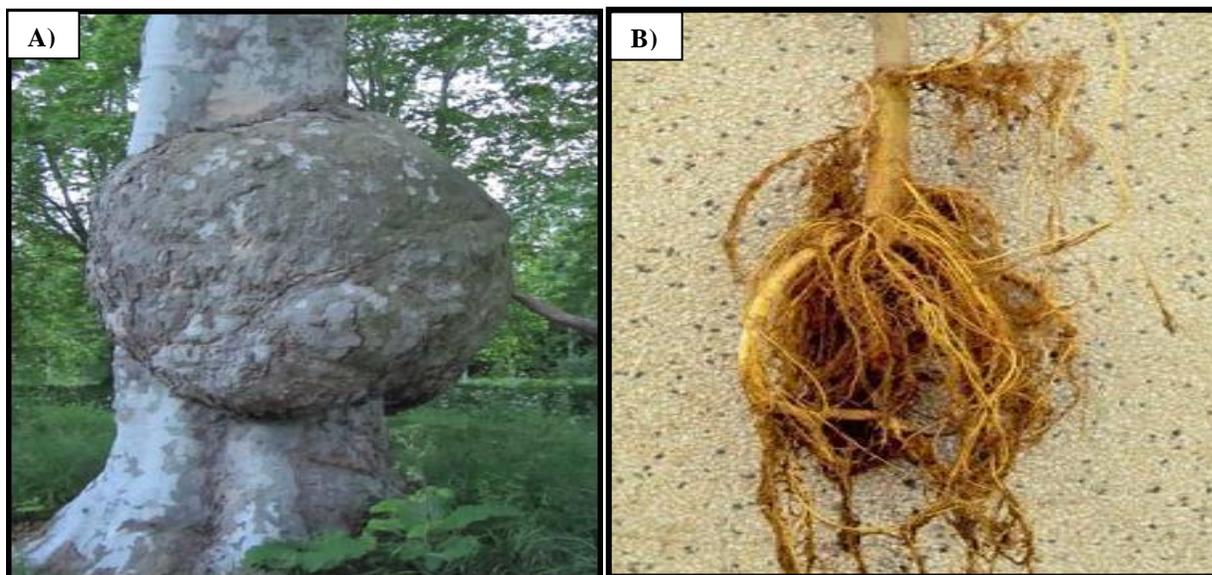


Figura 3: Plantas infectadas con especies del género *Agrobacterium*: A) *A. tumefaciens* y B) *A. rhizogenes*

FUENTE: www.forestryimages.org/images/768x512/5357075.jpg

2.3.1 Región T-DNA

El segmento de DNA del plásmido Ti que se transfiere desde la bacteria a la célula vegetal se denomina T-DNA (Chilton *et al.*, 1977) (ver figura 4). Una vez transferido, el T-DNA permanece estable y no puede codificar por sí mismo los productos que median su transferencia (Leemans *et al.*, 1982; Zambryski *et al.*, 1983). Las secuencias de los extremos del T-DNA (llamados bordes) son esenciales para el proceso de transferencia y el DNA que se va a transferir debe estar entre estos bordes (Peralta y Ream, 1985). La longitud de los bordes es de 25 pb y flanquean la región del T-DNA como repeticiones directas (Zambryski *et al.*, 1982), estos bordes dirigen la transferencia de forma polar, de derecha-izquierda, siendo el borde derecho imprescindible para la formación del tumor (Shaw *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 1984).

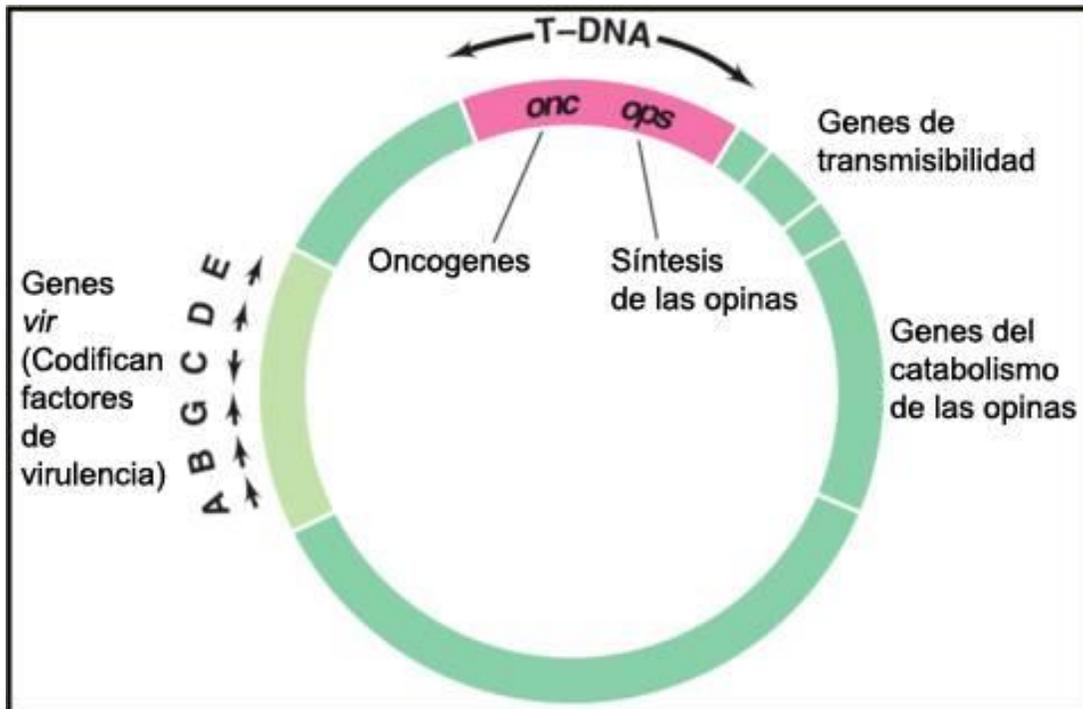


Figura 4: Estructura del plásmido Ti de *A. tumefaciens*

FUENTE: Madigan, 2009

2.3.2 Mecanismo de infección de *Agrobacterium*

Para que se inicie el estado tumoral es necesaria la existencia de una lesión en la planta y la adhesión en esta de las bacterias de *Agrobacterium*. Se han descrito al menos siete pasos en la inducción tumoral: 1) Reconocimiento de una célula vegetal susceptible, 2) Unión de la bacteria a la célula vegetal, 3) Inducción de la expresión de los genes *vir*, 4) Producción de una copia transferible del T-DNA, 5) Transferencia del complejo T a la célula vegetal, 6) Integración del complejo T en el genoma nuclear de la planta, y 7) Expresión de los genes que contiene el T-DNA (Llop, 2003) (Figura 5).

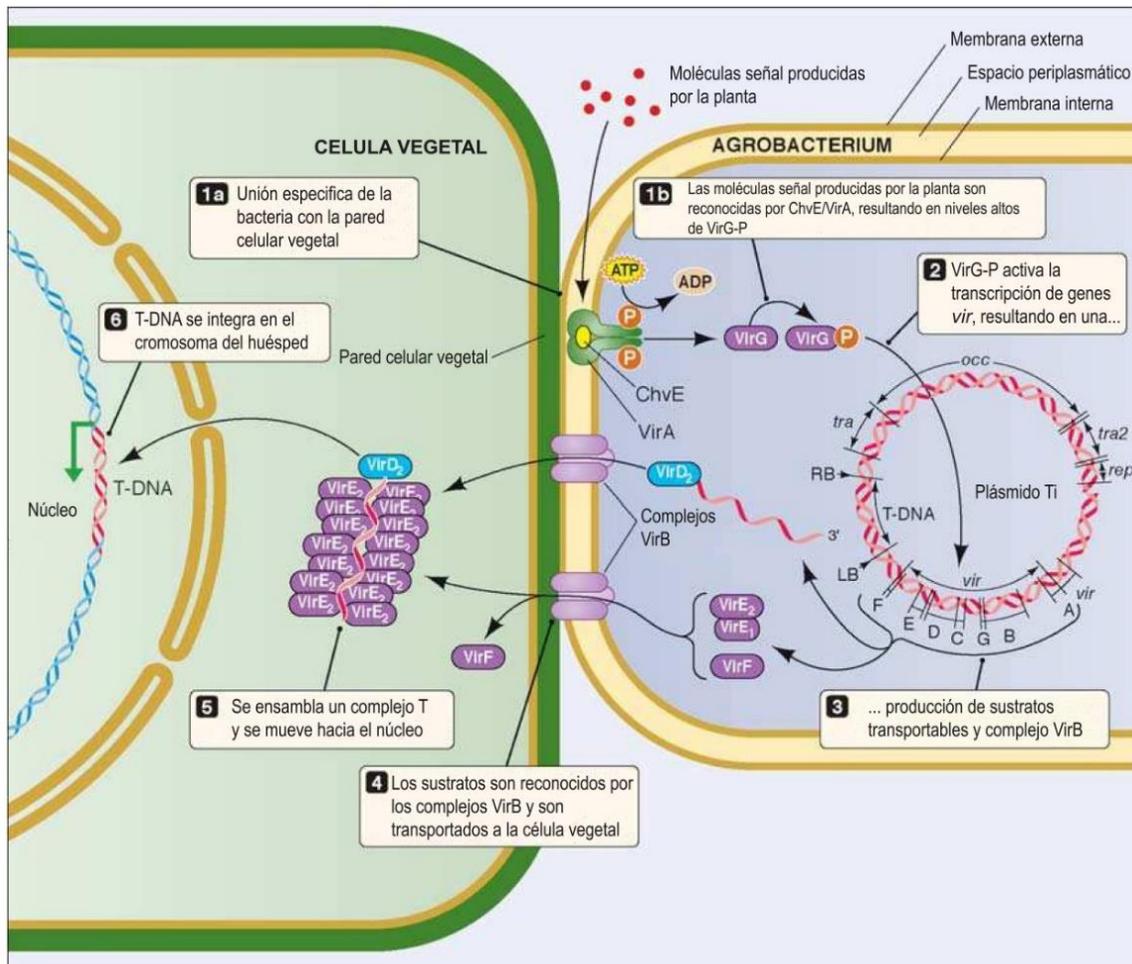


Figura 5: Mecanismo de infección de *Agrobacterium*

FUENTE: Modificado de McCullen y Binns, 2006

Para el reconocimiento de tejido vegetal susceptible a una infección por *Agrobacterium* intervienen moléculas receptoras complementarias que se encuentran tanto en la superficie de las células vegetales como en el de la bacteria. Las células dañadas secretan compuestos fenólicos de bajo peso molecular que son reconocidos de forma específica como moléculas señal, principalmente acetosiringona (AS) e hidroxiacetosiringona (OH-AS) (Llop, 2003) y *Agrobacterium* migra a través de una gradiente de concentración de estos compuestos hacia la herida.

Agrobacterium tiene en su cromosoma la maquinaria necesaria para la adhesión a la célula vegetal. Primero se produce una unión débil polar mediada por un lipopolisacárido

(LPS) y el β -glucano (Matthyse, 1983). Posteriormente se produce una síntesis de microfibrillas de celulosa para el anclaje a la planta y formar agregados bacterianos de gran tamaño (mediados por los genes de virulencia *chvA*, *chvB* y *pscA*).

El siguiente paso en la infección es la inducción de la expresión de la región *vir* que contiene los genes de virulencia o genes *vir*. La región *vir* se encuentra en el plásmido Ti y codifica proteínas que son esenciales para la transferencia del T-DNA (Figura 5); está organizada en 6 operones: *VirA*, *VirB*, *VirR*, *VirD*, *VirE* y *VirG*. La expresión de estos genes se induce cuando moléculas señal de la planta (compuestos fenólicos de bajo peso molecular sintetizados por los tejidos vegetales heridos) se encuentran en una concentración de 10^{-5} M y el pH se encuentra entre 5.0 y 5.8. Esta acidez logra protonar los compuestos fenólicos, incrementando su permeabilidad de membrana. Todas las moléculas señal actúan sobre el operón *virA*, induciéndolo a generar una proteína quinasa que se autofosforila y transfiere el grupo fosfato a la proteína *virG* que pasa a su forma activa e induce la transcripción de los demás genes *vir* (Jin et al., 1990).

La síntesis de la cadena T se inicia con la transcripción de los genes *vir*. Los productos del operón *virD* tienen una actividad endonucleasa, reconocen las secuencias terminales del T-DNA y cortan el T-DNA del plásmido Ti (Yanofsky et al., 1986). Luego, el DNA superenrollado pasa a una forma relajada gracias a la proteína VirD1 (Ghai y Das, 1989); la proteína VirD2 es la encargada de cortar los extremos de la cadena inferior del DNA y se une al extremo 5' de cada cadena rota, a estas cadenas simples inferiores que están en forma lineal se les denominan cadena-T (Stachel et al., 1986). La proteína VirD2 (ya unida a la *cadena-T*) le confiere polaridad, permitiendo que el extremo 5' entre primero en el núcleo de la célula vegetal. Este complejo ácido nucleico/proteína se denomina *complejo-T* (Zupan et al., 2000).

El *complejo-T* es reconocido y movilizado dentro de la célula vegetal hacia el núcleo. Las proteínas VirD2 y VirE2 son las encargadas de guiar la *cadena-T* por el citoplasma gracias a sus secuencias de localización nuclear (NLS, *nuclear signal localization*). Otras proteínas que participan en este transporte son la α -carioferina (Ballas y Citovsky, 1997) y la ciclofilina (Deng et al., 1998) que interaccionan con las secuencias NLS de las proteínas *Vir*. Una vez alcanzado el núcleo, el *complejo-T* se inserta al genoma de la planta.

Los genes del T-DNA integrados a la planta poseen señales de transcripción que permiten expresarse en niveles muy altos (Willmitzer *et al.*, 1983), existiendo dos grupos de genes característicos: los oncogenes (*onc*) y los genes de síntesis de opinas (*ops*). Los oncogenes originan la formación del tumor mediante una síntesis anormal de fitohormonas (principalmente citoquininas y auxinas) mientras que los genes de síntesis de opinas codifican enzimas que hacen que la planta produzca ciertos aminoácidos especializados denominados opinas (que son fuente de energía específica para la bacteria) (Hong *et al.*, 1997).

Agrobacterium expresa los siguientes oncogenes:

- ***iaaH* e *iaaM***: Encargados de convertir el triptófano en “ácido indolacético” vía indolacetamida (Schroder *et al.*, 1984; Van Onckelen *et al.*, 1986).
- **Gen 5**: Encargado de sintetizar y limitar la producción de *indol-3-lactato* (análogo antagonista de auxinas) a partir de triptófano (Körber *et al.*, 1991).
- ***ipt* o *tmr***: Produce la isopenteniltransferasa que se encarga de sintetizar isopentenil-adenosina (citoquinina) utilizando isopentenil pirofosfato y AMP (Barry *et al.*, 1984).
- **Gen 6a**: Está involucrado en el transporte de opinas a través de las membranas mediante la codificación de permeasas (Messens *et al.*, 1985)
- **Gen 6b**: Es una proteína nuclear que interactúa con varias proteínas nucleares del huésped y puede actuar como un chaperón de histonas; también aumenta la sensibilidad de las células de la planta a las fitohormonas mediante un mecanismo aun no conocido (Hooykaas *et al.*, 1988).

Dentro de los genes *ops* o productores de opinas (Tempé y Goodman, 1982; Ellis *et al.*, 1984; Dessaux *et al.*, 1986) se pueden mencionar algunos como ***nos*** (nopalina sintetasa), ***acs*** (agrocinoquina sintetasa), ***ocs*** (octopina sintetasa), ***ags*** (agropina sintetasa), ***mas 1'*** y ***mas 2'*** (manopina sintetasa)

2.4 Gen *iaaH*

Klee *et al.* (1987) determinaron la función de los genes *iaaH* e *iaaM* mediante el estudio del desarrollo de plantas transgénicas de petunias y demostraron que éstas presentaban un incremento en los niveles de auxinas en comparación con los controles de plantas no transformadas y además el desarrollo de algunas anomalías (raíces adventicias, dominancia apical extrema y hojas enrolladas).

Las auxinas son hormonas vegetales clave y están implicadas en el control del crecimiento de las plantas, la floración, fototropismo y geotropismo, engrosamiento de tallos secundarios; las auxinas potencian la formación de raíces adventicias, retardan el crecimiento de yemas laterales, aceleran el crecimiento de frutos y rompen la latencia del tubérculo. El tipo de efecto que da la auxina depende de varios factores: la edad de la planta, la concentración de la hormona endógena, la especie de planta, y en especial, cual es el tejido afectado (Romanov *et al.*, 2000)

Para la formación de los tumores en las plantas infectadas, el T-DNA de *A. tumefaciens* contiene genes para la producción de la auxina ácido indol-3-acético (IAA) mediante la ruta indol-3-acetamida (IAM), esta ruta biosintética no es usada de manera natural en las plantas para la producción de auxinas.

Agrobacterium tumefaciens sintetiza IAA a partir del triptófano en una reacción de dos pasos, usando las enzimas que producen los genes *iaaM* e *iaaH* (Lutova *et al.*, 2000). La enzima clave en esta reacción es la triptófano monooxigenasa codificada por el gen *iaaM* (*aux1*) que convierte el triptófano en IAM, mientras que la enzima indol-3-acetamida hidrolasa (codificada por *iaaH*) (*aux2*) convierte el IAM en IAA (figura 6). Estos genes han sido clonados y caracterizados para *Agrobacterium rhizogenes* (Huffman *et al.*, 1984; Offringa *et al.*, 1986) y *A. tumefaciens* (Thomashow *et al.*, 1984, 1986).

Las expresiones combinadas de los genes de *Agrobacterium* involucrados en las rutas del IAA y rutas de citoquinas generan las tumoraciones en la planta infectada, mientras que la expresión de los genes de opinas proveen los aminoácidos necesarios para el crecimiento bacteriano (las opinas son aminoácidos metabolizados sólo por la bacteria).

2.4.1 Presuntas rutas de biosíntesis de auxinas (Mano *et al.*, 2009)

Hasta el momento se han propuesto dos rutas principales de la síntesis de IAA: Una vía triptófano dependiente y otra triptófano independiente (Woodward and Bartel, 2005). Dentro de ruta triptófano dependiente se han postulado cuatro rutas en plantas: (i) La ruta de indole-3-acetaldoxima (IAOX) a indol-3-acetonitrilo (IAN); (ii) la ruta de IAOX a indol-3-acetaldehído (IAD); (iii) la ruta de triptamina (TAM) a IAD y (iv) la ruta de ácido indol-3-pirúvico (IPA) a IAD (ver figura 9). La ruta biosintética que convierte el triptófano en IAM y luego en IAA (ver figura) no es utilizada en plantas, por lo tanto, la expresión de los genes del T-DNA (que contienen las enzimas para esta ruta) en las plantas infectadas no puede ser controlada por la planta. Esta es la principal causa de la formación de tumores en plantas infectadas por *Agrobacterium tumefaciens*.

Se conoce muy poco sobre la base genética de las enzimas claves de la ruta del IAA y se han identificado un número reducido de genes en distintas familias de plantas, como los genes CYP79B1–CYP79B3 envueltos en la conversión de triptófano a IAOX a través de la citocromo P450 monooxigenasa (Naur *et al.*, 2003) (ver figura 9), NIT1 y NIT2 que convierten el IAN en IAA mediante nitrilasas (Park *et al.*, 2003), YUCCA que convierte el TAM en N-hidroxil TAM a través de la flavina monooxigenasa (Zhao *et al.*, 2001, 2002; Cheng *et al.*, 2006, 2007; Yamamoto *et al.*, 2007), atAO y zMAO transforman el IAD en IAA mediante la aldehído oxidasa (Akaba *et al.*, 1999), y TAA1 convierte el triptófano en IPA a través de una aminotransferasa (Stepanova *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008) (Figura 9). La familia de genes CYP79B ha sido identificada hasta ahora en *Arabidopsis*, *Brassica napus* y *Sinapis alba* (Bak *et al.*, 1998), indicando que la ruta del IAA “IAOX dependiente” es una ruta específica en algunas especies de plantas (Sugawara *et al.*, 2009).

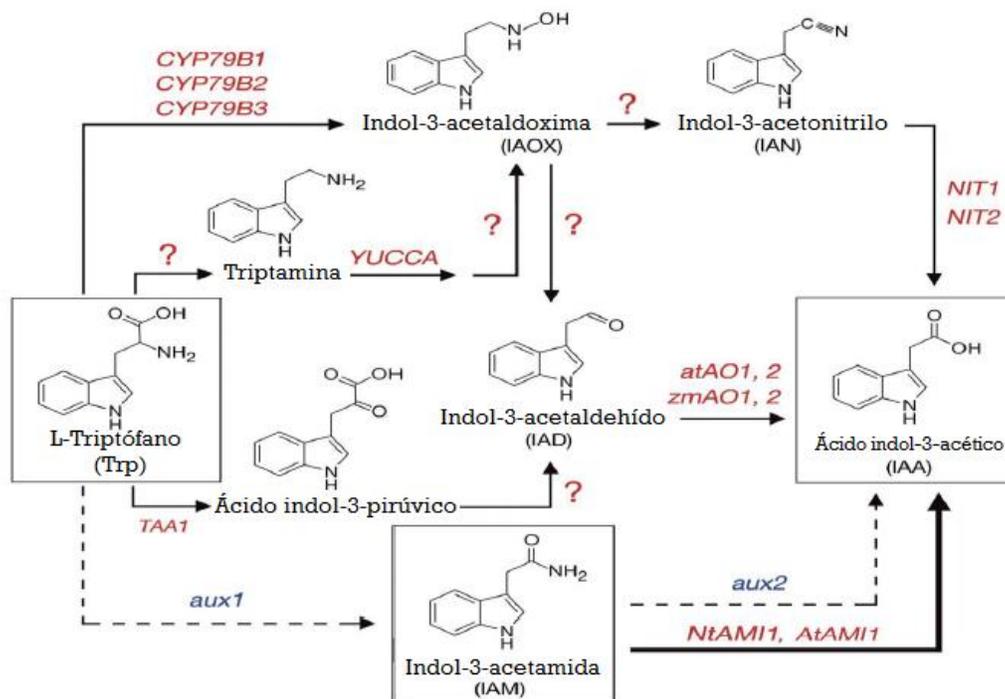


Figura 6: Presuntas rutas de la biosíntesis de IAA

FUENTE: Mano et al., 2009

En la figura 6, las flechas continuas indican las rutas biosintéticas del IAA propuestas en plantas. Las flechas discontinuas indican la ruta codificada por el T-DNA para la síntesis de auxina propuesta para las células de las plantas transformadas por *Agrobacterium*. La flecha más gruesa indica la nueva ruta encontrada en *Arabidopsis* y *Nicotiana*. Las letras en cursivas muestran los genes envueltos en los procesos de conversión. *aux1* (gen *iaaM*) y *aux2* (gen *iaaH*) son genes del T-DNA de *Agrobacterium* envueltos en la síntesis de IAA.

2.5 Gen *C-prot*

El gen *C-prot* se encuentra en el plásmido Ti de *A. vitis* y cepas nopalín-específicas de *A. tumefaciens* C58 o Sakura. Una de las cepas más estudiadas de *A. tumefaciens* es la cepa nopalina C58 aislada de una agalla de cereza en New York (Hamilton y Fall, 1971; Sciaky et al., 1978), el plásmido Ti de la cepa C58 tiene un tamaño de 214,233 pb y el gen *C-prot* (también llamado *C-protein*, *c* o *Atu6002*) tiene un tamaño de 1579 pb (ver figura 7).

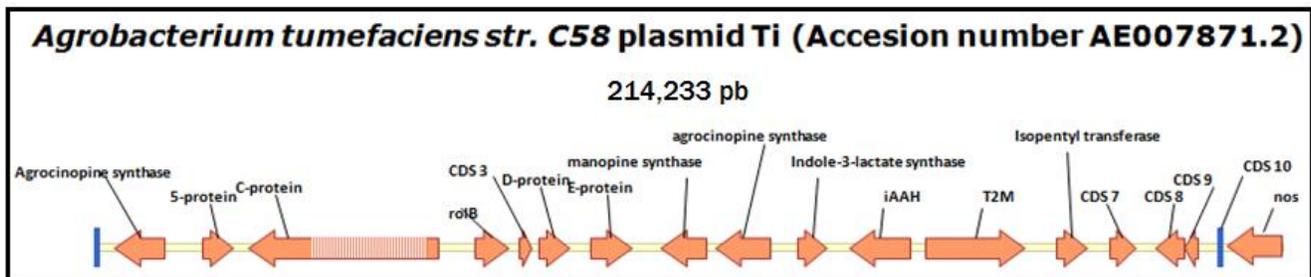


Figura 7: Algunos genes del plásmido Ti de *A. tumefaciens* C58

FUENTE: *www.ncbi.com*

Los estudios transcripcionales de la región izquierda del T-DNA C58 (acerca de 15kb) identifican 6 regiones de transcripción (de la *a* a la *f*) con funciones desconocidas (Willmitzer et al., 1983).

Mediante ensayos de mutación e infección en *Kalanchoe tubiflora* se determinó que la función de este gen podría estar relacionada con la inducción del desarrollo de meristemos: la deleción de la región izquierda del T-DNA del pTiC58 inducía tumores con pocos brotes en los tallos de *K. tubiflora* y demostraron que un fragmento que contenía los genes *c* y *c'* podía restaurar parcialmente la inducción de los brotes (ver figura 8) (Otten *et al.*, 1999)

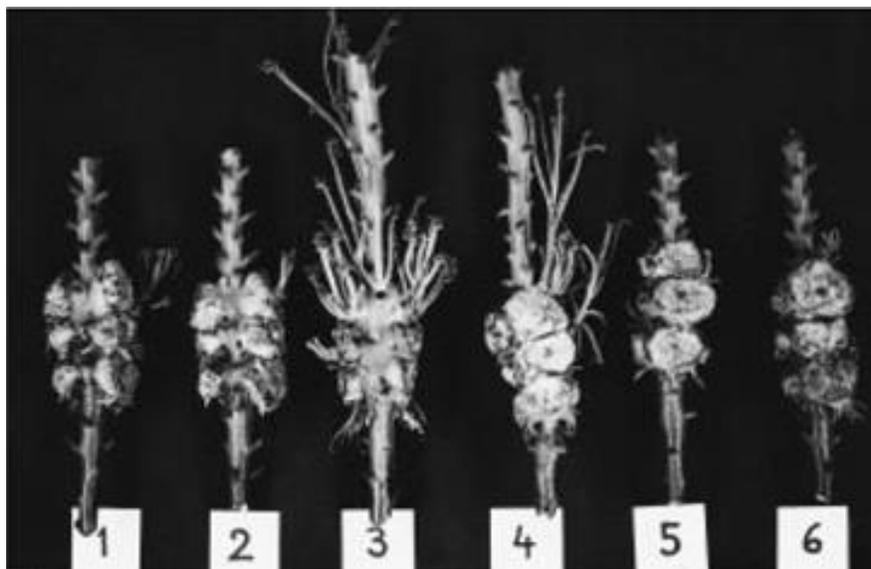


Figura 8: Experimentos de co-infección en *K. tubiflora* con el pTiC58 mutante con deleción de genes del fragmento b-e. Las fotos fueron tomadas 6 semanas después de la infección. 1) Control con el vector vacío, 2) Gen *b*, 3) Gen *c*, 4) Gen *c'*, 5) Gen *d*, 6) Gen *e*. Sólo el gen *c* y *c'* restauraron la inducción del tallo

FUENTE: *Otten et. al., 1999*

Estas observaciones sugieren un papel para el gen *C-prot* en el desarrollo tumoral, crecimiento de la planta y la morfogénesis. Estudios de infección de *A tumefaciens* C58 en *Nicotiana tabacum* demuestran que el producto del gen *C-prot* es una proteína integral de la membrana celular que se expresa en los tejidos tumorales de plantas infectadas y aumenta su expresión a medida que crece el tumor. También se demostró que la sobre-expresión del gen *C-prot* tiene implicancias en el desarrollo del fenotipo de la planta que son característicos en plantas de tabaco que tienen comprometida su señalización de auxinas (Heinekamp *et al.*, 2004), como el retraso en el crecimiento (por una reducción del tamaño de internudos), mejoramiento en la formación de brotes y disminución del tamaño de flores, teniendo implicancias en la fertilidad (ver figura 9); no se afectó la morfología de las raíces (Lacroix *et al.* 2014).

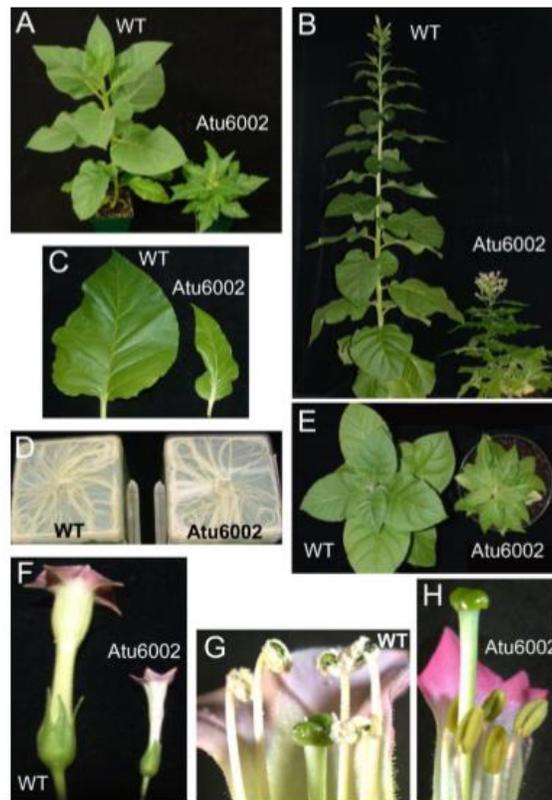


Figura 9: Retraso del crecimiento y alteración en la morfología de flores y hojas en plantas transgénicas de *N. tabacum* con sobre-expresión del gen *C-prot* (*Atu6002*) comparadas con las de tipo silvestre (WT). (A) Vista general de la planta de 3 semanas de edad. (B) Vista general de la planta de 2 meses de edad. (C) Forma y tamaño de hojas a las 3 semanas de edad. (D) Raíces a las 3 semanas de edad. (E) Vista general de la planta a las 3 semanas de edad. (F-G) Morfología de la flor a los 2 meses de edad.

FUENTE: Lacroix *et al.*, 2014

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico:

- Esquejes de *Ipomoea batatas* (L.) Lam cultivar Jewel obtenidas del Centro Internacional de la Papa (CIP) en la sede San Ramón.

3.1.2 Iniciadores y reactivos:

- Secuencias nucleotídicas específicas diseñadas para PCR y PCR real time.
- Reactivos para extracción de DNA mediante el método de Bromuro de cetil-trimetilamonio “CTAB” y para extracción de RNA mediante el método de Trizol ® Reagent – INVITROGEN.
- Kits (GoTaq™ DNA Polymerase y Wizard SV de Extracción de gel de Promega, TURBO DNase de Ambion, SuperScript™ III First-Strand Synthesis for RT-PCR de INVITROGEN, SYBR® Green Supermix de BIORAD).

3.1.3 Programas informáticos:

- VectorNTI 8 (Invitrogen, USA).

- DNASTar (DNASTAR, Inc. USA).
- AlleleID 7.0 (Premier Biosoft, USA).
- Biorad Opticon Monitor 3 (Bio-Rad, USA).
- REST 2009 Software (QIAGEN, Alemania).
- R 3.1.1 Software.

3.2 Métodos

3.2.1 Diseño del campo de siembra de *I. batatas* (L.) cv. Jewel

Doscientos esquejes de *Ipomoea batatas* (L.) cv. Jewel provenientes de la sede San Ramón de CIP fueron sembrados (en el campo número 4 del CIP-Lima) en cinco surcos de quince metros de largo (40 esquejes por surco) y distanciados entre sí por un metro (ver figura 10). La siembra fue realizada en el mes de marzo, y se establecieron riegos mensuales y aplicaciones de insecticidas (ver anexo 4). Se sembró también maíz alrededor como cerco o barrera de amortiguamiento para el aislamiento del cultivo contra vientos, insectos, polinización o aplicaciones de insecticidas de los campos adyacentes.



Figura 10: Diseño del campo de siembra de *I. batatas* (L.) cv. Jewel

FUENTE: Edición propia, 2017

Luego de la siembra, cada quince días se cosecharon tres plantas al azar, y de cada planta se extrajeron tres muestras o repeticiones por cada tejido de interés (ápice, hoja, raíz y raíz tuberosa), dando un total de 130 muestras. La toma de muestra inicial (T_0) se estableció el día que se plantaron todos los esquejes en el campo, realizándose nueve extracciones en total (en un periodo de cuatro meses).

3.2.2 Secuenciamiento de los genes *iaaH* y *C-prot* en *Ipomoea batatas* (L.) cv. Jewel mediante PCR

a. Extracción de DNA genómico

Se realizó la extracción de DNA genómico a pequeña escala a partir de hojas de *Ipomoea batatas* (L.) Lam cv. Jewel, por el método de Bromuro de cetiltrimetilamonio “CTAB” (Anexo N° 1) con algunas modificaciones (Manual de Protocolos CIP, 2006): se trituró 200mg de tejido vegetal procedente de hojas en un tubo eppendorf conteniendo la mezcla de 700 μ l de CTAB más 2 μ l de β -mercaptoetanol. El tejido triturado fue homogenizado en vortex durante 2 minutos e incubado a 65°C durante 30 minutos. Luego se enfrió a temperatura ambiente durante 5 minutos y se le agregó 900 μ l de la mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó y centrifugó en frío (4°C) a 14000 rpm durante 10 minutos. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo agregándosele 240 μ l de isopropanol y se incubó a -20°C durante 20 minutos. Nuevamente se centrifugó en frío (4°C) a 14000 rpm durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue secado a temperatura ambiente. El pellet seco fue lavado con etanol de 70 y 100% para posteriormente ser resuspendido en 150 μ l de agua libre de nucleasas (NFW).

Para la purificación del DNA genómico se agregó 150 μ l de la mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó en frío (4°C) a 14000rpm durante 5 minutos. Se transfirió el sobrenadante y se agregó 15 μ l de acetato de sodio 3M pH 5.0, se homogenizó e incubó durante 1 hora a -20°C. Se centrifugó, descartó el sobrenadante y dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente,

el pellet se resuspendió en 100µl de NFW e incubó con 5µl de RNAsa (10 mg/ml) a 37°C durante 1 hora. Las muestras obtenidas fueron conservadas a -20°C.

La calidad y concentración del DNA genómico, se realizó mediante observaciones de la corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X (Anexo N° 2), utilizándose 1µl de DNA y 9µl de buffer de carga SALB 1X (Anexo N° 2) y comparándose con el marcador de peso molecular λ/PstI. Además, los datos obtenidos fueron corroborados con mediciones en el espectrofotómetro (Nanodrop). La concentración final se estimó en ng/µl.

b. Ligación, clonación y secuenciación de fragmentos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Se diseñaron iniciadores para los genes *iaaH* y *C-prot* usando el software Vector NTI 8 de Invitrogen en base a información de las regiones de DNA de *Ipomoea batatas* (L.) cv. Huachano que contenían los genes de interés (Kyndt *et al.*, 2015), para ser usados en el DNA extraído de *Ipomoea batatas* (L.) cv. Jewel. Primero se realizó la amplificación por PCR como control, para verificar la calidad del DNA extraído, empleando los iniciadores que amplifican el gen de la Malato Deshidrogenasa (MDH) como MDH-H968 y MDH-1163 (Liet *et al.*, 2004) y son específicos para especies del género *Ipomoea*.

Se utilizó el kit GoTaq™ DNA Polymerase (Promega) para la amplificación de los genes *iaaH* y *C-prot*. Cada reacción contenía 5µl de Buffer PCR 5X (500mM KCl o cloruro de potasio, y 100mM Tris-HCl o Tris-hidrocloruro pH 9.0); 2.5µl de MgCl₂ (cloruro de magnesio 25mM), 0.5µl de cada desoxinucleótido trifosfato *dGTP*, *dATP*, *dTTP*, y *dCTP* (10mM), 0.5µl de cada iniciador sentido y antisentido (10µM), 0.13µl de GoTaq DNA polimerasa (2.5U/µl), 1µl de DNA genómico (100ng/µl) y completado a 25µl de reacción con agua NFW. Las condiciones de reacción para los iniciadores de *iaaH* fueron: 95°C por 2 min, seguida de 34 ciclos de 95°C por 30s, 54°C por 30s y 72°C por 1 min 21s, y luego una elongación final a 72°C por 10 min; para *C-prot* fueron: 95°C por 2 min, seguida de 34 ciclos de 95°C por 30s, 51°C por

30s a 72°C por 1 min 21s, y una elongación final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1% y los fragmentos de interés recuperados utilizando el kit Wizard SV de Extracción de gel (Promega), según el protocolo y especificaciones de la empresa.

Luego se ligó el DNA recuperado en un vector plasmídico pGem-T Easy (Promega): se mezcló 2.5µl de Buffer 2X de Ligación (60mM Tris-HCl, pH 7.8, 20mM MgCl₂, 20mM DTT, 2mM ATP, 10% polietilén glicol), 0.5µl del vector pGem-T Easy (50ng/µl), 0.5µL de la enzima T4 DNA ligasa (3 unidades Weiss/µl) y 1.5µl de producto de PCR (100ng/µl), e incubó a 4°C durante toda la noche. El plásmido cuenta con dos sitios de corte restricción con la enzima *EcoRI* para la comprobación de la inserción del fragmento deseado (Fig.11).

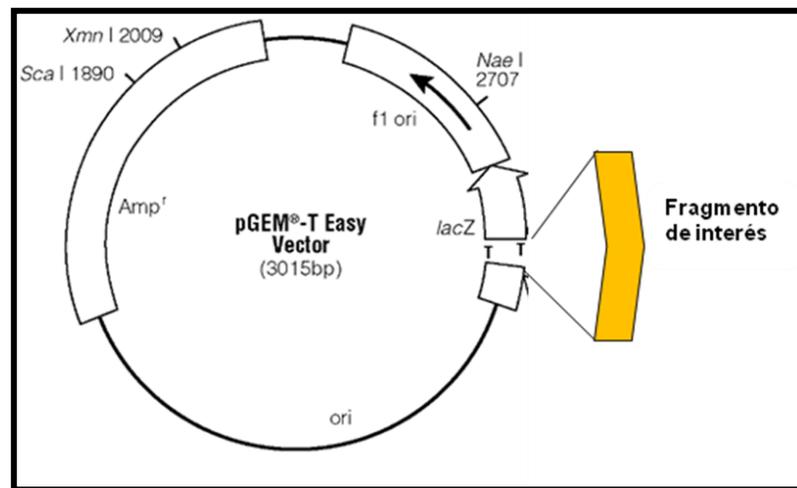


Figura 11: Esquema de la ligación mediante PCR en el plásmido pGem-T Easy (Promega).

FUENTE: Manual PGEM[®] – T Easy Vector de Promega

El fragmento ligado (que contiene una región que codifica para resistencia a la ampicilina) fue introducido en la *E. coli* DH5α (bacteria competente) mediante transformación por golpe de calor. Para esta etapa se mezcló el producto de la ligación con 100µl de cultivo bacteriano durante 30 min a 4°C, luego se incubó la mezcla a 42°C durante 1 minuto y rápidamente se regresó a 4°C durante 5 minutos. Se agregó

medio SOC (Sigma-Aldrich) enriquecido con glucosa y se incubó a 37°C durante una hora. Paralelamente, se prepararon placas con medios de cultivo que contenían 25µl de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 100mM, 25 µl de X-Gal 100mM y Ampicilina (100ppm), se sembró el cultivo líquido por diseminación y se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, se seleccionaron las colonias que contenían el inserto (colonias blancas con resistencia a ampicilina) y se cultivaron a 37°C en un medio líquido LB (Luria Bertani) con 100 ppm de Ampicilina durante toda la noche. Se empleó el kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega) para la extracción de plásmidos que contenían el fragmento de interés, que luego fueron enviados a la compañía MacroGen (Korea) para su secuenciamiento.

c. Análisis de restricción

El DNA plasmídico obtenido fue sometido a un análisis de restricción para comprobar la presencia de los fragmentos clonados. Se añadió la enzima de restricción *EcoRI* (Biolabs New England) a 1µl de DNA plasmídico durante dos horas a 37°C. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y visualizadas mediante un transiluminador UV.

d. Secuenciamiento y ensamblaje de los fragmentos obtenidos

Se realizó el secuenciamiento de los plásmidos que contenían el fragmento deseado mediante la compañía MacroGen (Korea), utilizando los iniciadores estándar M13 (sentido y antisentido). Se enviaron a secuenciar tres clones por cada gen y todas las secuencias fueron obtenidas en los formatos txt, abi, phd.1 y pdf y fueron ensambladas en secuencias consenso (tomando como referencia la secuencia completa del genoma de *Agrobacterium tumefaciens str.58* plasmid Ti) con el programa SeqMan Pro (DNASTAR, Inc.). Posteriormente, las secuencias consensos fueron alineadas con otras secuencias nucleotídicas homólogas de la base de datos del GenBank mediante el uso del programa BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

3.2.3 Diseño de iniciadores

El diseño de los iniciadores específicos para las pruebas de RT-qPCR se realizó mediante el software AlleleID 7.0 (Premier Biosoft, USA) que permite evaluar y descartar formación de dímeros, heterodímeros y estructuras secundarias entre los iniciadores específicos.

3.2.4 Extracción de RNA

Se realizó el protocolo de extracción de RNA con Trizol (Manual de Protocolos CIP, 2006) a partir de hojas, ápices, raíces y raíces tuberosas de *Ipomoea batatas* (L.) Lam cv. Jewel. Toda la extracción se realizó sobre hielo (para evitar la desnaturalización), se trituró 200mg de tejido vegetal con 1ml de Trizol[®] Reagent - INVITROGEN en empaques estériles, luego se agitó en el vortex y se dejó reposar por 5 minutos, luego se centrifugó a 12000rpm por 5 minutos, se transfirió el sobrenadante a tubos de microcentrífuga estériles, se agregaron 600µl de CHCl₃ (cloroformo), se agitó manualmente por 20 segundos y se dejó reposar por 5 minutos, luego se centrifugó a 12000rpm por 5 minutos a 4°C, la fase acuosa se transfirió a un tubo estéril que contenía 750µl de isopropanol, se dejó a 4°C durante toda la noche. Luego la muestra fue centrifugada por 20 minutos a 12000rpm, en seguida, se procedió a lavar el pellet con 500µl de etanol al 75%, luego se centrifugó por 5 minutos a 12000rpm y se dejó secando a temperatura ambiente por 5 minutos (invirtiendo el tubo sobre papel toalla), luego se resuspendió el pellet con 250µl de agua DEPC (agua tratada con dietil pirocarbonato), se agregó 250µl de LiCl 4M (cloruro de litio) y se dejó a 4°C durante toda la noche. Luego se centrifugó por 20 minutos a 12000rpm, se lavó el pellet con 500µl de etanol al 75%, se centrifugó por 5 minutos a 12000rpm, se dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos, y luego se resuspendió el pellet con 100µl de agua DEPC.

3.2.5 Tratamiento de las muestras de RNA con DNAsa

Para eliminar rastros de DNA en las muestras se procedió a usar el kit TURBO DNase (Ambion, USA) siguiendo este protocolo: en un tubo estéril se mezclaron 30µl de DNAsa 10X Buffer, 250µl de agua DEPC, 12µl de muestra de RNA (con una concentración final de 400ng/µl), 6µl de TURBO DNase y 1µl de RNase H (Invitrogen), luego de 30 minutos se añadieron 2µl más de TURBO DNase y se dejó reposar por 30 minutos más. Para la etapa de

inactivación de la enzima se empleó el método del fenol-cloroformo: se agregaron 400µl de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:24:1), luego se agitó y se separó el sobrenadante, se añadió al sobrenadante un volumen igual de Cloroformo : Alcohol Isoamilico (24:1), se volvió a agitar y rescatar el sobrenadante, se le añadió al sobrenadante un volumen igual de Isopropanol y 1/10 del volumen de Acetato de sodio 5M (diluido con agua DEPC y pH 5.1) y se dejó por una hora a -20°C, luego se centrifugó a 12000rpm por 20 minutos, se lavó el pellet con etanol al 75% (diluido con agua DEPC) y se llevó el pellet al liofilizador a velocidad estándar por 7 minutos y se resuspendió en 30µl de agua DEPC.

3.2.6 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

El RNA posee usualmente una hebra y es sensible al calor, por este motivo, antes de realizar la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real (donde será cuantificado el número de veces que se expresa el transcrito), es necesario hacer una transcripción reversa (RT) a partir del ARNm, para obtener el ADN complementario o ADNc (que es estable al calor y resiste la metodología del PCR). Para la síntesis de ADNc se utilizó la retrotranscriptasa SuperScript TM III del Kit SuperScript TM III First-Strand Synthesis for RT-PCR – INVITROGEN. Primero se tomó un volumen del RNA extraído que tenía la concentración de 2µg y se completó a 8µl de volumen con agua DEPC, para la producción del ADNc se agregó en un tubo de PCR de 0.2-0.5 ml la siguiente mezcla inicial (Mezcla 1, ver Tabla 5):

Tabla 5: Mezcla inicial (ARN+iniciadores) para la síntesis de ADNc (Mezcla 1)

Compuesto	Volumen
ARN (2 µg)	8 µl
Hexameros random primers (500 ng/ µl)	1 µl
dNTP (10mM)	1 µl
Volumen final	10 µl

FUENTE: Edición propia, 2017

Estas muestras se incubaron a 65°C por 5 minutos y luego en hielo por 1 minuto. Paralelamente se preparó la mezcla complementaria para la síntesis de ADNc (Mezcla 2, ver tabla 6)

Tabla 6: Mezcla complementaria para la síntesis de ADNc (Mezcla 2)

Compuesto	Volumen (IRx)
Buffer 10X RT	2µl
MgCl ₂ (25mM)	4µl
DTT (0.1 M)	2µl
RNase Out (40 U/µl)	1µl
SuperScript III RT (200 U/µl)	1µl
Volumen final	10µl

FUENTE: Edición propia, 2017

Se agregó 10µl de la mezcla complementaria para la síntesis del ADNc (mezcla 2) a cada muestra de ARN (mezcla 1); se incubó por 10 minutos a 25°C, luego 50 minutos a 50°C y finalmente, 5 minutos a 85°C. Por último, se agregó 1µl de RNasa H a cada tubo y se incubó por 20 minutos a 37°C.

3.2.7 Elección del gen de referencia para RT-qPCR en tiempo real

Para optimizar el procedimiento del RT-qPCR en tiempo real, es necesario establecer un gen de referencia adecuado para la muestra de interés. En el 2011, Tanning empleó el gen *COX* (Citocromo C oxidasa) como gen de referencia en *I. batatas* (L.) Lam cv. Huachano para los genes *iaaM* y *acs*. Se realizó una prueba de control de calidad en PCR con el gen de referencia *COX* y el DNA de *I. batatas* (L.) Lam cv. Jewel. Los productos de PCR fueron luego sometidas a una electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y los fragmentos obtenidos fueron visualizados mediante un transiluminador UV.

3.2.8 PCR cuantitativo de Transcriptasa Reversa en tiempo real (RT-qPCR)

El RT-qPCR está basado en la detección y cuantificación de un reportero fluorescente (agente intercalante que se une al ADN de doble cadena), cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción. Para esto, se empleó un termociclador de tiempo real MJ Research Chromo 4 y el kit SYBR® Green Supermix (BIORAD) como reportero fluorescente.

También se utilizaron iniciadores que amplifican la región codificante (ARNm) de los genes *iaaH* y *C-prot*, así como iniciadores que amplifican el gen de referencia Citocromo oxidasa (*COX*), gen endógeno de la planta (Cuellar *et al.*, 2006) (Tabla 7).

Tabla 7: Secuencia de iniciadores para la amplificación por RT-qPCR de los genes *iaaH*, *C-prot* y el gen *COX*

Gen	Iniciador	Secuencia	Tamaño del amplificado
<i>iaaH</i>	Sentido	5' GGTCAAAGGTGCGGTCGGAA 3'	118 pb
	Antisentido	5' CCGTGCTGAATACTTGCAGGCT 3'	
<i>C-prot</i>	Sentido	5' CCCAAGGAAAATCGAAGACA 3'	113 pb
	Antisentido	5' GAATTCGGACGTCGTTTCT 3'	
<i>COX</i>	Sentido	5' CGTCGCATTCCAGATTATCCA 3'	96 pb
	Antisentido	5'CAACTACGGATATATAAGAGCCAAAAGCTG 3'	

FUENTE: Edición propia, 2017

Los siguientes reactivos fueron utilizados en la prueba de PCR en tiempo real:

Tabla 8: Mezcla para el RT-qPCR

Stock	Volumen
IQ SYBR Green Supermix (1X)	5 µl
Agua Dietilpolicarbonato (DEPC) estéril	2 µl
Iniciador sentido (5 µM)	1 µl
Iniciador antisentido (5 µM)	1 µl
ADNc	1 µl
Volumen final	10 µl

FUENTE: Edición propia, 2017

Las condiciones para el programa utilizado en el equipo de Real Time PCR (Opticon Monitor 3) fueron:

Tabla 9: Programa de RT-qPCR para los genes *iaaH* y *C-prot*

Ciclos de amplificación	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94°C	2'	1
Denaturación	94°C	15''	39
Hibridación	62.7°C	20''	
Extensión	72°C	20''	
Lectura de placa	82°C	1''	1
Extensión final	72°C	10''	

FUENTE: Edición propia, 2017

Se utilizó el software MJ Opticon Monitor 3.1 (BIO-RAD) para detectar el número de ciclos de cada muestra en que la cantidad de fluorescencia emitida por el SYBR Green se vuelve exponencial en una gráfica de fluorescencia vs número de ciclo (figura 12). Este número de ciclo se llama ciclo umbral o C_t (threshold cycle) y es inversamente proporcional al número de copias del DNA blanco: a mayor concentración de blanco, menor C_t medido. El software también nos permite hallar las curvas de temperaturas de melting de las muestras analizadas.

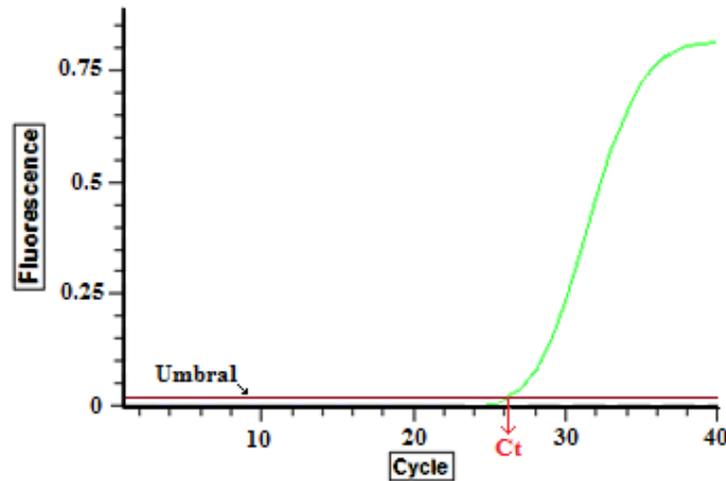


Figura 12: Gráfica de fluorescencia vs número de ciclo en RT-qPCR

FUENTE: Edición propia, 2017

El producto amplificado exponencialmente del PCR sigue la ecuación:

$$R_{Ct} = R_0 \times (1 + E)^{Ct} \quad (1)$$

Donde R_0 y R_{CT} son la cantidad de fluorescencia detectada después de los ciclos 0 y C_t respectivamente, y E la eficiencia. En una reacción perfecta de PCR, la eficiencia debería ser de 100% ($E=1$) y el amplicón se debería doblar en cantidad por cada ciclo. Sin embargo, empíricamente E es por lo general entre 0.65 y 0.9 (Tichopad *et al.*, 2003)

El análisis de las curvas de melting se realizó para descartar dimerizaciones de primers o alineamientos inespecíficos de primers (ver figura 13)

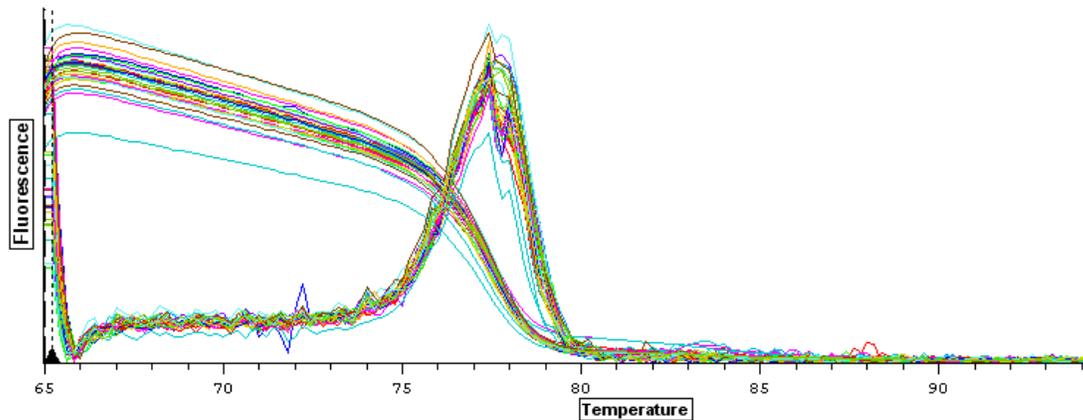


Figura 13: Curvas de melting en un gráfico de fluorescencia vs temperatura en RT-qPCR

FUENTE: Edición propia, 2017

3.2.9 Cuantificación de la expresión relativa y análisis estadísticos con el software REST 2009 (Pfaffl *et al.*, 2002)

Se utilizó el programa **Relative Expresión Software Tool – REST**, versión 2009 (Corbett Research & M. Pfaffl) para generar expresiones relativas con respecto a una muestra control usando los datos obtenidos del RT-qPCR (Pfaffl *et al.*, 2002). El programa aplica aproximados matemáticos basándose en los valores de C_t y las eficiencias de los iniciadores, determinando una diferencia entre la expresión relativa de un gen de interés (**GOI**: Gen Of Interest) normalizado a un índice del gen de referencia (**RI**: Reference Index) entre una muestra de interés (**SOI**: Sample Of Interest) y una muestra control (**C**: Calibrator).

Para obtener las eficiencias de los iniciadores empleados mediante REST (tanto de los iniciadores del gen de referencia *COX* como para los genes *iaaH* y *C-prot*), primero se hallaron los C_t correspondientes de distintas concentraciones de ADNc de una muestra X (mediante diluciones y dos repeticiones por dilución).

Una vez colocados todos los datos en el programa (eficiencias de los iniciadores y del control, y los C_t de los grupos de interés y del control con sus respectivas repeticiones) REST comienza el “Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test ©” (Pfaffl, 2001). REST

normaliza los datos de las expresiones del GOI con respecto al RI; la expresión relativa del GOI con el RI de cada muestra fue determinada como la Relación (R) entre el número inicial de copias del GOI (R_0 , ver ecuación 1) y la media geométrica del número inicial de copias del gen de referencia (RG: Reference Gene) (ecuación 2)

$$(2) \quad R = \frac{R_0(GOI)}{R_0(RI)}$$

REST calcula la media de los C_t de las muestras y los controles, y las relaciones de expresión con su correspondiente valor p o p-value para los datos normalizados y no normalizados. REST determina si los genes son up o down regulated en el grupo de las muestras comparado con el grupo control. En caso de “up regulation”, el factor de regulación es igual a la relación de expresión calculada; en caso de down regulation es igual al valor recíproco de la relación de expresión calculada (el error de la relación de expresión calculada es estimada por REST usando series de Taylor). REST emplea un test aleatorio para el análisis estadístico en vez de un test paramétrico estándar, quea pesar de no asumir ningún tipo de distribución paramétrica de los datos, se mantiene tan poderosa como otras pruebas paramétricas. Se decidió trabajar con nivel de significancia de $\alpha= 0.05$

Luego de obtener los primeros resultados estadísticos de REST (que nos confirma si existe o no una expresión significativa de nuestro gen de interés con respecto al control en los distintos tejidos de interés) necesitamos saber si existen diferencias significativas entre las tomas (de tiempo) de un mismo tejido, para esto se realizaron las pruebas estadísticas ANOVA y HSD Tuckey mediante el software R 2.13.1 (que proporciona una gran variedad de técnicas estadísticas y técnicas gráficas).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Diseño del campo de *Ipomoea batatas* (L.) cv. Jewel

El crecimiento de *Ipomoea batatas* (L.) cv. Jewel en el campo de cultivo diseñado se dio sin presentar problemas o enfermedades en la planta, favoreciendo así la calidad de las muestras de interés (ver figura 14).



Figura 14: Campo de cultivo de *Ipomoea batatas* (L.) cv. Jewel en el CIP – Lima

FUENTE: Edición propia, 2017

4.2 Secuenciamiento de los genes *iaaH* y *C-prot* en *Ipomoea batatas* (L.) cv. Jewel mediante PCR

4.2.1 Extracción de DNA genómico

Las modificaciones realizadas al método del CTAB lograron una mejor efectividad en la extracción de DNA genómico a pequeña escala de hojas de *Ipomoea batatas* (L.) cv. Jewel. La Figura 15, muestra los resultados de calidad de DNA genómico luego de correr 1 μ l

de resuspendido final de la extracción en un gel de agarosa al 1%. La concentración promedio de DNA obtenido fue 250 ng/ μ l (ver figura 15).

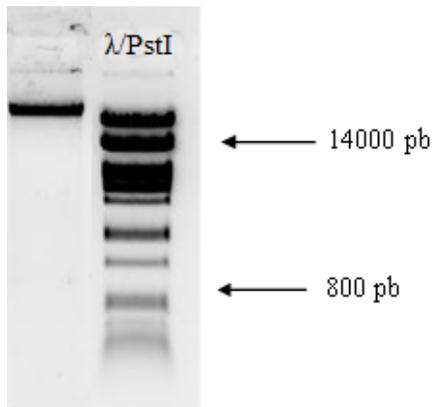


Figura 15: Calidad de DNA genómico de *I. batatas* cv. Jewel

FUENTE: Edición propia, 2017

4.2.2 Ligación, clonación y secuenciación de fragmentos de interés

En este estudio se identificaron por PCR las secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes *iaaH* y *C-prot* de *Ipomoea batatas* (L.) cv. Jewel. Las muestras analizadas dieron resultados positivos para el PCR control con el gen *MDH* (400pb), confirmando la calidad óptima de las muestras de DNA para las reacciones de PCR y a la vez su especificidad para el género *Ipomoea*. Las condiciones y tamaños esperados de las reacciones de PCR realizados para estos genes se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Condiciones de PCR para la amplificación de las regiones génicas e intergénicas del T-DNA

Gen	Iniciadores utilizados	Condiciones de PCR			Tamaño esperado (pb)
		Desnaturalización	Hibridación	Extensión	
<i>iaaH</i>	IbiaaH1F IbiaaH3R	95 x 30"	55 x 30"	72 x 1'15"	1199
<i>C-prot</i>	IbCprot2F IbCprot5R	95 x 30"	51 x 30"	72 x 1'21"	1350

FUENTE: Edición propia, 2017

En la figura 16 puede observarse la amplificación por PCR del gen *C-prot* usando los iniciadores IbCprot2F e IbCprot5R. La gradiente de temperatura generada fue entre 45°C y 55°C y demostró una relación inversa entre la temperatura y la presencia de bandas inespecíficas, lográndose a partir de 51°C un sólo producto amplificado del tamaño esperado (1366pb).

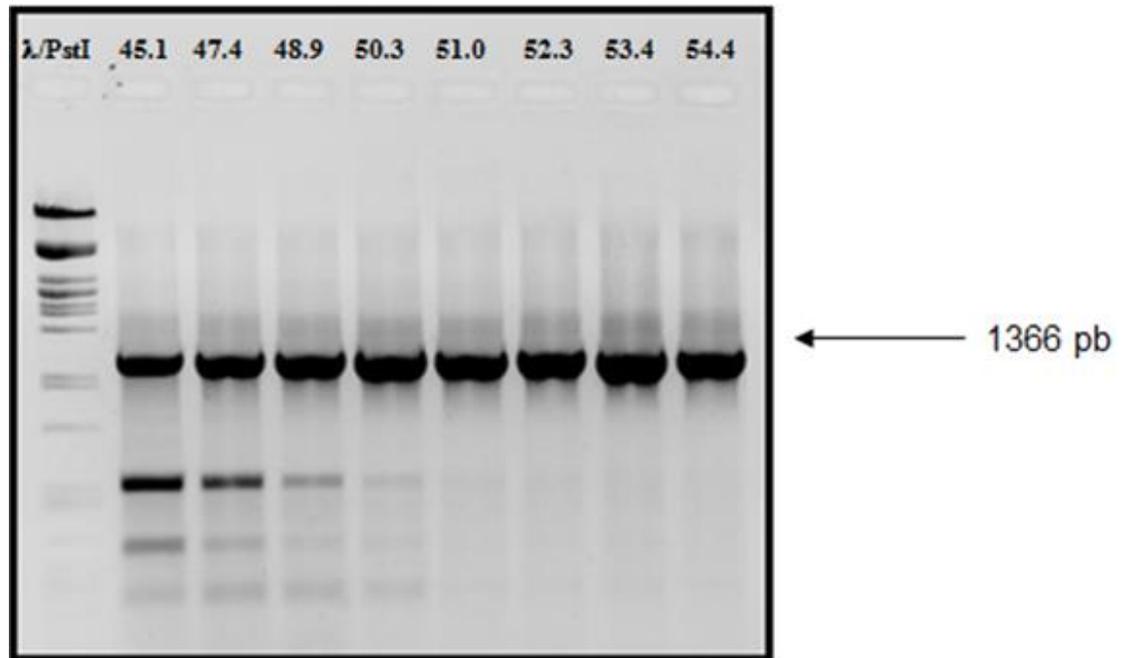


Figura 16: Gradiente de PCR para la amplificación del gen *C-prot*

FUENTE: Edición propia, 2017

4.2.3 Análisis de restricción

Se realizaron con éxito los análisis de restricción para los genes *iaaH* y *C-prot*. La Figura 17 muestra un análisis de restricción realizado a un vector plasmídico pGem-T Easy (Promega) que contiene el gen *C-prot*, éste fue digerido con la enzima *EcoRI* para comprobar la inserción del gen. Se puede observar que el plásmido contiene el gen de interés, ya que presenta los dos fragmentos esperados (uno de aproximadamente 3Kb correspondiente al plásmido sólo y otro de 1347pb correspondiente al tamaño del gen *C-prot*).

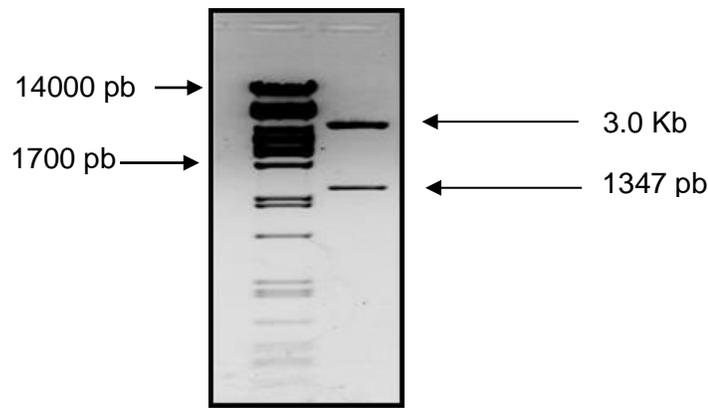


Figura 17: Análisis de restricción con *EcoRI* para plásmidos que contienen el gen *C-prot*

FUENTE: Edición propia, 2017

4.2.4 Secuenciación y ensamblaje de los fragmentos obtenidos

El resultado del secuenciamiento mediante el programa Seqman de los genes *iaaH* y *C-prot* de *Ipomoea batatas* (L.) cv. Jewel se muestra en la tabla 11:

Tabla 11: Secuenciación de los genes *iaaH* y *C-prot* de *Ipomoea batatas* (L.) cv. Jewel

Gen	Secuencia obtenida	Tamaño (pb)
<i>iaaH</i>	<pre> ettfagegtcaatfegggaaagctagggcgaccncgaantfcaatfgettectetaaagecggcccaatfgetaacagggetctgcagaactgca aaaccgcaatfctatfaccgaccgcaaacctctgatgacgcaaacgggagagctlaagccagccagctccggcttgcctgctgagctcagct ttecaactgtagatcctgaaagtggttccaatnaaccctgtgcaatactgaactatcttgcacatgggttggcgctcaangtgcgggtcgaanaa gattgcctctatctgtagaangcacaatagttfagatccggctfyagttgcgctctgaaagctgacaacgctgcaagfctcagccagctgctg lccgcaactfcaatcctgctgctgattccctacacgggctcagcaatfctcctgacgacgctcaatgaaagagkccclgcccacaagctgta agatattfagaacgccagaggaaftcnaagacaaftggcaagctcaccgattgctcaatfctccaanctgggaatfctcagctcaacgaa caaccacccctfllggccagcaaccggaatfaggctccctgctcaangcmacatccgaactaagttgcaataaataatgattggcagaccaa gtcgaacccctcaaacctatfcaaggatcagcttctgctctgaaatgactctctcgaagaakaaccacaccggacgtttgtgcgatgatgcc gaagctgtctcgggggggctgaccggtatfctccctctatccgntatcgtcggaggtfaggcaaatccnaccgcccacaagagctcgggga agcgcnaacagatgcgccggtctctgctcccaatgctcctacatcagcctgctactcctcggctcgaacaccggccactggagctcctcctg atctctgctfcccaggttccctgaccgccnctgctatagttgctcctgaatccaaacgcaaatctgcaatfctcctgctcctgctcctgctc gccccggcaaaaagccgcttaccacatcctgctcctctctggaacgfgagacatcaatcccgctgagcggcctggttgaanaagcaaccg llgctatggttgccttcaagcaagcgaantcccaaaagcccaactccggcgatccacgttggctcaactcctctgctcctgctcctgctcctg aatctgtgocacaagtcnattgacgcttctgctcctgctcctgctcctgctcctgctcctgctcctgctcctgctcctgctcctgctcctg agggttggatgatggtaccgatgcaacat </pre>	1413
<i>C-prot</i>	<pre> agatcgtacnaccgaacgangeggatnftatgancctatfangaacgcttffgnaatnaagccatnagnitgagttgccnccatganc aaggltctaggnaaactacccggcagttcccglgancagacgaatfagacafgggagctfagcgaactcaaacagctfagctcagctctgta agcccaatggcaatagttggccatfctgatgctctgaaatgggctgattgaaatfctgagagacagatcaggcggccatcgcacaatag ctatnaaacgcccagctgcccccctfagatfaggcgcctctgctctgctatctfccaacccagcgtanaagcctcaaacctcctctgctgctg ctatgtagctaatctgaacgaagccggfctcncatcaaatggcaacccaagaatgataatfctcctgctgctcctgctcctgctcctgctcctg agtaatfcccagctcgtgattggattfcttaactcycagtaaaagatattaggaatcacaactctctctatfctcattgagatctgccaatfag caaatfctgagcttcaccgcaacattfctgcaatcagfagctgcttgcctatfagaacataaagattgcaaacagccgaatattaccgga agggagcctagaanaactcctcctagcgaagaaactcgaagcctfcaatccgccaaggaatfcaagacagygataccatagttgctctg agatgaatcgggccagagctgtagacagcaatfcaagcgcacaanaagtgaaagaaagcagctccggaatcaactgccccctcaactaatac caaacgagagatgtagcctccgaaggaacagagtgattwtgctgcaccgcaatfctgagctgaatgattfagcgcctctcagta ctfcttaagcaacggggagcagagcaagttcaagaaagccgnaacgctcatctcttctcagcctfagcagctaatfctgctcagatg aggaacaatggctcctgctcctcaatctctctagaacagttalcaaacctgctgctggttggattctgactcctgagcagatgattctca ctatfagcccaatfctggctcctcctgctgctcctgctcctgctcctgctcctgctcctgctcctgctcctgctcctgctcctgctcctg cctctgctgagcctgaggttgaacaaatgcaatctcctctfcccacgctcattctcaacgataacga </pre>	1366

FUENTE: Edición propia, 2017

4.3 Diseño de iniciadores

El software AlleleID 7.0 limita la búsqueda de iniciadores en regiones conservadas mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), evita las homologías cruzadas significativas y minimiza los desajustes de temperatura de fusión y dimerizaciones. Los resultados del diseño de iniciadores se pueden ver en la tabla 12:

Tabla 12: Diseño de iniciadores para RT-qPCR

Iniciador	Secuencia	T _m (°C)	Tamaño del fragmento
iaaH F	ggtcaaaggtcggcgaa	59.4	118 pb
iaaH R	ccgtgctgaatactgcaggct	58.1	
Cprot F	cccaaggaaaatcgaagaca	51.7	113 pb
Cprot R	gattccggacgtcgttct	51.4	

FUENTE: Edición propia, 2017

Los resultados de la gradiente de temperatura en PCR para las dos parejas de iniciadores se muestran a continuación en la figura 18:

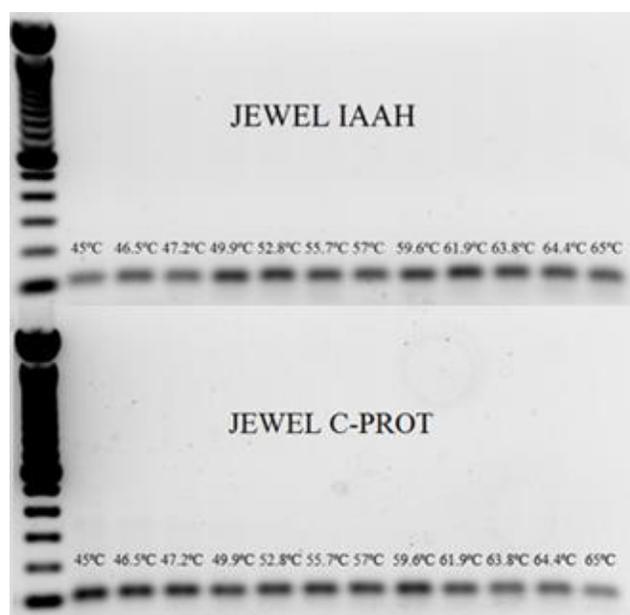


Figura 18: Corrida electroforética de una gradiente de temperatura para las parejas de iniciadores *iaaH* y *C-prot*

FUENTE: Edición propia, 2017

4.4 Extracción de RNA

El método del trizol fue muy efectivo para la obtención de RNA a partir de diferentes tejidos de *Ipomoea batatas* (L.) cv. Jewel. Como ejemplo, la figura 19 nos muestra los resultados de calidad de RNA de la toma de muestras número 3 (o tercera extracción), luego de correr 1µl de resuspendido final de la extracción en un gel de agarosa al 1%. La concentración de RNA obtenido fue entre 200 y 700 ng/µl (dependiendo del tejido).

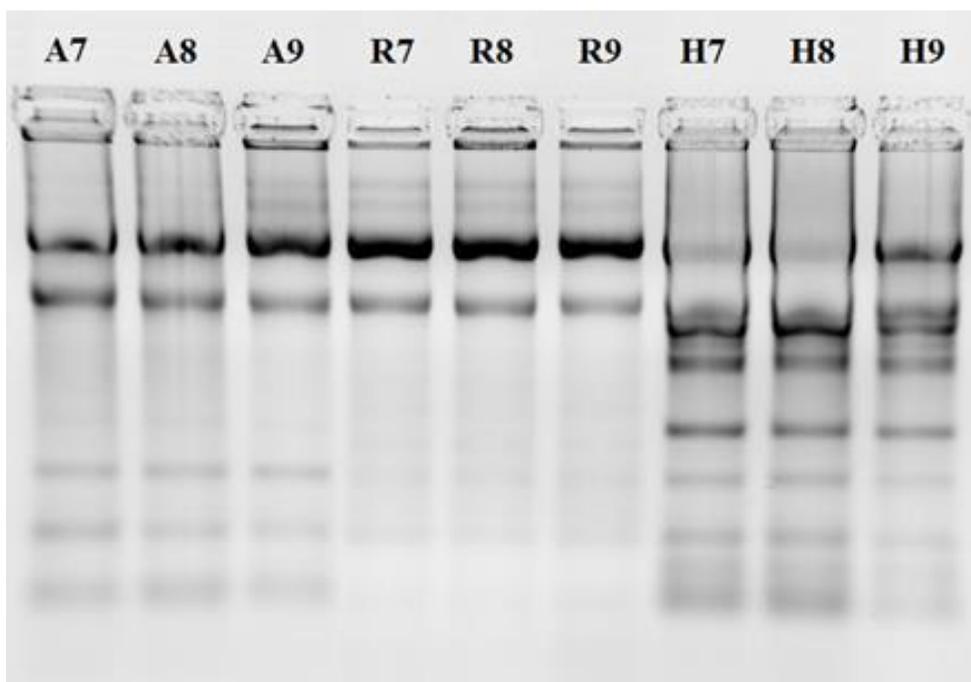


Figura 19: Corrida electroforética de la tercera extracción de RNA donde A es ápice, R es raíz y H es hoja (cada una con tres repeticiones)

FUENTE: Edición propia, 2017

4.5 Elección del gen de referencia para RT-qPCR en tiempo real

Se eligió el gen *COX* como gen de referencia para este trabajo (Tanning, 2011) y la corrida electroforética como control de calidad de la muestra de *I. batatas* (L.) cv. Jewel (ver figura 20).

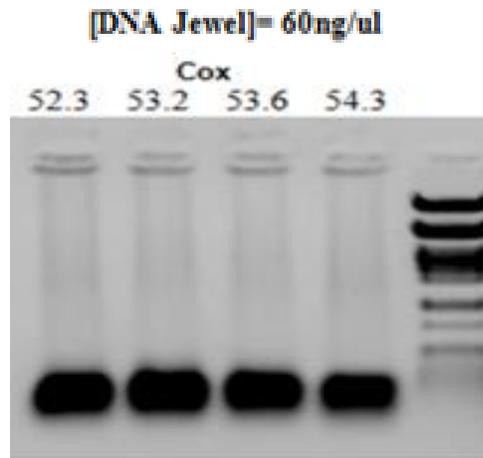


Figura 20: Corrida en gel de agarosa de los iniciadores del gene de referencia *COX*

FUENTE: Edición propia, 2017

4.6 PCR cuantitativo de Transcriptasa Reversa en tiempo real (RT-qPCR)

La derivada de la curva de desnaturalización o curva de melting fue homogénea en las muestras analizadas, confirmando que corresponde a la región amplificada de interés. La temperatura de melting fue de 61.3°C para el gen *iaaH* (figura 21), 81.2°C para el gen *C-prot* (figura 22) y de 77.8° C para el gen de control interno *COX* (figura 23). El umbral de detección fue seleccionado manualmente en el punto donde ocurrió un incremento exponencial de la señal.

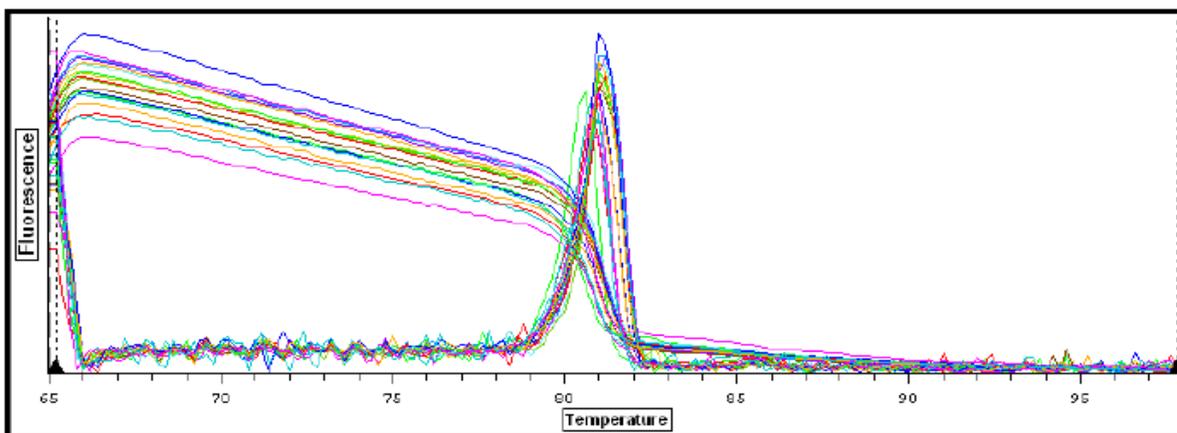


Figura 21: Curva de desnaturalización para los iniciadores que amplifican el gen *iaaH*

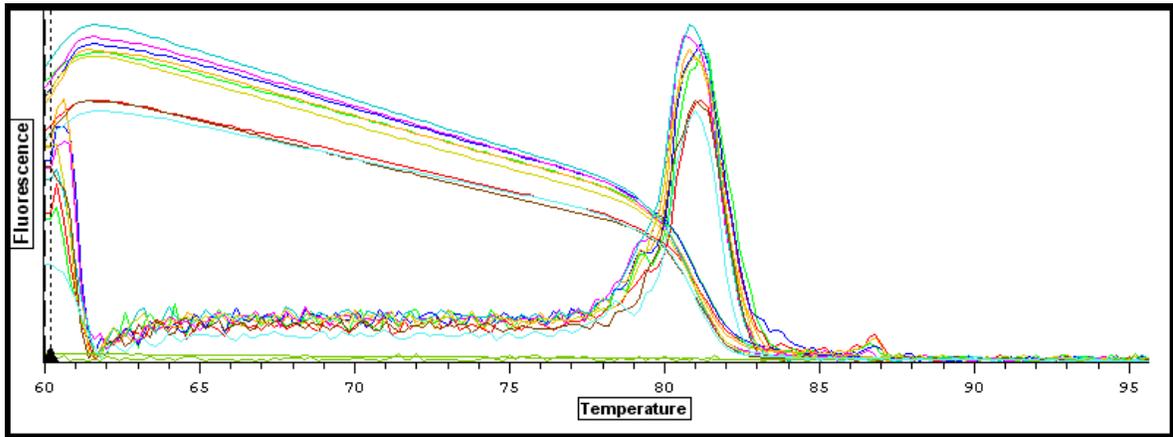


Figura 22: Curva de desnaturalización para los iniciadores que amplifican el gen *C-prot*

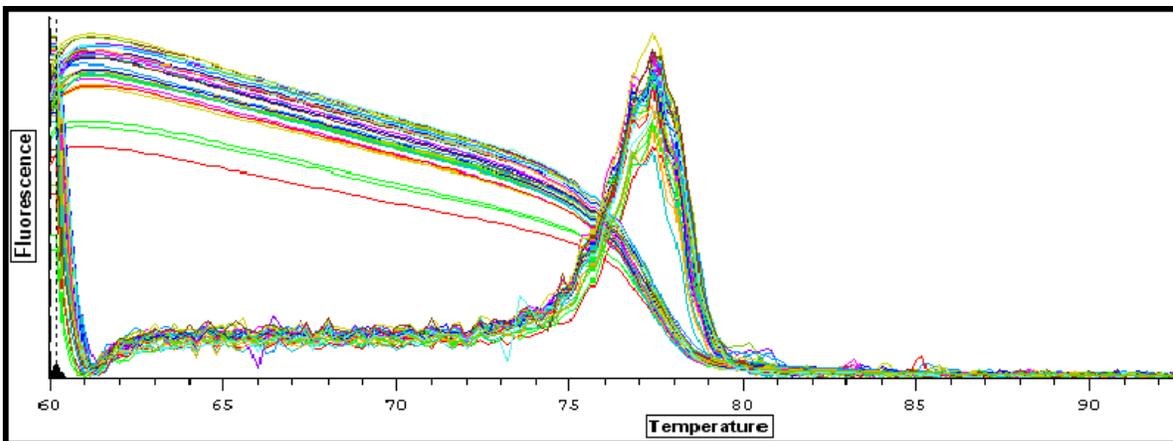


Figura 23: Curva de desnaturalización para los iniciadores que amplifican el gen de referencia *COX*

FUENTE: Edición propia, 2017

La curva estándar generada a partir de diluciones de las muestras fue necesaria para calcular la eficiencia de los iniciadores para los genes *iaaH* y *C-prot* (Figura 24), mostrando valores de 0.849 y 0.95, respectivamente, en el programa REST (la eficiencia del gen de referencia *COX* fue de 0.701).

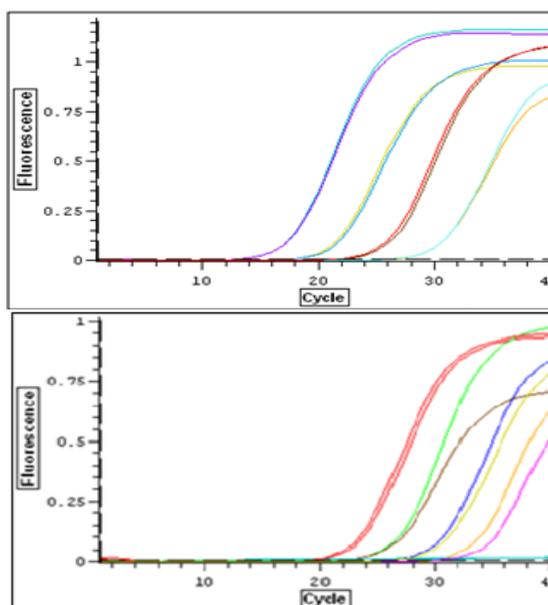


Figura 24: Curva estándar de eficiencia de iniciadores para los genes *iaaH* (arriba) y *C-prot* (abajo)

FUENTE: Edición propia, 2017

4.7 Cuantificación de la expresión relativa y análisis estadísticos con el software REST 2009 (Pfaffl *et al.*, 2002)

Las expresiones de los genes *iaaH* y *C-prot* provenientes de *A. tumefaciens* encontrados en el genoma de *Ipomoea batatas* cv. Jewel fueron cuantificadas mediante RT-qPCR. Las muestras fueron obtenidas cada 15 días por un periodo de 4 meses, realizándose 8 tomas en total.

4.7.1 Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en distintos puntos de tiempo durante el desarrollo de HOJAS en comparación a la planta madre

Tabla 13: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 1 durante el desarrollo de HOJAS en comparación a la planta madre

Toma 1 (2 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	1.27	0.997 - 1.674	0.817 - 1.986	0.062	-
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	1.546	1.143 - 2.102	0.859 - 2.425	0.012	UP

P(H1) – Probabilidad de la hipótesis alternativa de que la diferencia entre las muestras y los grupos control se deba únicamente al azar. TRG – Target. REF - Referencia

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra no es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [$P(H1)=0.062$] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* se expresa en el grupo de muestra en un factor promedio de 1.27 (el rango de S.E es 0.997 - 1.674).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [$P(H1)=0.012$] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es up-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 1.546 (el rango de S.E es 1.143 - 2.102).

Tabla 14: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 2 durante el desarrollo de HOJAS en comparación a la planta madre

Toma 2 (4 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	2.214	1.587 - 3.036	1.261 - 3.977	0.004	UP
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	1.886	1.362 - 2.742	1.083 - 3.349	0.008	UP

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [$P(H1)=0.004$] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es up-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 2.214 (el rango de S.E es 1.587 - 3.036).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [$P(H1)=0.008$] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es up-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 1.886 (el rango de S.E es 1.362 - 2.742).

Tabla 15: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 3 durante el desarrollo de HOJAS en comparación a la planta madre

Toma 3 (6 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	2.937	2.312 - 3.680	2.075 - 4.524	0.001	UP
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	3.359	2.479 - 4.667	2.019 - 6.462	0.001	UP

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.001] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es up-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 2.937 (el rango de S.E es 2.312 - 3.680).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.001] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es up-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 3.359 (el rango de S.E es 2.479 - 4.667).

Tabla 16: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 4 durante el desarrollo de HOJAS en comparación a la planta madre

Toma 4 (8 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	0.571	0.339 - 1.017	0.282 - 1.341	0.029	DOWN
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	1.136	0.667 - 1.990	0.531 - 2.314	0.573	-

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.029] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.571 (el rango de S.E es 0.339 - 1.017).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra no es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.573] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* se expresa en el grupo de muestra en un factor promedio de 1.136 (el rango de S.E es 0.667 - 1.990).

Tabla 17: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 5 durante el desarrollo de HOJAS en comparación a la planta madre

Toma 5 (10 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	0.187	0.077 - 0.453	0.064 - 0.567	0.001	DOWN
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	10.093	7.762 - 13.564	6.080 - 15.869	0.004	UP

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0.001] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.187 (el rango de S.E es 0.077 - 0.453).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.004] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es up-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 10.093 (el rango de S.E es 7.762 - 13.564).

Tabla 18: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 6 durante el desarrollo de HOJAS en comparación a la planta madre

Toma 6 (12 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	3.099	2.403 - 4.184	1.941 - 5.740	0	UP
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	10.545	1.976 - 157.700	1.512 - 221.082	0.001	UP

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es up-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 3.099 (el rango de S.E es 2.403 - 4.184).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.001] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es up-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 10.545 (el rango de S.E es 1.976 - 157.700).

Tabla 19: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 7 durante el desarrollo de HOJAS en comparación a la planta madre

Toma 7 (14 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	2.667	2.267 - 3.379	1.832 - 3.940	0.005	UP
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	185.311	146.341 - 233.074	123.794 - 259.550	0.005	UP

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0.005] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es up-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 2.667 (el rango de S.E es 2.267 - 3.379).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.005] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es up-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 185.311 (el rango de S.E es 146.341 - 233.074).

Tabla 20: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 8 durante el desarrollo de HOJAS en comparación a la planta madre

Toma 8 (16 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	1.407	0.933 - 1.943	0.780 - 2.548	0.087	-
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	1.563	0.902 - 2.780	0.707 - 3.200	0.106	-

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra no es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.087] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* se expresa en el grupo de muestra en un factor promedio de 1.407 (el rango de S.E es 0.933 - 1.943).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra no es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.106] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* se expresa en el grupo de muestra en un factor promedio de 1.536 (el rango de S.E es 0.902 – 2.780).

4.7.2 Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en distintos puntos de tiempo durante el desarrollo de APICES en comparación a la planta madre

Tabla 21: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 1 durante el desarrollo de APICES en comparación a la planta madre

Toma 1 (2 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	0.438	0.352 - 0.537	0.292 - 0.755	0.002	DOWN
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.382	0.208 - 0.597	0.183 - 0.687	0.001	DOWN

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0.002] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.438 (el rango de S.E es 0.352 - 0.537).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.001] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.382 (el rango de S.E es 0.208 - 0.597).

Tabla 22: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 2 durante el desarrollo de APICES en comparación a la planta madre

Toma 2 (4 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	0.194	0.159 - 0.245	0.130 - 0.324	0.001	DOWN
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.258	0.147 - 0.472	0.090 - 0.607	0.001	DOWN

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0.001] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.194 (el rango de S.E es 0.159 - 0.245).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.001] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.258 (el rango de S.E es 0.147 - 0.472).

Tabla 23: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 3 durante el desarrollo de APICES en comparación a la planta madre

Toma 3 (6 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	0.444	0.341 - 0.554	0.316 - 0.773	0	DOWN
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.344	0.192 - 0.538	0.168 - 0.594	0.009	DOWN

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.444 (el rango de S.E es 0.341 - 0.554).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.009] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.344 (el rango de S.E es 0.192 - 0.538).

Tabla 24: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 4 durante el desarrollo de APICES en comparación a la planta madre

Toma 4 (8 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	0.045	0.031 - 0.062	0.025 - 0.093	0	DOWN
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.334	0.180 - 0.537	0.152 - 0.659	0.01	DOWN

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.045 (el rango de S.E es 0.031 - 0.062).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [$P(H1)=0.01$] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.334 (el rango de S.E es 0.180 - 0.537).

Tabla 25: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 5 durante el desarrollo de APICES en comparación a la planta madre

Toma 5 (10 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	0.516	0.108 - 2.216	0.096 - 3.342	0.353	-
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.135	0.074 - 0.212	0.063 - 0.262	0.002	DOWN

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra no es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [$P(H1)=0.353$] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* se expresa en el grupo de muestra en un factor promedio de 0.516 (el rango de S.E es 0.108 - 2.216).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [$P(H1)=0.002$] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.135 (el rango de S.E es 0.074 - 0.212).

Tabla 26: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 6 durante el desarrollo de APICES en comparación a la planta madre

Toma 6 (12 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	0.047	0.031 - 0.065	0.029 - 0.096	0	DOWN
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.022	0.010 - 0.056	0.006 - 0.066	0.001	DOWN

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [$P(H1)= 0$] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.047 (el rango de S.E es 0.031 - 0.065).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [$P(H1)=0.01$] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.022 (el rango de S.E es 0.010 - 0.056).

Tabla 27: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 7 durante el desarrollo de APICES en comparación a la planta madre

Toma 7 (14 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	0.419	0.255 - 0.603	0.217 - 0.872	0	DOWN
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	30.581	17.621 - 50.144	12.729 - 60.786	0.003	UP

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [$P(H1)= 0$] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.419 (el rango de S.E es 0.255 - 0.603).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [$P(H1)=0.003$] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es up-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 30.581 (el rango de S.E es 17.621 - 50.144).

Tabla 28: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 8 durante el desarrollo de APICES en comparación a la planta madre

Toma 8 (16 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	0.372	0.190 - 0.596	0.159 - 0.853	0	DOWN
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	12.185	7.427 - 21.760	3.991 - 28.528	0.002	UP

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [$P(H1)= 0$] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.372 (el rango de S.E es 0.190 - 0.596).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.003] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es up-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 12.185 (el rango de S.E es 7.427 - 21.760).

4.7.3 Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en distintos puntos de tiempo durante el desarrollo de RAICES en comparación a la planta madre

Tabla 29: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 1 durante el desarrollo de RAICES en comparación a la planta madre

Toma 1 (2 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	1.762	1.152 - 2.976	0.868 - 3.721	0.037	UP
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.674	0.496 - 0.879	0.449 - 1.191	0.034	DOWN

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0.037] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es up-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 1.762 (el rango de S.E es 1.152 - 2.976).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.034] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.674 (el rango de S.E es 0.496 - 0.879).

Tabla 30: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 2 durante el desarrollo de RAICES en comparación a la planta madre

Toma 2 (4 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	0.845	0.484 - 1.290	0.411 - 2.203	0.43	-
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.608	0.434 - 0.907	0.376 - 1.366	0.017	DOWN

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra no es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0.43] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* se expresa en el grupo de muestra en un factor promedio de 0.845 (el rango de S.E es 0.484 - 1.290).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.017] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.608 (el rango de S.E es 0.434 - 0.907).

Tabla 31: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 3 durante el desarrollo de RAICES en comparación a la planta madre

Toma 3 (6 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	0.839	0.551 - 1.408	0.516 - 1.563	0.315	-
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.794	0.627 - 0.985	0.545 - 1.238	0.041	DOWN

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra no es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0.315] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* se expresa en el grupo de muestra en un factor promedio de 0.839 (el rango de S.E es 0.551 - 1.408).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.041] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.794 (el rango de S.E es 0.627 - 0.985).

Tabla 32: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 4 durante el desarrollo de RAICES en comparación a la planta madre

Toma 4 (8 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	0.921	0.614 - 1.570	0.471 - 1.905	0.708	-
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.637	0.494 - 0.786	0.443 - 1.055	0.014	DOWN

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra no es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0.708] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* se expresa en el grupo de muestra en un factor promedio de 0.921 (el rango de S.E es 0.614 - 1.570).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.014] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.637 (el rango de S.E es 0.494 - 0.786).

Tabla 33: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 5 durante el desarrollo de RAICES en comparación a la planta madre

Toma 5 (10 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	1.896	1.292 - 3.064	1.047 - 3.740	0.016	UP
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.842	0.623 - 1.091	0.512 - 1.412	0.27	-

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.016] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es up-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 1.896 (el rango de S.E es 1.292 - 3.064).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra no es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.27] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* se expresa en el grupo de muestra en un factor promedio de 0.842 (el rango de S.E es 0.623 - 1.091).

Tabla 34: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 6 durante el desarrollo de RAICES en comparación a la planta madre

Toma 6 (12 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	1.645	1.058 - 2.647	0.945 - 3.320	0.046	-
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.635	0.394 - 0.967	0.357 - 1.243	0.037	DOWN

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra no es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0.046] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* se expresa en el grupo de muestra en un factor promedio de 1.645 (el rango de S.E es 1.058 - 2.647).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.037] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.635 (el rango de S.E es 0.394 - 0.967).

Tabla 35: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 7 durante el desarrollo de RAICES en comparación a la planta madre

Toma 7 (14 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	1.326	0.881 - 2.388	0.589 - 2.936	0.255	UP
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.672	0.558 - 0.849	0.509 - 0.925	0.006	DOWN

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.255] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es up-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 1.326 (el rango de S.E es 0.881 - 2.388).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.006] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.672 (el rango de S.E es 0.558 - 0.849).

* La toma 8 en raíces no salió

4.7.4 Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en distintos puntos de tiempo durante el desarrollo de RAICES TUBEROSAS en comparación a la planta madre

La raíz tuberosa se desarrolla más tarde en el proceso de crecimiento de la planta, por lo que las muestras fueron coleccionadas en la toma 4

Tabla 36: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 4 durante el desarrollo de RAICES TUBEROSAS en comparación a la planta madre

Toma 4 (8 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	0.695	0.474 - 1.008	0.393 - 1.504	0.109	-
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.012	0.009 - 0.014	0.008 - 0.016	0.005	DOWN

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra no es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0.109] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* se expresa en el grupo de muestra en un factor promedio de 0.695 (el rango de S.E es 0.474 - 1.008).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.005] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.012 (el rango de S.E es 0.009 - 0.014).

Tabla 37: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 5 durante el desarrollo de RAICES TUBEROSAS en comparación a la planta madre

Toma 5 (10 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	0.948	0.685 - 1.383	0.593 - 1.944	0.737	-
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.004	0.003 - 0.006	0.003 - 0.009	0.001	DOWN

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra no es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0.737] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* se expresa en el grupo de muestra en un factor promedio de 0.948 (el rango de S.E es 0.685 - 1.383).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.001] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.004 (el rango de S.E es 0.003 - 0.006).

Tabla 38: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 6 durante el desarrollo de RAICES TUBEROSAS en comparación a la planta madre

Toma 6 (12 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	1.266	0.540 - 2.671	0.451 - 4.344	0.498	-
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.023	0.018 - 0.028	0.015 - 0.034	0.001	DOWN

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra no es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0.498] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* se expresa en el grupo de muestra en un factor promedio de 1.266 (el rango de S.E es 0.540 - 2.671).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)=0.001] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.023 (el rango de S.E es 0.018 - 0.028).

Tabla 39: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 7 durante el desarrollo de RAICES TUBEROSAS en comparación a la planta madre

Toma 7 (14 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	8.197	3.503 - 17.023	2.654 - 28.178	0.001	UP
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.006	0.005 - 0.007	0.004 - 0.009	0.002	DOWN

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0.001] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es up-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 8.197 (el rango de S.E es 3.503 - 17.023).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0.002] a un $\alpha=0.05$. El gen *C-prot* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.006 (el rango de S.E es 0.005 - 0.007).

Tabla 40: Expresión relativa de los genes *iaaH* y *C-prot* en la toma 8 durante el desarrollo de RAICES TUBEROSAS en comparación a la planta madre

Toma 8 (16 semanas después del plantado)							
Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Resultado
<i>iaaH</i>	TRG	0.8109	1.534	1.147 - 2.120	0.985 - 2.952	0.028	UP
<i>C-prot</i>	TRG	0.8489	0.002	0.002 - 0.002	0.001 - 0.003	0.003	DOWN

El nivel de expresión del gen *iaaH* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [P(H1)= 0.028] a un $\alpha=0.05$. El gen *iaaH* es up-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 1.534 (el rango de S.E es 1.147 - 2.120).

El nivel de expresión del gen *C-prot* en el grupo de muestra es significativamente diferente a su expresión en el grupo control [$P(H_1) = 0.003$] a un $\alpha = 0.05$. El gen *C-prot* es down-regulated en el grupo de muestra (en comparación al grupo control) por un factor promedio de expresión de 0.002 (el rango de S.E es 0.002 - 0.002).

4.7.5 Representación gráfica de la expresión relativa por tejido de los genes *iaaH* y *C-prot* durante el desarrollo de la planta

Se realizaron los siguientes gráficos (figuras 25 al 28) para una mejor entendimiento de las variaciones de las expresiones de los genes *iaaH* y *C-prot* en los tejidos de la planta durante su desarrollo. El eje vertical muestra los valores de las expresiones relativas (tabla 14 a la 41) de las muestras por tejido (se sacó el \log_2 de los valores de expresión relativa, a excepción de la figura 27, para una mejor visualización) y el eje horizontal las tomas de muestra. La línea horizontal más oscura (en el valor 1) indica la expresión relativa del gen control.

El análisis estadístico de ANOVA y HSD Tuckey determina si la diferencia entre las tomas de muestra son significativas entre sí a un $\alpha = 0.05$. La representación se da mediante letras que determinan las relaciones de significancia (letras iguales indican que no existe una diferencia estadísticamente significativa, letras diferentes indican una diferencia estadística significativa).

Para efectos prácticos, los resultados obtenidos mediante REST como “Up-Regulated” y “Down-Regulated” fueron traducidos al español como “Sobreexpresión” y “Menor expresión” respectivamente.

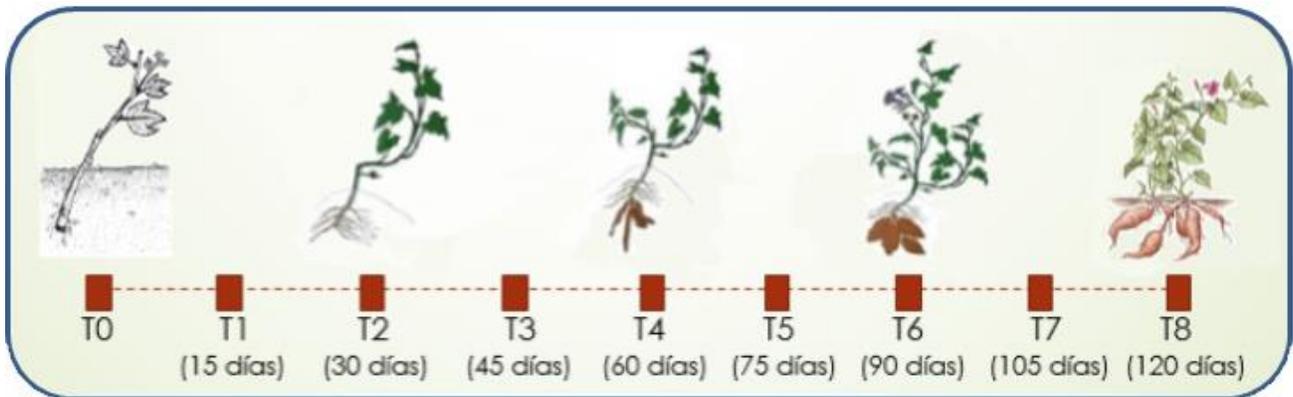
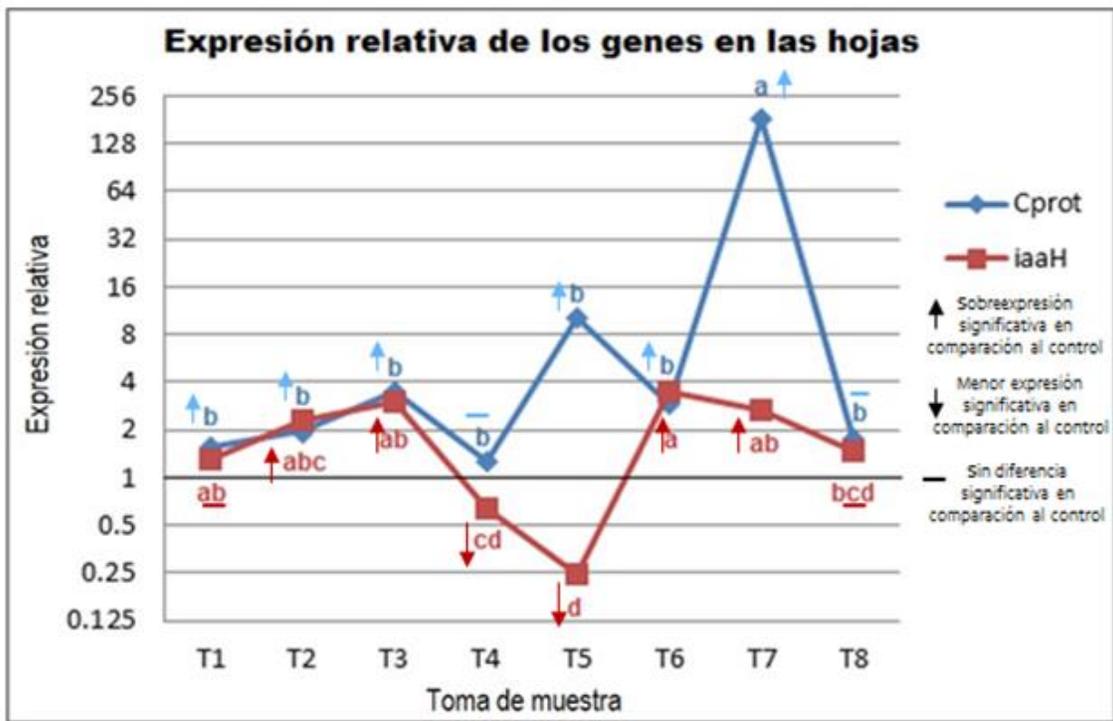


Figura 25: Expresiones relativas de los genes *iaaH* y *C-prot* en hojas

FUENTE: Edición propia, 2017

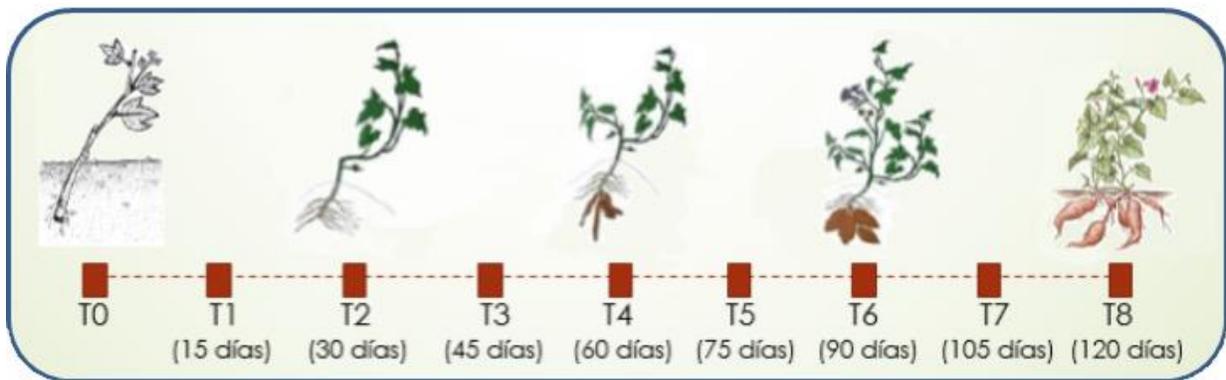
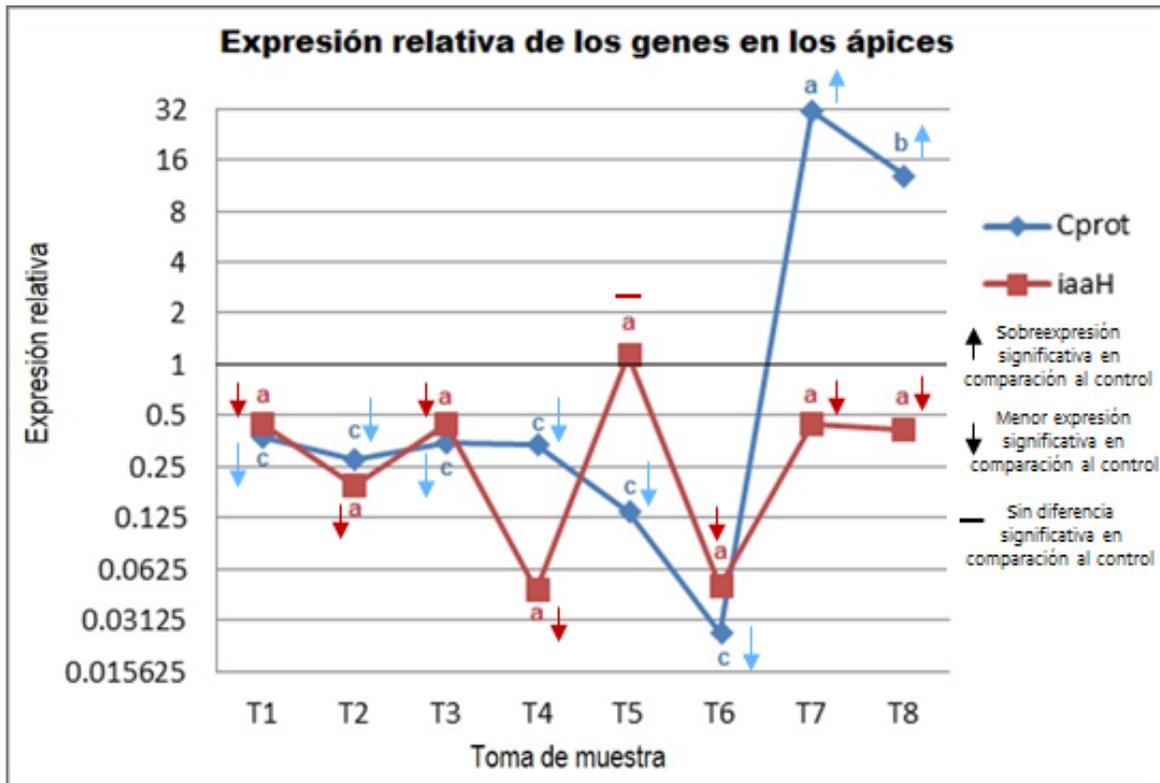


Figura 26 – Expresiones relativas de los genes *iaaH* y *C-prot* en ápices

FUENTE: Edición propia, 2017

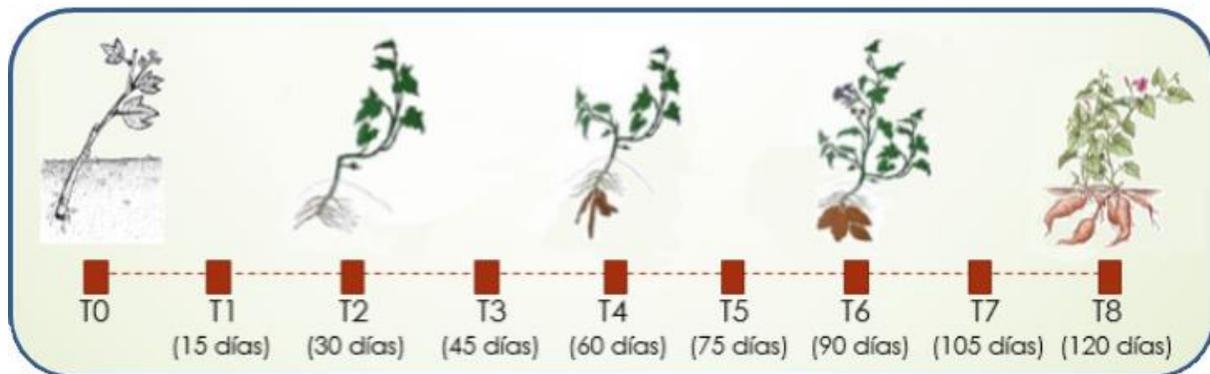
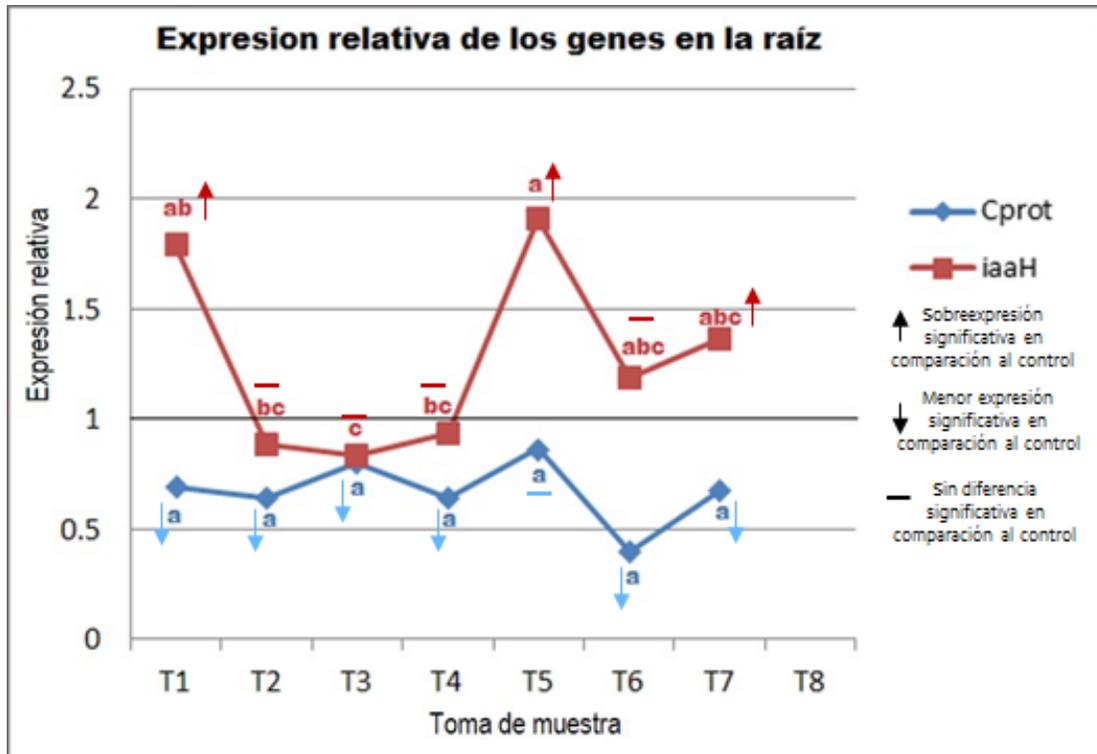


Figura 27 – Expresiones relativas de los genes *iaaH* y *C-prot* en raíz

FUENTE: Edición propia, 2017

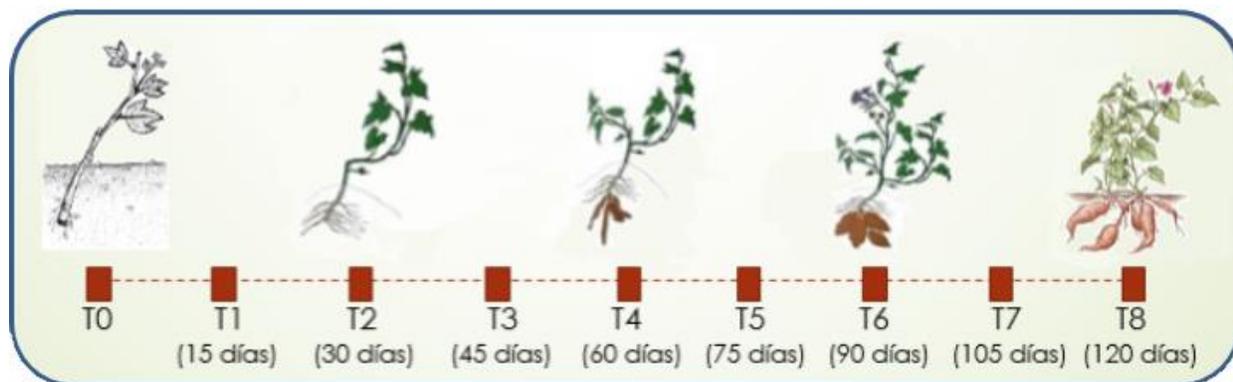
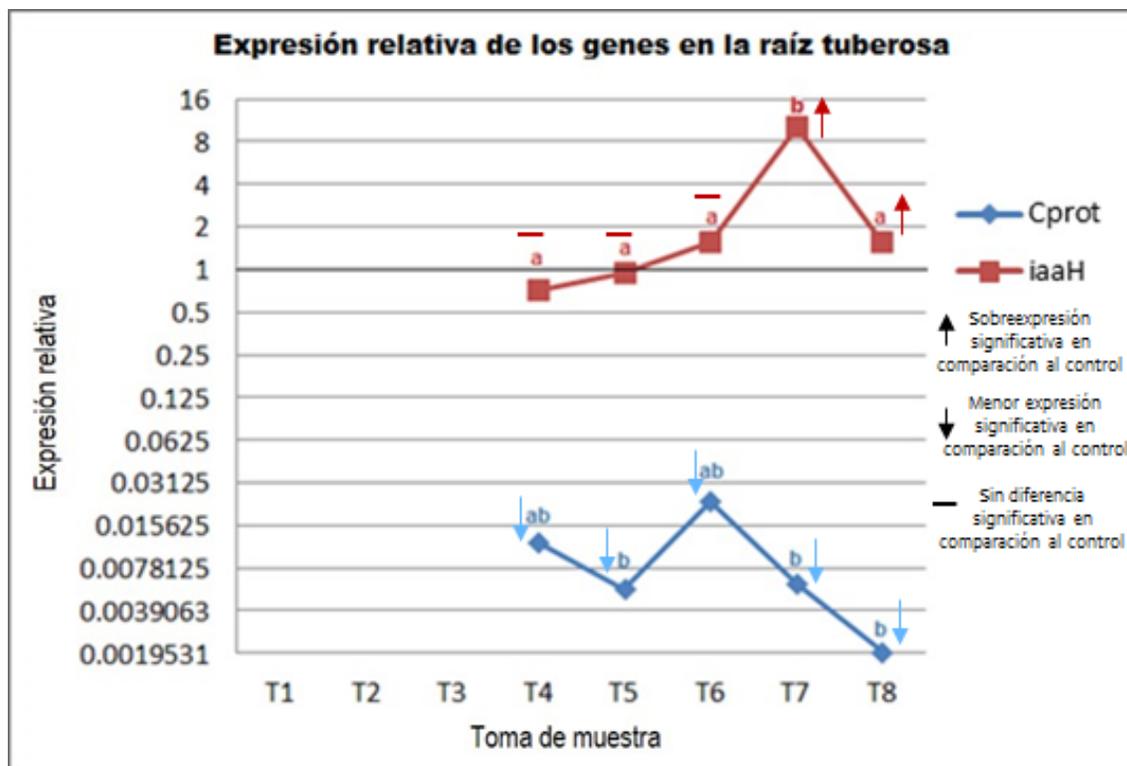


Figura 28: Expresiones relativas de los genes *iaaH* y *C-prot* en raíz tuberosa

FUENTE: Edición propia, 2017

El gen *C-prot* fue significativamente sobreexpresado durante casi todo el desarrollo de la planta a excepción de la cuarta y octava toma de muestra, en las cuales no existió una diferencia significativa con la expresión de la planta madre control. Además, no hubo diferencias significativas entre las expresiones en los distintos periodos a excepción del periodo siete, cuando la expresión aumentó considerablemente. Estos resultados se explicarían por la supuesta función que cumpliría el gen *C-prot* durante la inducción de brotes, que es una etapa en la cual la planta trata de tomar y maximizar todos sus nutrientes para el crecimiento de la misma. Contrariamente, la expresión del gen *iaaH* en los tejidos de hoja fue más variable, mostrándose una sobreexpresión significativa entre los periodos dos y tres en comparación con la planta madre control (en el primer periodo no tuvo una diferencia significativa con la expresión de la planta madre control), en las tomas cuatro y cinco fueron hubo una menor expresión significativa, en las tomas cinco y seis una sobreexpresión significativa (teniendo una expresión muy alta en la toma siete como en el caso de *C-prot*) y en la última toma no existió una diferencia significativa con la expresión de la planta madre control. Esta dinámica en la expresión del gen *iaaH* que produce la auxina IAA se puede deber a muchos factores, se conoce que las auxinas contribuyen a la formación de órganos (Simon and Petrášek, 2011) y son fundamentales y necesarias para coordinar el desarrollo de órganos emergentes como las hojas (Benkova *et al.*, 2003). Es posible que la mayor expresión de *iaaH* se deba a que influye en el desarrollo del diseño arquitectónico de la hoja, o podría estar mediando la señalización necesaria para el crecimiento de la planta (Friml, 2003).

A comparación de la planta madre control, la expresión relativa del gen *C-prot* en el ápice de la planta fue menor entre las tomas uno y seis. Sin embargo, en las tomas siete y ocho hubo una sobreexpresión significativa, obteniéndose valores muy altos. Se sabe que la sobreexpresión del gen *C-prot* en tabaco produce retraso en el crecimiento de la planta (Lacroix *et al.*, 2014), lo que explicaría los bajos niveles de expresión durante el inicio y la mitad del desarrollo, cuando la planta se dedica básicamente a crecer, hasta llegar a etapas finales de su desarrollo donde puede retrasar su crecimiento, lo cual se estaría consiguiendo con una mayor producción de *C-prot*.

El gen *iaaH* codifica la enzima indol-3-acetamida hidrolasa, una de las enzimas clave en la producción de IAA a través de la vía indol-3-acetimida (IAM) (Figura 6, Mano et al., 2009), por lo tanto, una baja expresión de este gen ayudaría a controlar la síntesis y la concentración de IAA para un crecimiento óptimo de la planta. La expresión del gen *iaaH* fue significativamente menor durante casi todo el desarrollo de la planta (salvo en la toma cinco que no hubo una diferencia significativa con el control). La disminución significativa de la expresión de *iaaH* en el tejido apical se explicaría como una respuesta de la planta para intentar limitar el exceso de producción de ácido indol-3-acético (IAA), que podría distorsionar el equilibrio hormonal necesario para la dominancia apical y posterior crecimiento de la planta.

En la raíz, la expresión del gen *C-prot* fue significativamente menor en comparación con la planta madre control durante todo el desarrollo de la planta (a excepción del periodo cinco en la que no tuvo una diferencia significativa). Esto concuerda con los estudios de Lacroix *et al.* (2014) donde la sobreexpresión de *C-prot* (en tabaco) no afectó en nada la morfología de las raíces, por lo que el gen *C-prot* no tendría un efecto en el desarrollo de la raíz. No obstante, la expresión del gen *iaaH* en la raíz fue más cambiante, en las tomas uno, cinco y siete hubo una sobreexpresión significativa, mientras que en las tomas dos, tres, cuatro y seis no hubo una diferencia significativa en comparación con la planta madre control. Altas concentraciones de auxinas en las raíces inhiben el alargamiento de la raíz y promueven el inicio del desarrollo de la raíz adventicia (Ivanchenko *et al.*, 2010), también se ha observado que cantidades determinadas de auxinas estimulan el desarrollo de raíces en plantas (Xiangdong and Nicholas, 2003). En el desarrollo de una planta existe una dinámica compleja en las expresiones genéticas, por momentos la planta requiere de un mayor crecimiento de sus raíces para poder obtener mayor cantidad de agua y nutrientes. Los resultados de este trabajo sugieren una mayor expresión de *iaaH* en el tejido de raíz en la etapa inicial y final, que son los puntos críticos en desarrollo natural del camote.

En la raíz tuberosa, la expresión relativa del *C-prot* fue significativamente menor en todas las tomas en comparación con la planta madre control, con un valor muy cercano a 0. Esta

baja expresión puede deberse a las mismas causas responsables de la escasa expresión en el tejido de raíz, ya que la sobreexpresión del gen *C-prot* no tiene ninguna influencia en la parte terrestre de la planta, específicamente en la raíz (Lacroix *et al.*, 2014), y no estaría interfiriendo en el desarrollo normal de la raíz tuberosa. En el caso del gen *iaaH*, en las tomas cuatro, cinco y seis no hubieron diferencias significativas en comparación con la planta madre control, pero en las tomas siete y ocho se encontró una sobreexpresión significativa. En el camote, la formación de raíces tuberosas y su desarrollo es un proceso complejo, caracterizado por el cese en la elongación de raíces, la aparición de cámbium vascular secundario, el incremento de crecimiento radial por aumentos en las tasas de división y expansión celular relacionados a las deposiciones masivas de almidón y proteínas de almacenamiento como la esporamina. Este proceso es el resultado de la interacción de fitohormonas como las auxinas, citoquininas, ácido jasmónico, ácido absísico y otros involucrados en el crecimiento de raíces (Ravi *et al.*, 1999), lo que podría explicar el aumento progresivo en la expresión de *iaaH* observado en el presente trabajo.

La variación observada en la expresión de estos dos genes, principalmente el *iaaH*, implicaría que podrían estar afectando o interviniendo directamente en el desarrollo de la planta.

V. CONCLUSIONES

Se diseñaron iniciadores específicos para los genes *iaaH* y *C-prot* y se optimizó su uso en la determinación de los niveles de expresión relativa de estos genes en *Ipomoea batatas L.* cultivar Jewel.

Los genes *iaaH* y *C-prot* provenientes de *A. tumefaciens* y presentes en el genoma del *Ipomoea batatas L.* cultivar Jewel, presentan diversas variaciones en la expresión durante el desarrollo de la planta.

El gen *iaaH* en el tejido del ápice es menos expresado durante casi todo el desarrollo de la planta, en el tejido de raíz es sobreexpresado al inicio y en la parte media del desarrollo, en el tejido de raíz reservante es sobreexpresado durante el último mes del desarrollo, y en el tejido de hoja presenta una variación en la expresión durante todas las etapas de desarrollo.

El gen *C-prot* por su parte, es menos expresado en los tejidos de raíz y raíz reservante durante todo el desarrollo de la planta, otro tejido que presenta un comportamiento similar es el del ápice, que es menos expresado durante casi todo el desarrollo a excepción del último mes, cuando su producción aumenta considerablemente. En el tejido de hoja, el gen *C-prot* fue sobreexpresado durante todo el desarrollo de la planta.

VI. RECOMENDACIONES

Analizar el efecto directo de la expresión de los genes del T-DNA en las características físicas de la planta mediante el silenciamiento completo de los genes de T-DNA de camote y hacer un seguimiento de los cambios físicos en comparación con las plantas de control (genes de T-DNA no silenciado). Los genes del T-DNA encontrados en el camote han debido evolucionar con la planta, y esta puede haber desarrollado rutas alternativas para metabolizar triptófano mediante auxinas, se recomienda verificar si las sobreexpresiones o menores expresiones del gen *iaaH* halladas influyen en el balance de triptófano necesario para el desarrollo de la planta o pueden ser respuestas a diversos factores de estrés.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Akaba, S.; Seo, M.; Dohmae, N.; Takio, K.; Sekimoto, H.; Kamiya, Y.; Furuya, N.; Komano, T.; Koshiha, T. (1999). Production of homo-and hetero-dimeric isozymes from two aldehyde oxidase genes of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biochemistry* 126, 395–401
- Andersson, J. O. (2005). Lateral gene transfer in eukaryotes. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 1182–1197
- Austin, D.F. (1977). Hybrid polyploids in *Ipomoea* section *Batatas*. *J. Hered.* 68:259-260.
- Austin, D.F. (1983). Variability in sweet potato in America. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci., Trop. Region* 27(B):15-26.
- Austin, D.F. (1988). The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweet potatoes and related wild species. In: Exploration, maintenance and utilization of sweetpotato genetic resources. *Report of the First Sweet Potato Planning Conference 1987*. International Potato Center, Lima, Peru, 27-59.
- Bak, S.; Nielsen, H. L.; Halkier, B. A. (1998). The presence of CYP79 homologues in glucosinolate-producing plants shows evolutionary conservation of the enzymes in the conversion of amino acid to aldoxime in the biosynthesis of cyanogenic glucosides and glucosinolates. *Plant Molecular Biology* 38, 725–734
- Barry, G.F.; Rogers S.G.; Fraley, R.T., Brand, L. (1984). Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4776–4780
- Benkova, E.; Michniewicz, M.; Sauer, M.; Teichmann, T.; Seifertová, D.; Jürgens, G.; Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115:591–602

- Bohac, J.; Austin, D.; Jones, A. (1993). Discovery of wild tetraploid sweetpotatoes. *Economic Botany* 47(2):193-201.
- Bradshaw, J.E. (2010). Root and Tuber Crops. *Handbook of plant breeding*. Springer, New York, 95-97.
- Buteler, M.I.; Jarret, R.L.; La Bonte D.R. (1999). Sequence characterization of microsatellites in diploid and polyploid Ipomoea. *Theoretical and Applied Genetics* 99:123-132.
- Chen, K.; Dorlhac de Borne, F.; Szegedi, E.; Otten, L. (2014). Deep sequencing of the ancestral tobacco species *Nicotiana tomentosiformis* reveals multiple T-DNA inserts and a complex evolutionary history of natural transformation in the genus *Nicotiana*. *Plant J.* 80(4):669–682
- Cheng, Y.; Dai, X.; Zhao, Y. (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *genes and Development* 20, 1790–1799
- Cheng, Y.; Dai, X.; Zhao, Y. (2007). Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryo genesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19, 2430–2439
- Chilton, M. D.; Drummond, M. H.; Merio, D. J.; Sciaky, D.; Montoya, A. L.; Gordon, M. P.; Nester, E. W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11: 263-267.
- Costantino, P.; Capone I.; Cardarelli, M.; De Paolis, A.; Mauro, M.L.; Trovato M. (1994). Bacterial plant oncogenes: the rol genes' saga. *Genetica*; 94(2-3): 203-11.
- Deng, W.; Chen, L.; Wood, D.W.; Metcalfe, T.; Liang X.; Gordon, M.P.; Comai, L.; Nester, E.W. (1998). *Agrobacterium* VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:7040-45.
- Denker, E.; Baptiste, E.; Le Guyader, H.; Manuel M.; Rabet N. (2008). Horizontal gene transfer and the evolution of cnidarian stinging cells. *Current Biology* Vol 18(18): 1-2.
- Dessaux, Y.; Petit, A.; Tempe, J.; Demarez, M.; Legrain, C.; Wiame, J. M. (1986). Arginine catabolism in *Agrobacterium* strains: role of the Ti plasmid. *J Bacteriol.* 166: 44-50.

- Diop, A.; Calverley, D. (2008). Storage and processing of roots and tubers in the tropics. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
- Ellis, J. (1982). Promiscuous DNA-chloroplast genes inside plant mitochondria. *Nature* 299:678-79
- Ellis, J.G.; Ryder, M.H; Tate, M. E. (1984). *Agrobacterium tumefaciens* TR-DNA encodes a pathway for agropine biosynthesis. *Mol Gen Genet* 195: 466-473.
- Escobar, M.; Dandekar, A. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science* 8 (8): 380-386.
- FAOSTAT. FAO Statistical Database [En línea]. (2014). <http://faostat.fao.org>
- Friesen, T. L.; Stukenbrock, E. H.; Liu, Z. H. (2006). Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nat. Genet.* 38: 953–956.
- Friml, J. (2003). Auxin transport - shaping the plant Current Opinion in Plant Biology 6:7-12
- Furner, I.; Huffman, G.; Amasino, R.; Garfinkel D.; Gordon M.; Nester E. (1986). An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. *Nature* 319: 422–427.
- Gelvin, S. B. (2009). *Agrobacterium* in the Genomics Age. *Plant Physiology* 150: 1665–1676.
- Ghai, J.; Das, A. (1989). The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid encodes a DNA-relaxing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3109-3113.
- Gladyshev, E. A.; Meselson, M.; Arkhipova, I.R. (2008). Massive Horizontal Gene Transfer in Bdelloid Rotifers. *Science* **320**:1210-1213.
- Gogarten, J.P.; Doolittle W.F.; Lawrence J.G. (2002). Prokaryotic Evolution in Light of Gene Transfer. *Mol. Biol. Evol.* 19(12): 2226–2238.
- Gupta, R.S. (2000). The natural evolutionary relationships among prokaryotes. *Critical Reviews in Microbiology* **26**:111-131.
- Hamilton, R. H.; Fall, M. Z. (1971). The loss of tumor initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation at high temperature. *Experientia* 27:229-230.
- Heinekamp, T.; Strathmann, A.; Kuhlmann, M.; Froissard, M.; Muller, A.; Perrot-Rechenmann, C.; Dröge-Laser, W. (2004). The tobacco bZIP transcription factor

- BZI-1 binds the GH3 promoter in vivo and modulates auxin-induced transcription. *Plant J.* **38**: 298–309.
- Hong, S.B.; Hwang, I.; Dessaux, Y.; Guyon, P.; Kim, K.S.; Farrand, S.K. (1997). A T-DNA gene required for agropine biosynthesis by transformed plants is functionally and evolutionarily related to a Ti plasmid gene required for catabolism of agropine by *Agrobacterium* strains. *J Bacteriol* **179**: 4831–4840.
- Hotopp, J.C.; Clark M.E.; Oliveira, D.; Foster, J.M.; Fischer, P.; Muñoz, M. C.; Giebel, J.D.; Kumar N.; Ishmael, N.; Wang, S.; Ingram J.; Nene, R.V.; Shepard, J.; Tomkins, J.; Richards, S.; Spiro, D.J.; Ghedin, E.; Slatko, B.E.; Tettelin, H.; Werren, J. H. (2007). Widespread Lateral Gene Transfer from Intracellular Bacteria to Multicellular Eukaryotes. *Science*. **317**:1753 – 1756.
- Huamán, Z. (1992). Systematic botany and morphology of the Sweetpotato plant. *Technical Information Bulletin* 25. International Potato Center, Lima- Perú. Pp. 2-6.
- Huang, J.C.; Sun, M. (2000). Genetic diversity and relationship of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulácea) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1050–1060.
- Huffman, G.; White, F.; Gordon, M.; Nester, E. (1984). Hairy-root-inducing plasmid: physical map and homology to tumor-inducing plasmid. *Journal of Bacteriology*, 157:269-276
- Intrieri, M.C.; Buiatti, M. (2001). The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana*. *Mol. Phylogenet. Evolu.*, 20: 100-110.
- Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) (2009). <http://www.inia.gob.pe/>
- Ivanchenko, M.G.; Mendivil, S. N.; Dubrovsky, J.G. (2010). Auxin-induced inhibition of lateral root initiation contributes to root system shaping in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 64:740–752
- Jarret, R.L.; Gawel, N.; Whittemore A. (1992). Phylogenetic relationships of the sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 117(4):633-637.
- Jarret R.L.; Austin D.F. (1994). Genetic diversity and systematic relationships in sweetpotatoes [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] and related species as revealed by RAPD analyses. *Genet. Res. Crop Evol.* 41:165-173.

- Jin, S.; Roitsch, T.; Ankenbauer, R. G.; Gordon, M. P.; Nester, E. W. (1990). The VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* is autophosphorylated and is essential for vir gene regulation. *J Bacteriol.* 172: 525-530.
- Juhas, M.; Van der Meer, J. R.; Gaillard, M.; Harding, R., M.; Hood, D.; Crook, D. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev* 33: 376–393
- Kado, C. I. (2009). Horizontal gene transfer: sustaining pathogenicity and optimizing host–pathogen interactions. *Mol. Plant Pathol.* 10: 143–150
- Karyeija, R.; Gibson, R.; Valkonen, J. (1998). The significance of sweet potato feathery mottle virus in subsistence sweetpotato production in Africa. *Plant Dis.* 82:4-15.
- Kelly, B.; Vespermann, A.; Bolton, D. J. (2009). Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food Chem. Toxicol.* 47: 969–977
- Kyndt, T.; Quispe, D.; Zhai, H.; Jarret, R.; Ghislain, M.; Liu, Q.; Gheysen, G.; Kreuze, J. (2015). The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 112:5844-5849
- Klee H. J.; Horsch R. B.; Hinchee M. A.; Hein M. B.; Hoffmann N. L.(1987). The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. *Genes Dev.* 1: 86-96.
- Kleine, T.; Maier, U.; Leister, D. (2009). DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 115–138
- Koonin, E. V.; Makarova, K., S.; Aravind, L. (2001). Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 709–742.
- Körber, H.; Strizhov, N.; Staiger, D.; Feldwisch, J.; Olsson, O.; Sandberg, G.; Palme, K.; Schell, J.; Koncz, C. (1991). T-DNA gene 5 of *Agrobacterium* modulates auxin response by autoregulated synthesis of a growth hormone antagonist in plants. *EMBO J* 10: 3983–3991.
- Kurland, C.G.; Canback, B.; Berg, O.G. (2003). Horizontal gene transfer: a critical review. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100:9658-62.

- Lacroix, B.; Gizatullina, D.; Babst, B.; Gifford, A.; Citovsky, V. (2014). Agrobacterium T-DNA-encoded protein Atu6002 interferes with the host auxin response. *Mol. Plant Pathol.* 15(3):275-283
- Lebot, V. (2009). Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids. *Crop Prod. Sci. Hort.* 17:413
- Leemans, J.; Deblaere, R.; Willmitzer, L.; DeGreve, H.; Hernalsteens, J. P.; Van Montagu, M.; Schell, J. (1982). Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls. *EMBO J.* 1: 147-152.
- Llop, P. (2003). Caracterización molecular de la pérdida del poder patógeno en *Agrobacterium tumefaciens* Universitat De Valencia Servei De Publicacions.
- Lutova, L. A.; Provorov, N. A.; Tikhodeev, O. N.; Tikhonovich, I. A.; Khodzhaiova, L. T.; Shishkova, S. O. (2000). *Genetika razvitiya rastenii* (Genetics of Plant Development), St. Petersburg: Nauka, pp: 258-320.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. (1999). Brock Biología de los Microorganismos. 8va. Edición. *Editorial Prentice Hall Iberia*, Madrid. 734-736.
- Maiden, M.C. (1998). Horizontal Genetic Exchange, Evolution, and Spread of Antibiotic Resistance in Bacteria. *Clin. Infec. Dis.* 27(1): 12–20.
- Matthysse, A. (1983). Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. *J Bacteriol.* May; 154(2): 906–915.
- McCullen, C.; Binns, A. (2006). Agrobacterium tumefaciens and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:101–127
- Messens, E.; Lenaerts, A.; Van Montagu, M.; Hedges, R.W. (1985). Genetic basis for opine secretion from crown gall tumor cells. *Mol Gene Genet.* 199-344.
- Meyer, A.D.; Ichikawa, T.; Meins, F. Jr. (1995). Horizontal gene transfer: regulated expression of a tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes rol C* gene. *Mol Gen Genet.* 249(3): 265-73.
- Natarajan, S.; Renczesova, V.; Kukuckova, M.; Stuchlik, S.; Turna, J. (2005). Genetically modified organisms from the point of view of horizontal gene transfer. *Biologia* 60: 633–639

- Nikoh, N.; Tanaka, K.; Shibata, F.; Kondo, N.; Hizume, M.; Shimada, M.; Fukatsu, T. (2008). Wolbachia genome integrated in an insect chromosome: Evolution and fate of laterally transferred endosymbiont genes. *Genome Res.* **18**: 272-280.
- Ochman, H.; Lawrence, J.G.; Groisman, E.A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299-304.
- Offringa, I.; Melchers, L.; Regensburg-Tuink, A.; Costantino, P.; Schilperoort, R. A.; Hooykaas, P. J. J. (1986). Complementation of *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing aux mutants by genes from the TR-region of the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizo genes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **83**:6935–6939
- Otten, L.; Salome, J.; Helfer, A.; Schmidt, J.; Hamman, P.; Ruffray, P. (1999). Sequence and functional analysis of the left-hand part of the T-region from the nopaline-type Ti plasmid pTiC58. *Plant Mol. Biol.* **41**: 765-776.
- Park, W. J.; Kriechbaumer, V.; Moller, A.; Piotrowski, M.; Meeley, R. B.; Gierl, A.; Glawischnig, E. (2003). The nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Plant Physiology*. **133**, 794–802
- Peralta, E. G.; Ream, L. W. (1985). T-DNA border sequences required for crown gall tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **82**:5112-6.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Res.* **29**:e45.
- Pfaffl, M.W.; G.W. Horgan, and L. Dempfle. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **30**:e36.
- Porter, J.R. 1991. Host range and implications by *Agrobacterium rhizogenes*. *Critical Reviews in Plant Sciences* **10**:387-421.
- Rajapakse S.; Nilmalgoda, D.S.; Molnar, M.; Ballard E.R.; Austin F.D.; Bohac R.J. (2004). Phylogenetic relationships of the sweet potato in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) based on b-amylase gene sequences, *Mol. Phylogenet. Evol.* **30**: 623–632.
- Ravi, V.; Indira, P. (1999). Crop physiology of sweet potato. *Horticultural reviews* Vol. **23**, pp 277–316.

- Romanov, A.; Aksenova, N. P.; Konstantinova, T. N.; Golyanovskaya, S.A.; Kossmann, J.; Willmitzer, L. (2000). Effects of Indole-3-Acetic Acid and Kinetin on Tuberation Parameters of Different Cultivars and Transgenic Lines of Potato *In Vitro*, *Plantgrowth Regul.*, 32: 245–251
- Rosewich, U., L.; Kistler, H., C. (2000). Role of horizontal gene transfer in the evolution of fungi. *Annu Rev Phytopathol* 38:325–363
- Schmitz-Esser, S.; Linka, N.; Collingro, A.; Beier, C. L.; Neuhaus, H. E.; Wagner, M.; Horn, M. (2004). ATP/ADP translocases: a common feature of obligate intracellular amoebal symbionts related to chlamydiae and rickettsiae. *J. Bacteriol.* 186, 683-691
- Scott, G.; Maldonado, L. (1999). CIP Sweet potato Facts. A compendium of key figures and analysis for 33 important sweet potato – producing countries. International Potato Center (CIP). Lima, Perú. Disponible en <http://www.cipotato.org/new/sweetpfacts/swtspfact1.htm>
- Sciaky, D.; Montoya, A.; Chilton M. (1978). Fingerprints of Agrobacterium Ti plasmids. *Plasmid* 1(2):238–253.
- Schroder, G.; Waffenschmidt, S.; Weiler E.W.; Schroder, J. (1984). The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. *Eur J Biochem* 138: 387–391.
- Shaw, C.H.; Watson, M.D.; Carter, G.H. (1984). The right hand copy of the nopaline Ti plasmid 25 pb repeat is required for tumor formation. *Nucleic Acids Res.* 12:6031-6041.
- Sheng, J.; Citovsky, V. (1996). Agrobacterium-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *Plant cell.* 8:1699-1710.
- Simon, S.; Petrášek, P. (2011). "Why plants need more than one type of auxin". *Plant Science* 180 (3): 454–460
- Spano, L.; Pomponi, M.; Costantino, P.; Van Slogteren, G.; Tempé, J. (1982). Identification of T-DNA in the root-inducing plasmid of the agropine type *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plant Mol Biol* 1:291–300.
- Stachel, S. E.; Timmerman, B.; Zambryski, P. (1986). Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Nature* 322: 706-12.

- Stepanova, A. N.; Robertson-Hoyt, J.; Yun, J.; Benavente, L. M.; Xie, D. Y.; Dolezal, K.; Schlereth, A.; Jurgens, G.; Alonso, J. M. (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133, 177–191
- Sugawara, S.; Hishiyama, S.; Jikumaru, Y.; Hanada, A.; Nishimura, T.; Koshiba, T.; Zhao, Y.; Kamiya, Y.; Kasahara, H. (2009). Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA 106, 5430–5435
- Suzuki, K.; Yamashita, I.; Tanaka, N. (2002). Tobacco plants were transformed by *Agrobacterium rhizogenes* infection during their evolution. *The Plant Journal*. 32(5): 775-87.
- Taning, C.; Gheysen, G. (2011). Molecular analysis of *Agrobacterium* spp. T-DNA insertions in sweet potato (*Ipomoea batatas*) lines. Univesiteit Gent.
- Tao, Y.; Ferrer, J. L.; Ljung, K. (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* 133, 164–176
- Tempé, J.; Goldmann, A. (1982). Occurrence and biosynthesis of opines. En: Molecular biology of plant tumours. Ed. G. Khal and J. S. Schell. *Academic Press Inc.* London LTD. Capítulo 15: 428-449.
- Tepfer, D. (1984). Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*- sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* 37:959-967
- Thomashow, L. S.; Reeves, S.; Thomashow, M. F. (1984). Crown gall onco genesis: evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indoleacetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA 81, 5071–5075
- Thomashow, M. F.; Hugly S.; Buchholz, W.; Thomashow, L. S. (1986). Molecular basis for the auxin-independent phenotype of Crown gall tumor tissues. *Science* 231, 616–618
- Tichopad, A.; Dilger, M.; Schwarz, G.; Pfaffl M.W. (2003). Standardised determination of real-time PCR efficiency from a single reaction setup. *Nucleic Acids Research* 31(20):e122
- Tzfira, T.; Citovsky, V. (2003). The *Agrobacterium*-Plant Cell Interaction. Taking Biology Lessons from a Bug. *Plant Physiology* 133:943–947.

- Van Onckelen, H.; Prinsen, E.; Inzé, D.; Rüdelsheim, P.; Van Lijsebettens, M.; Follin, A.; Schell, J.; Van Montagu, M.; De Greef, J. (1986). *Agrobacterium* T-DNA gene 1 codes for tryptophan 2-monooxygenase activity in tobacco crown galls cells. *FEBS Lett.* 198, 357-360.
- Valderrama, A.; Arango, R.; Afanador, L. (2005). Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: “Ingeniería Genética Natural Aplicada”. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín.* Vol 58. No. 1. p 2569-2585
- Veena, V.; Taylor, C.G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **43**:383-403.
- Wang, K.; Herrera-Estrella, L.; Van Montagu, M.; Zambryski, P. (1984). Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell* 38: 455-462.
- Weeden, N. (1981). Genetic and biochemical implications of the endosymbiotic origin of the chloroplast. *J. Mol. Evol.* 17:133-39
- Weller, S.A.; Stead, D.E.; Young, J.P. (2004). Acquisition of an *Agrobacterium* Ri plasmid and pathogenicity by other alpha-Proteobacteria in cucumber and tomato crops affected by root mat. *Appl. Envir. Microb.* 70:2779-2785.
- White, F.; Garfinkel, D.; Huffman, G.; Gordon, M.; Nester, E. (1983). Sequence homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants. *Nature* 301:348–350.
- Willmitzer, L.; Dhaese, P.; Schreier, P. H.; Schmalenbach, W.; Van Montagu, M.; Schell, J. (1983). Size, location and polarity of T-DNA-encoded transcripts in nopaline crown gall tumors; common transcripts in octopine and nopaline tumors. *Cell* 32: 1045-1056
- Woodward, A. W.; Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* 95, 707–735
- Woolfe, J.A. (1992). Sweetpotato: an untapped food resource. *Cambridge University press*, UK 118-187.
- Xiangdong F.; Nicholas, P. H. (2003). Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature*, 421: 740-743
- Yamamoto, Y.; Kamiya, N.; Morinaka, Y.; Matsuoka, M.; Sazuka, T. (2007). Auxin biosynthesis by the YUCCA genes in rice. *Plant Physiology* 143, 1362–1371

- Yanofsky, M. F.; Porter, S. G.; Young, C.; Albright, L. M.; Gordon, M. P.; Nester, E. W. (1986). The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. *Cell* 47: 471-477.
- Yen, D.E. (1982). Sweet potato in historical perspective. In: Villareal, R.L. and T.D. Griggs (eds.). Sweet potato, Proceedings of First International Symposium. AVRDC Publ. No. 82-172, Tainan, Taiwan. Pp. 17–30.
- Zaenen, I.; Van Larebeke, N.; Van Montagu, M.; Schell, J. (1974). Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. *J Mol Biol.* 86: 109-127.
- Zambryski, P.; Depicker, A.; Kruger, K.; Goodman, H. M. (1982). Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. *J Mol Appl Genet.* 1: 361-370.
- Zambryski, P.; Joos, H.; Genetello, C.; Leemans, J.; Van Montagu, M.; Schell, J. (1983). Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2:2143-2150.
- Zhao, Y.; Christensen, S. K.; Fankhauser, C.; Cashman, J. R.; Cohen, J. D.; Weigel, D.; Chory, J. (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291, 306–309
- Zhao, Y.; Hull, A. K.; Gupta, N. R.; Goss, K. A.; Alonso, J.; Ecker, J. R.; Normanly, J.; Chory, J.; Celenza, J. L. (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *genes and Development* 16, 3100–3112
- Zhou, X.R.; Christie, P.J. (1999). Mutagenesis of the *Agrobacterium* VirE2 Single-Stranded DNA-Binding Protein Identifies Regions Required for Self-Association and Interaction with VirE1 and a Permissive Site for Hybrid Protein Construction. *J Bacteriol.* July; 181(14): 4342–4352.
- Zupan, J.; Muth, T.R.; Draper, O.; Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* 23: 11-28.

VIII. ANEXOS

Anexo N°1: Reactivos para extracción de DNA

➤ *Buffer* de extracción CTAB 2X

Compuesto	Cantidad para 1 litro
CTAB (bromuro de cetil-trimetil-amonio)	20g
NaCl	81.8 g
EDTA 0.5M pH 8.0	40ml
Tris-HCl 1M pH 8.0	100ml
PVP (polivinil pirrolidona)	10g
H ₂ O (d) c.s.p	1000ml

Nota: El CTAB y el PVP se agregan cuando la solución está caliente y luego de haber agregado todos los demás componentes.

➤ Solución de lavado I

Compuesto	Concentración final	Cantidad para 500ml
Etanol absoluto	76 %	380ml
Acetato de sodio 1M	0.2M	40ml
H ₂ O (d)		80ml

➤ **Solución de lavado II**

Compuesto	Concentración final	Cantidad para 500ml
Etanol absoluto	76 %	380ml
Acetato de sodio 1M	10mM	5ml
H ₂ O (d)		115ml

Anexo N°2: Formulaciones

➤ **TBE 10X**

Compuesto	Cantidad para 1 litro
Trizma Base	108g
Acet Acido bórico	55g
EDTA 0.5M pH 8.0	40g
H ₂ O (d)	1000 ml

Nota: TBE 1X, se realiza una dilución de 1ml. de TBE 10X con 9 ml de agua destilada.

➤ **SALB 10X**

Compuesto	Cantidad para 50 ml
Azul de Bromo fenol	75 mg
Xilen cianol	75 mg
Naranja G	100 mg
Sucrosa	30 gr
TBE 10X	2.5 ml
H ₂ O (d)	50ml

➤ **Geles De Agarosa 1%**

Volumen del gel	40 ml	100 ml	250 ml
TBE 1X	40 ml	100 ml	250 ml
Bromuro de Etidio (10mg/ml)	0.4 ml	1.0 ml	2.5 ml
Agarosa	0.4 gr	1.0 g	2.5 g

Nota: Se corre en *buffer* TBE 1X en volumen apropiado.

Anexo N°3: Registro de trabajo en campo

➤ **Fecha de siembra**

10/03/10

➤ **Semiaporque**

23/03/10

➤ **Aporque**

09/04/10

➤ **Cosecha**

18/06/10

➤ **Riegos**

10/03/10

24/03/10

10/04/10

10/05/10

10/06/10

➤ **Aplicación de Insecticidas**

- 19/03/10 Avid® + Confidor® + Evisect S (Control Mosca Blanca, Pulgón y Cigarrita)
- 05/04/10 Avid® + Confidor® + Applaud® (Control Mosca Blanca, Pulgón y Prodenia)
- 17/05/10 Avid® + Confidor® + Karate® (Control Mosca Blanca, Pulgón y Prodenia)

➤ **Condiciones metereológicas**

Fecha	Temperatura promedio (C°)	Humedad promedio (%)
01/03/2010	23.2	80.6
02/03/2010	23	81.5
03/03/2010	23.1	83.2
04/03/2010	22.7	83.2
05/03/2010	22.8	81.8
06/03/2010	21.9	83.8
07/03/2010	23.2	80.1
08/03/2010	23.9	78.2
09/03/2010	23.1	80.9
10/03/2010	24.1	18.8
11/03/2010	24.1	78.9
12/03/2010	24.5	75.5
13/03/2010	23.9	74.3
14/03/2010	22.6	79.5
15/03/2010	22.4	82.1
16/03/2010	23.7	78
17/03/2010	23.7	78.2
18/03/2010	24.8	71.9
19/03/2010	24.6	70.2
20/03/2010	23.4	75.6
21/03/2010	24.2	74
22/03/2010	24.9	71.4
23/03/2010	24.4	71.4
24/03/2010	24.8	70.8
25/03/2010	23.6	77.5
01/04/2010	22.4	70.5
02/04/2010	22.2	67.4

Continuación

3/04/2010	22.7	85
4/04/2010	17.9	66.2
5/04/2010	22.6	65.4
6/04/2010	23.7	65.6
7/04/2010	23.6	63
8/04/2010	24.3	67.6
9/04/2010	22.9	70.8
10/04/2010	21.6	72.1
11/04/2010	20.6	66
12/04/2010	22.5	68.5
13/04/2010	21.3	69.2
14/04/2010	21.4	74.3
15/04/2010	20	76
16/04/2010	19.5	77.4
17/04/2010	19.2	75.3
18/04/2010	19.6	68.4
19/04/2010	21.5	76.6
20/04/2010	20.1	77.8
21/04/2010	19.6	78
22/04/2010	19	74.4
23/04/2010	20.1	76
24/04/2010	19.9	75.8
25/04/2010	19.7	76.7
26/04/2010	19.5	78.8
27/04/2010	19.1	74.3
28/04/2010	20.7	76.7
29/04/2010	19.2	80.1
30/04/2010	17.8	86.6
1/05/2010	18.8	80.6
2/05/2010	18.5	79.3
3/05/2010	19.1	77.4
4/05/2010	18	81.1
5/05/2010	16.8	84.4
6/05/2010	19	76.4
7/05/2010	21	70.9
8/05/2010	17	87.6
9/05/2010	19.9	74.1
10/05/2010	22.3	64.7

Continuación

11/05/2010	19.9	72.5
12/05/2010	19.7	75.7
13/05/2010	18.9	78.2
14/05/2010	18.6	79.6
15/05/2010	19.3	77.3
16/05/2010	21.1	71.2
17/05/2010	19.9	77.6
18/05/2010	20.1	78
19/05/2010	18.9	84.4
20/05/2010	17.4	88.5
21/05/2010	18.5	84.6
22/05/2010	18.7	80.3
23/05/2010	19.1	74.4
24/05/2010	17.8	78.3
25/05/2010	16.4	82.7
26/05/2010	16.9	80.9
27/05/2010	17.6	76.8
28/05/2010	15.9	83
29/05/2010	17.1	79.5
30/05/2010	16.5	81.5
31/05/2010	16.9	82.3
1/06/2010	20.5	73.7
2/06/2010	19.9	74.8
3/06/2010	18.4	78.2
4/06/2010	17.3	83.9
5/06/2010	15.7	90.5
6/06/2010	16.4	86.6
7/06/2010	16	88.7
8/06/2010	16.9	86.6
9/06/2010	16.6	90.5
10/06/2010	17.2	89.8
11/06/2010	17.1	86.7
12/06/2010	16.1	90.6
13/06/2010	16.8	85.4
14/06/2010	15.9	89.3
15/06/2010	17.1	83
16/06/2010	17.2	82.2
17/06/2010	16	87.8

Continuación

18/06/2010	16.3	88.1
19/06/2010	16	88.6
20/06/2010	15.7	90.2
21/06/2010	16.9	84.8
22/06/2010	15.6	89
23/06/2010	16.3	82.6
24/06/2010	16	85.3
25/06/2010	16.1	84.2
26/06/2010	15.8	85.5
27/06/2010	15.5	87.1
28/06/2010	14.9	91.3
29/06/2010	15.7	88.1
30/06/2010	15.2	90.2