



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Desarrollo de casetes de expresión para variedades de papa (*Solanum tuberosum L.*), basados en el gen *cry1Ba1* de *Bacillus thuringiensis*

Natalyth Erika Mayorga

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias. Microbiología
Bogotá, Colombia
2016

Desarrollo de casetes de expresión para variedades de papa (*Solanum tuberosum* L), basados en el gen *cry1Ba1* de *Bacillus thuringiensis*

Natalyth Eira Mayorga

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias-Microbiología

Director:

Ph.D., Alejandro Chaparro Giraldo

Codirector:

Ph.D., Silvio Alejandro López Pazos

Línea de Investigación:

Biotecnología agrícola

Grupo de Investigación:

Ingeniería Genética de Plantas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias - Microbiología

Bogotá, Colombia

2016

La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso.

Louis Pasteur

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia y a la Maestría en Ciencias-Microbiología por la formación brindada.

A Colciencias por la financiación de este proyecto de investigación de la convocatoria 667-2014.

Al doctor Alejandro Chaparro-Giraldo por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de Investigación, por su confianza y orientación durante el proceso de mi formación como estudiante de maestría.

Al doctor Silvio Alejandro López Pazos docente de la Facultad de Ciencias de la Universidad Antonio Nariño a quien agradezco su apoyo, constancia, enseñanza y orientación durante todo el proceso de mi formación.

Al doctor Juan Daniel Valderrama Rincón docente de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Civil de la Universidad Antonio Nariño por su orientación.

A mi familia por su colaboración y a mis compañeros del grupo de Ingeniería Genética de Plantas.

Resumen

El más grande problema de insectos plaga en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en Colombia es causado por la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*, un miembro de los lepidópteros cuyas larvas destruyen el tubérculo llevando a cuantiosas pérdidas económicas. La bacteria *Bacillus thuringiensis* se ha utilizado ampliamente para el control de insectos plaga en diversos cultivos comerciales, y las proteínas Cry constituyen su principal factor de virulencia. La proteína Cry1Ba se ha evaluado sobre larvas de *T. solanivora*, y representa una opción para el control biológico de esta plaga. Hasta el momento se han desarrollado líneas de papa transgénicas para resistencia a *T. solanivora* basadas en el gen *cry1Ac*.

En este trabajo se pretendió diseñar casetes de expresión basados en el gen *cry1Ba1* que pudiesen conferir resistencia a *T. solanivora* para la variedad pastusa suprema, en un contexto de libertad de operación. Para este fin, se diseñaron casetes de expresión con el gen *cry1Ba1*, basados en los análisis de su actividad biológica para el control de *T. solanivora*, y su posible mecanismo de acción. Las secuencias utilizadas en los casetes de expresión fueron modificadas con base al uso codónico de la papa, para mejorar sus niveles de expresión. Se estableció la libertad de operación de las secuencias contenidas en los casetes diseñados, y se caracterizaron fenotípica y molecularmente cepas recombinantes de *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli*.

Se encontró que entre los principales factores a tener en cuenta para el diseño de este tipo de casetes de expresión son la activación proteolítica de la protoxina Cry1Ba1, el uso codónico teniendo en cuenta señales de poliadenilación o sitios crípticos de splicing entre otros. El estudio de patentes indica que un cultivo transgénico de papa que exprese el gen *cry1Ba1* no tendría inconvenientes de propiedad intelectual. En primera instancia, la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 es capaz de insertar su T-DNA portando el gen *cry1Ba1* en el genoma de explantes de papa variedad pastusa suprema. Este trabajo

intenta aportar al desarrollo de líneas transgénicas de papa en Colombia para resistencia a la polilla guatemalteca de la papa.

Palabras clave: Papa variedad pastusa suprema, *Bacillus thuringiensis*, gen *cry1Ba1*, promotor patatina, *Tecia solanivora*, casetes de expresión, propiedad intelectual.

Abstract

The lepidopteran *Tecia solanivora*, or Guatemalan potato moth, represents the single biggest challenge to potato (*Solanum tuberosum* L.) crops caused by pest insects in Colombia. The larvae of these moths feed on the potato tubers and can bring significant economic losses. The Gram-positive bacterium *Bacillus thuringiensis* has been widely used in the control of pest insects in diverse commercial crops. Their main virulence factors are Cry proteins. Among them, Cry1Ba has been evaluated on larvae of *T. solanivora* and represents an option for the biological control of this species. Transgenic potato lines have been developed with the gene *cry1Ac*, which confers resistance to *T. solanivora*.

Here, we describe the design of expression cassettes with the gene *cry1Ba1* in order to confer resistance to *T. solanivora* in potato plants from the Pastusa suprema variety, taking into account a freedom-to-operate (FTO) analysis. The biological activity and mechanism of action of the gene *cry1Ba1* was taken into account in the design of these expression cassettes. FTO was analyzed for the different elements of the expression cassettes. Nucleotide sequences were modified according to the codon usage of *S. tuberosum* in order to improve expression levels and recombinant strains of *Agrobacterium tumefaciens* and *Escherichia coli* were characterized phenotypically and at the molecular level.

The proteolytic cleavage and activation of the Cry1Ba1 protoxin, codon usage considering polyadenylation signals and cryptic splicing sites, were some of the main factors to consider in the design of the expression cassettes. An analysis of existing patents indicates that a transgenic potato cultivar expressing gene *cry1Ba1* would not violate third-party intellectual property rights in Colombia. In a preliminary assay, we demonstrated that *A. tumefaciens* strain LBA4404 can transfer T-DNA bearing the *cry1Ba1* gene to Pastusa suprema potato explants. This work contributes to the

development of Colombian transgenic potato lines with resistance to the Guatemalan potato moth.

Keywords: Pastusa suprema potato, *Bacillus thuringiensis*, *cry1Ba1* gene, patatin promoter, *T. solanivora*, expression cassettes, intellectual property

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVII
Lista de abreviaturas	XVIII
Introducción	1
Objetivos	5
1. Marco Teórico	7
1.1 Cultivo de la papa	7
1.2 <i>Tecia solanivora</i> Povolny (Lepidóptera Gelechiidae).....	7
1.3 Plantas genéticamente modificadas con resistencia a insectos	9
1.4 Análisis de Libertad de operación	9
1.5 Casetes de expresión para transformación en ingeniería genética de plantas	11
1.5.1. Región Codificante y su modificación de uso codónico.....	12
1.5.2. El promotor.....	13
1.5.2.1. Promotor B33	15
1.6 Proteínas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
1.7 Transformación genética de papa para resistencia a <i>Tecia solanivora</i>	17
2. Metodología	20
2.1 Análisis de libertad de operación.....	20
2.2 Diseño y síntesis de casetes de expresión para papa.....	21
2.2.1 Análisis de actividad biológica y estructura bioquímica de la proteína Cry1Ba121	21
2.2.2 Diseño <i>in silico</i> de casetes de expresión	21
2.2.3 Modificaciones de uso codónico en las secuencias	23
2.2.4 Ensamblaje de secuencias y análisis <i>in silico</i>	24
2.3 Caracterización de cepas recombinantes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y	
<i>Escherichia coli</i>	24
2.3.1 Obtención y caracterización de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	24
3. Resultados y discusión	27
3.1 Análisis de libertad de operación de las secuencias utilizadas en los casetes de	
expresión	27
3.2 Diseño de casetes de expresión para papa	33
3.2.1 Criterios de actividad biológica para la selección del gen <i>cry1Ba1</i>	33
3.2.2 Comparación de las proteínas Cry1Ba1 y Cry1Ac.....	38
3.2.2 Criterios para la selección de las diferentes secuencias <i>cry1Ba1</i> en los casetes	
de expresión.....	45
3.2.3 Diseño <i>in silico</i> de casetes de expresión basados en el gen <i>cry1Ba1</i>	48

3.2.4 Modificaciones de uso codónico de las secuencias.....	52
3.3 Caracterización fenotípica y molecular de cepas recombinantes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y <i>Escherichia coli</i>	59
4. Conclusiones.....	65
4.1 Recomendaciones	66
Bibliografía.....	67

Lista de figuras

Figura 1-1: Tubérculos de papa var. pastusa suprema afectados por <i>T. solanivora</i>	8
Figura 1-2: Modelo del modo de acción de las toxinas Cry. Adaptado de (Pigott y Ellar, 2007).....	17
Figura 2-1: Estructura del T-DNA insertado en el vector pCAMBIA2300, conteniendo los casetes de expresión basados en el gen <i>cry1Ba1</i>	23
Figura 2-2: Vector Binario pCAMBIA2300 (http://www.cambia.org/daisy/cambia/585)....	23
Figura 3-1: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas correspondientes a las proteínas Cry1Ba1 (NCBI ID CAA29898.1) y Cry1Ac1 (NCBI ID AAA22331.1), indicando los dominios I, II y III.....	39
Figura 3-2: Estructura terciaria de la proteína Cry1Ba1.....	44
Figura 3-3: Dominios funcionales de la protoxina Cry1Ba1.....	47
Figura 3-4: Casete de expresión 1 con el gen <i>cry1Ba1</i> sin fragmento C-terminal y ajuste de uso codónico.....	49
Figura 3-5: Casete de expresión 2 con el gen <i>cry1Ba1</i> sin fragmento C-terminal y ajuste de uso codónico en los primeros 87 aminoácidos.....	50
Figura 3-6: Casete de expresión 3, con el gen <i>cry1Ba1</i> , codificante de la correspondiente protoxina, con ajuste de uso codónico.....	50
Figura 3-7: Casete de expresión 4 conteniendo el gen <i>cry1Ba1</i> codificante de toxina activa en el extremo N-terminal y C-terminal con ajuste de uso codónico.....	51
Figura 3-8: Casete de expresión 5 con el gen <i>cry1Ba1</i> sin fragmento C-terminal y ajuste de uso codónico	52
Figura 3-9: Cepa recombinante de <i>E. coli</i> DH5alfa. Se observa crecimiento diferenciado según la presencia del antibiótico kanamicina.....	61

- Figura 3-10:** Cepa recombinante de *A. tumefaciens* LBA4404. Se observa crecimiento diferenciado según la presencia de los antibióticos kanamicina y rifampicina.....61
- Figura 3-11:** Amplificaciones de los casetes de expresión 1 y 2 en cepas de *E. coli* y *A. tumefaciens*, con el promotor B33.....62
- Figura 3-12:** Amplificación del casete de expresión 5 en cepas de *E. coli* y *A. tumefaciens* con el promotor CaMV35S.....62
- Figura 3-13:** Amplificaciones de los casetes de expresión 1, 2, en cepas de *E. coli* y *A. tumefaciens* con el gen *cry1Ba1*.....63
- Figura 3-14:** Aplicación de protocolo de transformación en explantes de papa usando la cepa recombinante de *A. tumefaciens* LBA4404.....64

Lista de tablas

Tabla 3-1: Patentes relacionadas con el término de búsqueda <i>cry1B</i> que incluyen la secuencia del gen <i>cry1Ba1</i> en las reivindicaciones.....	27
Tabla 3-2: Patentes relacionadas que incluyen la secuencia del gen <i>cry1Ba1</i>	28
Tabla 3-3: Patentes relacionadas con el promotor B33, CaMV35S, terminador nos, plásmido pCAMBIA2300 y cepa LBA4404, publicadas en las bases de datos internacionales consultadas.....	31
Tabla 3-4: Comparación de los resultados de los estudios realizados para evaluar la especificidad de las proteínas Cry1Ac y Cry1Ba para control de <i>T. solanivora</i>	37
Tabla 3-5: Estructura de los casetes de expresión de este trabajo.....	48
Tabla 3-6: Resultado de la optimización de uso codónico del gen <i>cry1Ba1</i> para el casete de expresión 1.....	53
Tabla 3-7: Resultado de la optimización de uso codónico del gen <i>cry1Ba1</i> para el casete de expresión 2.....	54
Tabla 3-8: Resultado de la optimización de uso codónico del gen <i>cry1Ba1</i> para el casete de expresión 3.....	54
Tabla 3-9: Resultado de la optimización de uso codónico del gen <i>cry1Ba1</i> para el casete de expresión 4.....	55
Tabla 3-10: Resultado de la optimización de uso codónico del gen <i>cry1Ba1</i> para el casete de expresión 5.....	56
Tabla 3-11: Primers para caracterización molecular de cepas recombinantes de <i>E. coli</i> DH5alfa y <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 con los casetes de expresión 1, 2 y 5.....	59

Lista de abreviaturas

Abreviatura

Término

B33	Promotor patatina
CaMV35S	Virus del mosaico de la coliflor
CL50	Concentración letal 50
DPI	Derechos de propiedad Intelectual
GM	Genéticamente modificado
LB	Luria-Bertani
LO	Libertad de operación
MTA	Acuerdos de material de transferencia
Nc	Número efectivo de codónes
OMPI	Organización Mundial de la propiedad Intelectual
ORF	Marco de lectura abierto
Pb	Pares de bases
SOC	Medio super optimo con catabolito
Tnos	Terminador nopalina sintasa

Introducción

En Colombia, el cultivo de papa ocupa el cuarto lugar en la producción agrícola, con una producción de 2, 582,147 ton millones de toneladas al año, es el principal sistema de producción agrícola de clima frío en Colombia (DANE, 2016; ICA, 2011). En diversos cultivos de importancia en el mundo, se ha empleado el desarrollo de plantas genéticamente modificadas (GM) que expresan proteínas para resistencia a insectos, y se ha logrado demostrar que estas plantas poseen la ventaja de reducir la necesidad de aplicar insecticidas, y además proporcionan una protección a lo largo de la temporada del cultivo, sin afectar la entomofauna asociada o el entorno natural, obteniendo mejoras en producción y en la economía de los agricultores que han adoptado la tecnología (Sauka *et al.*, 2008; Klümper y Qaim, 2014).

La polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Lepidóptera: Gelechiidae) es uno de los insectos plaga de mayor importancia para Colombia, debido al daño severo que las larvas generan en los tubérculos de papa, que son la fuente de alimento de esta especie. Este insecto es el principal problema de plagas en el cultivo de la papa en Colombia, causando grandes pérdidas directas en campo y en producto almacenado, que dependiendo de la gravedad puede llegar hasta cerca del 20%. Las larvas de primer instar penetran los tubérculos y forman galerías que destruyen el contenido interno del tubérculo, y lo contaminan con desechos, lo cual causa pérdida de la calidad generando su rechazo o disminución en su valor comercial. Las zonas productoras de papa en Colombia están afectadas por la plaga (DANE, 2014).

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria entomopatógena que se ha usado para el control biológico de insectos plaga durante más de 100 años. Este microorganismo produce varios factores de virulencia que le permiten colonizar a su hospedero, pero el

más ampliamente estudiado son las proteínas denominadas Cry. Este tipo de proteínas tienen actividad hacia insectos plaga de los órdenes Lepidóptera, Coleóptera y Díptera entre otros. Las proteínas Cry tienen alta especificidad debido a que su mecanismo de acción depende de varias etapas que incluyen su solubilización, activación proteolítica, reconocimiento de receptores proteicos en la membrana intestinal del insecto susceptible, la formación de oligómeros activos que forman poros iónicos que destruyen la integridad del tejido intestinal y posteriormente esto desencadena la muerte del hospedero. Se ha descrito la actividad tóxica de las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1C, Cry1D y Cry1E sobre larvas de *T. solanivora*, y en ingeniería genética de papa se ha logrado avances en el desarrollo de líneas transgénicas con el gen *cry1Ac* para resistencia a la plaga.

En el contexto de cultivos GM para resistencia a insectos se han desarrollado eventos que expresan diferentes genes *cry*, y tener varias opciones es útil si se piensa en escenarios biológicos que impliquen adaptación a diversos entornos agronómicos, contextos de bioseguridad para la liberación comercial, alternativas para posibles casos de desarrollo de resistencia a una proteína Cry específica de un cultivo GM en campo, contextos de comercialización como aquellos que incluyen los derechos de propiedad intelectual, entre otros. Esto lleva a pensar que es necesario tener alternativas viables de generación de nuevos eventos con otros genes *cry1*, y un buen candidato es el gen *cry1Ba1* codificante de la toxina activada que, aunque presenta una concentración letal 50 (CL50) sin diferencias estadísticamente significativas con otras proteínas de actividad hacia larvas de *T. solanivora* (Cry1Aa, Cry1Ac y Cry1C), se ha encontrado a nivel de ensayos en laboratorio que presenta la concentración más baja que causa la mortalidad del 50% de la población evaluada. El desarrollo de líneas transgénicas con piramidaje de genes, usando un gen *cry* diferente a *cry1Ac*, es una posibilidad en panoramas como el de aparición de insectos plaga resistentes (López-Pazos *et al.*, 2010; Pitre *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2003).

En este sentido, es deseable conocer cuál sería la estructura del casete de expresión con posible viabilidad de conferir resistencia a la polilla guatemalteca de la papa con base en el gen *cry1Ba1*. Para responder a esta inquietud, este trabajo abordó este problema profundizando en ciertos elementos inherentes al contexto del diseño de casetes de expresión basados en el gen *cry1Ba1* para su uso en variedades de papa. Los casetes de expresión que aquí se diseñaron serán empleados en el futuro en ensayos de

transformación con la variedad de papa pastusa suprema, usando un promotor tejido específico (patatina B33) para disminuir los potenciales riesgos de bioseguridad, ya que las plantas expresan el transgen únicamente en el tubérculo, que es el la parte afectada por *T. solanivora*, y de esta manera se evitarían riesgos en la entomofauna asociada al cultivo, o flujo de genes (Vanegas *et al.* , 2009).

Objetivos

Objetivo General

Desarrollar casetes de expresión a partir del gen *cry1Ba1*, para expresión en papa que confieran resistencia a *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae), y que tengan libertad de operación en Colombia.

Objetivos Específicos

- Hacer un estudio de libertad de operación en Colombia para los casetes de expresión diseñados.
- Diseñar *in silico* casetes de expresión que codifiquen la proteína Cry1Ba1 de *Bacillus thuringiensis*, modificándolos para el uso codónico de la papa.
- Obtener y caracterizar fenotípicamente y molecularmente cepas recombinantes de *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli*.

1. Marco Teórico

1.1 Cultivo de la papa

La papa (*Solanum tuberosum*) es una herbácea dicotiledónea que tiene una estructura subterránea rizomatosa de la que resultan tubérculos de alto valor alimenticio (Sinaipa, 2002). Su importancia en la nutrición se basa en la presencia de carbohidratos derivados del almidón, que pueden aportar hasta el 50% de calorías mínimas diarias, y además posee vitaminas (tiamina, pirridoxina, niacina o ácido ascórbico), minerales (por ejemplo potasio y fósforo), fibra (pectina), antioxidantes (antocianinas) y grasas (Linares y Gutiérrez, 2002; Scout *et al.*, 2002). En Colombia representa 80,000 empleos directos y más de 320,000 indirectos, ocupando la posición 33 en el mundo, según la producción y área sembrada (2, 582,147 ton, 144,097 ha), se cultiva entre 2,000-3,000 m y 10-15°C), principalmente en Cundinamarca, Boyacá y Nariño (poseen el 80% del área de cultivo) (ICA, 2011; FAOSTAT, 2013; DANE, 2016).

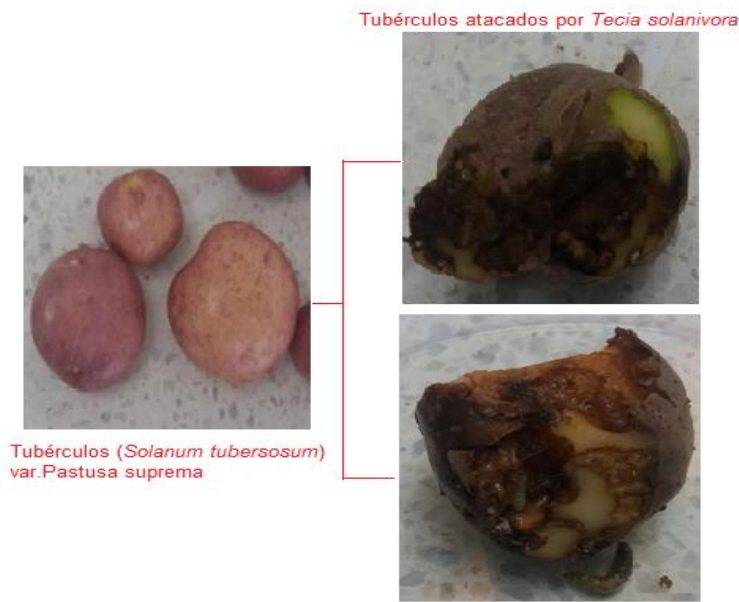
1.2 *Tecia solanivora* Povolny (Lepidóptera Gelechiidae)

T. solanivora, o la polilla guatemalteca de la papa como se conoce comúnmente en Colombia, se ha implantado como el problema entomológico más severo del cultivo de papa en Colombia (Villanueva, 2013), puesto que afecta la calidad del tubérculo, se ha logrado determinar en laboratorio que puede causar daño directo del 35% (Vargas *et al.*, 2004). Este insecto pasa por metamorfosis completa (huevo, larva, pupa y adulto). La larva es el estado que causa daño después de que emergen posterior a que las hembras posan sus huevos sobre grietas del tallo de las plantas o debajo de la tierra que está adherida a los tubérculos de la papa (Vargas *et al.*, 2004; López-Pazos *et al.*, 2013). El

daño que causa a los tubérculos es fuente de entrada para microorganismos que causan pudrición por la formación de galerías verticales y horizontales, que se van formando a medida que la larva se va alimentando y dentro de las cuales quedan residuos de alimento, excremento y moho, que se compactan que le confieren una tonalidad oscura al tubérculo en campo o almacén (Figura 1-1) (Niño, 2004; DANE 2014).

T. solanivora está presente en más del 80% de cultivos de papa de Boyacá, Cundinamarca y Antioquia, causando pérdidas los rendimientos anuales superiores al 30% (Bosa *et al.*, 2005; Villanueva *et al.*, 2013). Varias metodologías de control cultural han sido aplicadas incluyendo preparación de suelos, semilla sana, riego para mantener la humedad y evitar grietas donde el insecto coloca los huevos, y rotación de cultivos. En cuanto a técnicas de control etológico se destacan el uso de trampas con feromona sexual, y existen alternativas de control químico lo que ha contribuido a que el cultivo de sea considerado como uno de los que posee mayor demanda de plaguicidas (Espinal 2005; MINAMBIENTE, 1998). En cuanto a técnicas de control biológico se ha descrito evaluaciones de *Baculovirus*, *Granulovirus*, y bacterias y hongos con los cuales se desarrollan bioplaguicidas. Finalmente, se están llevando a cabo trabajos de transformación genética de papa para resistencia a la polilla guatemalteca de la papa (Valderrama *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2012).

Figura 1-1: Tubérculos de papa var. pastusa suprema afectados por *T. solanivora*.



1.3 Plantas genéticamente modificadas con resistencia a insectos

Por medio de ingeniería genética en plantas se ha realizado introducción de rasgos de resistencia a plagas, tolerancia a herbicidas, mejoramiento nutricional y para mejorar el desempeño y la productividad. Los cultivos GM han sido adoptados en alrededor de 28 países en el mundo, abarcando una superficie de 180 millones de ha. Se pueden encontrar cultivos GM de maíz, soya, algodón, alfalfa, o berenjena con resistencia a insectos. Dentro de los países que han adoptado la tecnología se encuentra Colombia, con cultivos biotecnológicos de maíz y algodón, con características de resistencia a herbicidas e insectos. El maíz es uno de los cultivos con más eventos aprobados en el mundo con 143 eventos de maíz transgénico, seguido del algodón con 56 eventos (James, 2014).

Para lograr el desarrollo de plantas GM se emplean métodos de transferencia de ADN métodos biológicos (como la utilización de la bacteria *Agrobacterium*), o métodos físicos como biobalística, electroporación, abrasión con fibras, utilización de láser y microinyección (Hodson, 2005). *A. tumefaciens* es una bacteria gram negativa que induce tumores en las raíces de las plantas, su método de infección está basado en la transferencia e integración de una región denominada T-DNA, a las células vegetales, que induce tumores si contiene un plásmido inductor de tumores Ti (Chilton *et al.*, 1977). La región del T-DNA esta delineada por dos repeticiones de aproximadamente 25 pb, designadas como bordes izquierdo y derecho (Gelvin, 2003). En las plantas transformadas la expresión de los genes de la región del T-DNA, produce un desequilibrio hormonal que conduce a la hiperproliferación celular y la producción de opinas (Krenek *et al.* 2015), también codifican enzimas reguladoras de crecimiento como auxinas y citoquinas, la parte de la región *vir* del plásmido Ti, no es transferida a la célula huésped y contiene siete loci (*vir A*, *vir B*, *vir C*, *vir E*, *virF* y *virG*) que codifican proteínas de virulencia requeridas para el transporte del DNA y la integración de este en el genoma huésped (Zupan and Zambryski 1995).

1.4 Análisis de Libertad de operación

La propiedad intelectual se refiere a creaciones humanas, considerándose dos aspectos: propiedad industrial y derechos de autor. La propiedad industrial incluye invenciones,

patentes, títulos de obtentor sobre variedades vegetales, marcas, dibujos y diseños industriales. Una patente es un derecho exclusivo concedido a una invención que le proporciona protección al titular por 20 años, cuando esta expira la invención pasa a dominio público (OMPI, 2008). En biotecnología agrícola, la forma más común de propiedad intelectual son las patentes (Bennett *et al.*, 2008).

Las patentes contienen especificaciones, o reivindicaciones, que describen las características novedosas de la invención para las cuales se reclama la protección. Estas se dividen en dos categorías: de producto y de procedimiento. Las reivindicaciones de producto se refieren a sustancias y composiciones, así como artículos, máquinas y mecanismos. Las reivindicaciones de procedimiento, se refieren a etapas para la obtención de un producto (SIC, 2008).

El tratado de Cooperación en materia de patente (PCT) es de naturaleza internacional y está administrado por la Organización Mundial de Propiedad Intelectual (OMPI) y suscrito por más de 135 países. El PCT permite solicitar simultáneamente, en varios países, la invención de patente mediante la presentación de una única solicitud. La concesión de patente es competencia de las oficinas nacionales que se denomina fase nacional (SIC, 2008). Es posible proteger una invención en varios países, para lo cual existen diferentes opciones: a) Se pueden presentar solicitudes de patente al mismo tiempo en todos los países en los que se desee proteger la invención, b) Presentar solicitud de patente en un país que haga parte del Convenio de París para la Protección de la Propiedad Industrial, y posteriormente otras solicitudes de patente en otros países dentro de un plazo de 12 meses, con el beneficio de la fecha de presentación de la primera solicitud, 3) Se puede presentar una solicitud en virtud del PCT (SIC, 2008; WIPO,2016). Las patentes, están disponible al público, en la mayoría de los países, a partir de los 18 meses de haberse presentado la solicitud (SIC, 2008).

Para evitar problemas legales en el contexto de la ingeniería genética de plantas, se debe realizar estudios de libertad de operación sobre las patentes que estén relacionadas con el posible desarrollo biotecnológico. Los diferentes elementos, procesos, técnicas e incluso genotipos que se vaya a usar en la creación de una línea transgénica pueden estar protegidos, por ello es importante conocer desde el comienzo de la investigación cuales derechos de propiedad intelectual están relacionados, su vigencia y aplicación (Hincapie y Chaparro-Giraldo, 2014). Un estudio de libertad de

operación parte de la deconstrucción del producto en elementos que pueden identificarse: casetes de expresión (región promotora, región secuenciadora, región terminadora) del gen de interés, vectores de transformación o cepas bacterianas. Se debe tener presente las patentes vigentes en el estado donde se desarrolla la investigación o se proyecta comercializar el producto, y el análisis de reivindicaciones de las patentes para conocer qué es lo que está protegido (Nagori y Mathur, 2009). El análisis de libertad de operación da claridad sobre cual tecnología puede estar libre o con que empresas se requiere negociar para la utilización de la tecnología patentada, evitar infringir derechos de terceros, o plantear la distribución de beneficios, teniendo en cuenta que los derechos de propiedad intelectual son territoriales y temporales (Hincapié y Chaparro-Girado *et al.*, 2014).

Para el análisis de libertad de operación debe tenerse en cuenta que no existen patentes internacionales, las leyes acerca de lo que es patentable varía en cada país, las patentes caducan por tiempo de vencimiento o por no pago de derechos, existen excepciones y limitaciones para determinados usos de las patentes, las patentes emitidas en diferentes países pueden tener diferente rango de reivindicaciones (BIOS, 2009). Una patente puede usarse si se otorga licencia obligatoria a un estado miembro por razones de interés público, emergencia o seguridad nacional (Hincapié y Chaparro-Girado *et al.*, 2014).

1.5 Casetes de expresión para transformación en ingeniería genética de plantas

La síntesis de genes es una de las formas más eficientes para diseñar constructos genéticos funcionales que se expresen en organismos heterólogos (Gustaffson *et al.*, 2004). Un casete de expresión, o un constructo genético sintético, es una parte de un vector de DNA utilizado para la clonación y transformación que se compone de múltiples fragmentos funcionales, o partes genéticas, que participan en diferentes pasos moleculares de expresión génica y contienen secuencias que controlan su expresión. Sus componentes básicos incluyen una secuencia promotora, un marco de lectura abierto (ORF), y una región terminadora no traducida en el extremo 3' (en eucariotas

contiene un sitio de poliadelinación) que influye en los niveles de expresión (Cai *et al.*, 2007). Un aspecto clave en este diseño *in silico* es la optimización de uso codónico de las secuencias para favorecer la expresión de genes foráneos en una especie determinada. Dentro de este diseño se deben tener en cuenta características determinantes en la selección de estos elementos:

1.5.1. Región Codificante y su modificación de uso codónico

La clave de la traducción reside en el código genético. Los distintos tripletes se relacionan específicamente con 20 tipos de aminoácidos usados en síntesis de proteínas, cada triplete constituye un codón, existen en total 64 codones, 61 de los cuales sirven para cifrar aminoácidos y 3 para marcar el cese de la traducción, generalmente los codones que representan a un mismo aminoácido difieren solamente en el tercer nucleótido, lo que ha llevado a decir que existe una “degeneración” en la tercera base de la mayoría de codones (Robertis, 2004), de esta manera los seres vivos pueden usar codones sinónimos con diferentes preferencias (Welch *et al.*, 2011), lo que se ha denominado sesgo codónico. Mediante cambios o modificaciones en el uso codónico de la secuencia de DNA, se puede favorecer los codones preferidos del organismo huésped (Welch *et al.* 2009). Las preferencias de uso codónico de un gen, para una especie son a menudo medidas mediante un índice de adaptación codónico (CAI) (Villalobos *et al.* 2006), este índice usa un set de referencia de genes expresados de una especie para evaluar el peso relativo de cada codón, y el puntaje CAI para un gen es calculado a partir de la frecuencia del uso de todos los codones en dicho gen (Sharp y Li, 1987). Tiene un rango de variación entre 0 y 1.0, donde 1.0 es indicativo de un gen que utiliza para cada aminoácido codificado el codón sinónimo más frecuente del set de referencia. El uso codónico es una parte fundamental de la transferencia de la información genética, por ejemplo en manzana se encontró que el sesgo codónico puede estar influenciado por factores como mutaciones genéticas o selección natural, o función y expresión de genes que codifican proteínas estrechamente vinculadas (Li *et al.*, 2013). Con el uso de genes de uso codónico bacteriano, para resistencia a insectos, se ha evidenciado con numerosas plantas transformadas que los niveles de expresión son demasiado bajos para conferir una protección adecuada, y que la modificación de codones en estos genes mejora notablemente su expresión (Mazier *et al.*, 1997).

En el diseño de genes semi-sintéticos también es importante tener en cuenta regiones no traducidas (UTRs) 5' (Shine Dalgarno), ya que estos regulan la traducción y juegan un papel importante en el control de la iniciación de la traducción (Barrett *et al.*, 2013).

1.5.2. El promotor

Una construcción para transformación genética de plantas contiene el promotor, que es aquella región donde se unen los factores de transcripción, facilitando a su vez la unión de la ARN polimerasa II. En eucariotas se encuentra por lo general es localizada en el extremo 5' de la región codificante del gen, la cual está compuesta de un núcleo, más otros elementos que ayudan a definir cuando y donde un gen es transcrito (Gallo y Flynn, 2008). El núcleo del promotor está localizado alrededor de 40 pares de bases (bp) antes del sitio de inicio de la transcripción, y la región corriente arriba del promotor puede extenderse tanto como 200 bp o más (Potenza *et al.*, 2004). En la mayoría de los eucariotas el promotor suele poseer dos elementos. La combinación más común incluye las secuencias llamadas TATA y CAAT situadas cerca del codificador, el elemento *cis*-regulador TATA se localiza alrededor de la posición -25 a -30 (30 nucleótidos secuencia arriba del sitio de inicio de la transcripción). La caja CAAT se localiza en el mismo lado pero a unos 75 nucleótidos, entre las posiciones -70 a -80. La secuencia de nucleótidos más común que se encuentra en la caja TATA es la TATAAAA, aunque a menudo dos T reemplazan a las A en las posiciones quinta y séptima. La secuencia CAAT suele ser GGCCAATCT, muchos promotores contienen la secuencia TATA, pero no la CAAT. Los elementos del promotor que no son requeridos para la iniciación de la transcripción, pero influyen el nivel de sincronización o especificidad de la transcripción son la caja CAAT (CCAAT), y elementos de respuesta gen específicos (Gallo y Flynn, 2008). Las regiones reguladoras suelen hallarse "corriente arriba" respecto del extremo 5' del segmento codificador, frecuentemente a miles de nucleótidos. Las secuencias de terminación comúnmente tienen la presencia de la secuencia AATAAA, que es necesaria para la conclusión de la síntesis del transcrito primario.

Los promotores son importantes en la transformación genética de plantas. Dependiendo de la estrategia se define el promotor que va a ser utilizado en la construcción genética. Se pueden emplear promotores que expresen el transgen de manera constante en la

planta o promotores que de expresión en determinados órganos, tejidos o estados de desarrollo de la planta, así como promotores inducidos bajo ciertos estímulos ambientales y/o químicos. En biotecnología vegetal son tradicionalmente divididos en tres categorías: 1) constitutivos, activos continuamente en la mayoría o todos los tejidos, 2) inducibles, regulados por la aplicación de un producto químico externo o una señal física, 3) espaciotemporales que pueden ser tejido específicos o con actividad etapa-específica (Potenza *et al.* , 2004).

En biotecnología vegetal, los promotores constitutivos son muy usados y provienen de virus de plantas y genes constitutivos de plantas. Los promotores constitutivos derivados de virus de plantas son reconocidos por la maquinaria celular vegetal, lo que permite la expresión del transgen de interés (Peremarti *et al.* 2010). Uno de los promotores virales más utilizados en vectores de transformación genética es el virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S), este promueve una elevada expresión en todos los órganos de la planta, debido a la interacción entre los diferentes elementos *cis*-reguladores (Benfey *et al.*, 1990). También es común hacer uso de promotores constitutivos de origen vegetal, en el diseño de casetes de expresión, estos son genes que codifican proteínas requeridas para el funcionamiento, estructura e integridad celular y señalización de proteínas para su degradación dentro de estas proteínas se encuentran la actina, ubiquitina y tubulina. La ubiquitina es una proteína que realiza el proceso de señalización de proteínas que van a ser degradadas en el proteosoma, y es uno de los promotores más usados en transformación de plantas monocotiledóneas (Christensen *et al.*, 1992).

Los promotores inducibles se activan en respuesta a estímulos como señales endógenas (hormonas vegetales), estímulos físicos externos (estrés abiótico y biótico), y estímulos químicos externos (aplicación de aerosoles químicos). Estos promotores facilitan la regulación de expresión del transgen a través del control externo. Los promotores inducibles por hormonas más utilizados responden a auxinas y giberelinas (Peremarti *et al.* 2010). Los promotores que responden a estímulos físicos están asociados a heridas o ataques por patógenos, y dentro de los relacionados a estrés abiótico se encuentran aquellos que se inducen por frío, calor o déficit hídrico (por ejemplo, el promotor del gen *hsp 17.3* de soya, el cual induce la expresión del gen reportero *uidA*, cuando la temperatura es mayor a 25°C) (Saidi *et al.* 2005). Los promotores espacio-temporales, restringen la expresión génica a ciertas células, tejidos o estados de desarrollo, y se han

caracterizado promotores específicos de semillas, tubérculos, frutos, raíces entre otros. Los promotores específicos de tejido, órgano y célula, permiten expresar transgenes y mejorar características de manera específica y localizada. (Potenza *et al*, 2004).

1.5.2.1. Promotor B33

Una de las principales proteínas del almacenamiento en el tubérculo es la globulina 11S, conocida como patatina (Goo *et al* .,2013) que constituye hasta el 40% de la proteína soluble en tubérculos de papa y su peso molecular es de 45 kDa (Shewry 2003). El promotor del gen que codifica para esta proteína es el B33, este es altamente expresado en tubérculos de papa, y se ha demostrado que la transcripción de patatina tiene alto grado de especificidad en los tubérculos. La transcripción de patatina también puede ser inducible en otros órganos de una planta de papa transgénica mediante tratamiento con concentraciones elevadas de sacarosa (Wenzler *et al.*, 1989).

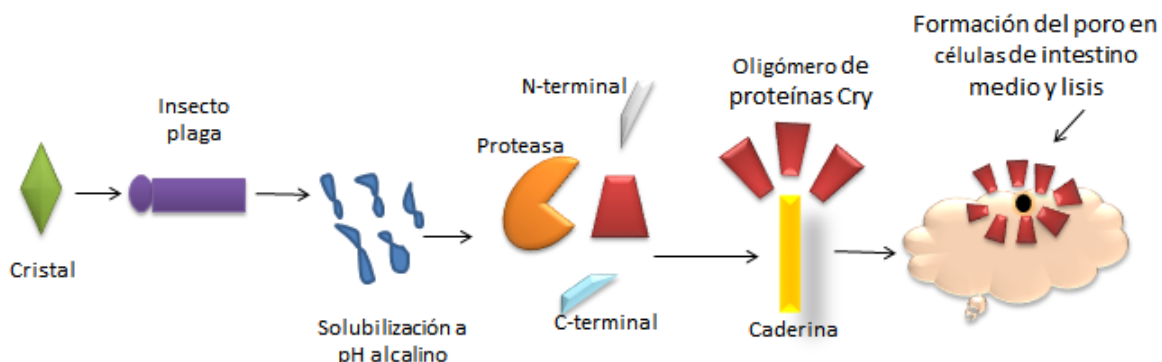
1.6 Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*

Bt es un bacilo quimiorganótrofo que, durante su fase de esporulación, sintetiza cristales compuestos por proteínas insecticidas cuyo principal representante son aquellas conocidas como Cry, con actividad hacia lepidópteros, coleópteros, dípteros, himenópteros y homópteros (Soberón y Bravo 2007). Actualmente se han secuenciado 787 diferentes genes *cry* (Crickmore *et al.*, 2016; Sauka *et al.*, 2008; Soberón y Bravo 2007). Varias proteínas Cry son activas contra insectos lepidópteros: Cry1 (Cry1 hasta Cry1K), Cry7B, Cry8D, Cry9, Cry15, Cry22A, Cry32, y Cry51A. Son activas contra plagas como: *Helicoverpa armígera* que ataca cultivos de soja, leguminosas en general, sorgo, maíz, tomate, plantas ornamentales y frutales, *Ostrinia nubilalis* plaga que afecta maíz, *Trichoplusia ni* ataca cultivos como tomate, algodón, frijol, tabaco entre otros, *Manduca sexta* ataca plantas de la familia *solanaceae*, *Spodoptera exigua* afecta plantas entre las que se encuentra el apio, especies herbáceas y plantas ornamentales, *Heliothis virescens* es plaga para plantas de tabaco, algodón, soja, entre otros cultivos, *Plutella xylostella* plaga de la familia de Brassicaceae entre la que se encuentra el repollo y coliflor.

Las proteínas Cry son ingeridas como protoxinas que se solubilizan en el intestino medio del insecto debido al pH alcalino. La solubilización no es suficiente y se requiere de la acción de proteasas que clivan fragmentos N-terminal y C-terminal, dejando una toxina activa de aproximadamente 60 kDa. Estas toxinas activas se unen específicamente a receptores en la microvellosidad apical de células intestinales, formando oligómeros en la membrana que causan poros generando que las células intestinales sean permeables a moléculas como aniones, cationes, y aminoácidos, alterando la fisiología celular por la eliminación de los gradientes iónicos transmembranales y afluencia masiva de solutos en el lumen del intestino medio, causando destrucción celular y subsecuentemente un daño en el tejido (Figura 1-2) (Vincent *et al.*, 2012).

Los posibles receptores del grupo de toxinas Cry1, que son las más utilizadas en el control de insectos lepidópteros, son caderinas (en el caso de *Manduca sexta* el tamaño de la caderina es de 210 kDa), aminopeptidasas N (proteína que se encuentra anclada a la membrana a través de un grupo glicosil fosfatidil inositol (GPI)), y fosfatasa alcalina. La estructura de las toxinas contiene tres dominios funcionales, un primer dominio I formado por seis alfa-hélices que rodean una hélice central, estas hélices externas son de naturaleza anfipática e hidrofóbica lo que hace que este dominio sea probablemente el responsable de la formación de poros. Un segundo dominio (denominado II) tiene en general tres laminas beta-antiparalelas a manera de beta-prisma, y esta conformación, y su variabilidad intrínseca en secuencia primaria y terciaria, llevan a pensar que está relacionado con el reconocimiento del receptor. Un dominio C-terminal, o dominio III, tiene dos lámina beta-plegadas antiparalelas, es menos variable que el dominio II, con diferencias estructurales en longitud, orientación y secuencias de los bucles y sería importante en la estabilidad de la proteína y quizás en reconocimiento del receptor (Pigott y Ellar, 2007).

Figura 1-2 Modelo del modo de acción de las toxinas Cry. Adaptado de (Pigott y Ellar, 2007).



Por medio de ingeniería genética se han desarrollado especies de plantas que expresan genes *cry*, incluyendo maíz Bt y algodón Bt, liberadas comercialmente. Estas plantas poseen la ventaja de reducir la necesidad de aplicar insecticidas y de proporcionar una protección a lo largo de la temporada del cultivo, sin afectar la entomofauna asociada o el entorno natural (Sauka *et al.*, 2008; Klümper y Qaim, 2014).

1.7 Transformación genética de papa para resistencia a *Tecia solanivora*

Varios cultivos de gran importancia económica se han modificado genéticamente con genes *cry* para otorgar resistencia a insectos. Entre estos cultivos transgénicos se encuentra el algodón Bt (*Gossypium hirsutum* L.) modificado con los genes *cry1F* y *cry1Ac* para conferir resistencia a lepidópteros, esta línea fue desarrollada comercialmente por Dow AgroSciences LLC. Existe otra línea de algodón Bt transformada con los genes *cry1F* y *cry1Ac*, y adicionalmente el gen *cp4epsps* con lo que se logró resistencia a lepidópteros y tolerancia a glifosato respectivamente, desarrollada por la misma compañía en conjunto con Monsanto. Otros avances incluyen la transformación de algodón con el gen *cry1Ac* desarrollado por Monsanto, algodón Bt que porta los genes *cry1Ab* y *cry2Ae* para insectos lepidópteros (por la compañía Bayer Crop Science). Otro cultivo que ha sido ampliamente modificado con genes *cry* es el maíz (*Zea mays* L.), dentro de las líneas desarrolladas se encuentra maíz con el gen *cry1Ab*, también líneas

con los genes *cry1Ab* y *cry3A* para resistencia a insectos lepidópteros y coleópteros respectivamente, en conjunto con un gen *epsps* para tolerancia a glifosato, y además hay líneas que contienen los genes *cry34A* y *cry35A* desarrolladas por Syngenta. La soya es otro cultivo al que se le ha mejorado genéticamente con genes *cry*, dentro de estas modificaciones se encuentran eventos que incluyen los genes *cry1Ac* para resistencia a insectos lepidópteros, en combinación con el gen *epsps* (de tolerancia a herbicidas) desarrollada por Monsanto. En el caso de arroz Bt (*Oryza sativa* L) se destacan líneas que expresan el gen *cry1Ab* para insectos lepidópteros (Agricultural Biotech Research Institute). El desarrollo de Berenjena Bt en India (evento Bt Brinjal Event EE1), con el gen *cry1Ac* para conferir resistencia a lepidópteros, desarrollada por la compañía Maharashtra Hybrid Seed Company (ISAAA, 2016).

En transformación genética de papa se han dado avances para resistencia a insectos y patógenos como *Leptinotarsa decemlineata*, *Phthorimaea operculella* resistencia a la enfermedad del tizón tardío, resistencia a virus, manchas negras del tubérculo, e incluso para aumentar productividad usando características como concentración de almidón y estrés. Para conceder rasgos de resistencia a insectos se han utilizado genes *cry* de Bt, que se convirtió en una proteína de gran interés agronómico para combatir una gran variedad de insectos y nematodos, con protección a los tejidos internos de la planta, manteniendo una producción constante de la proteína (De Maagd *et al.*, 2001).

Dado que la polilla guatemalteca de la papa es un insecto plaga del orden Lepidóptera, fue fácil pensar que genes *cry* de Bt podrían facilitar su control en Colombia. Es así como se han evaluado cepas nativas colombianas con actividad hacia el insecto (Pérez *et al.*, 1997). También se determinó que proteínas Cry1, evaluando la actividad toxica individual de las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Da y Cry1Ea, a una concentración de 4 µg/cm² que correspondía a la CL50 de la cepa Bt HD1 incluida como control positivo, en larvas de *T. solanivora*, de primer estadio, evidenciando que la protoxina Cry1Ac tenía actividad toxica especifica hacia *T. solanivora* (Martínez *et al.*, 2003).

Por otro lado, se identificó la actividad tóxica de las toxinas recombinantes activadas con tripsina Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1B y Cry1C sobre larvas de *T. solanivora*, determinándose una CL50 para la toxina Cry1Ac de 0,107 µg/cm², y Cry1B de 0.085 µg/cm² (Pitre *et al.* ,

2008). Posteriormente, durante la evaluación de una proteína híbrida Cry1B-Cry1I, se determinó que la toxina activada Cry1Ba tiene actividad hacia larvas de *T. solanivora* con un 60% de mortalidad a una dosis de 0,5 µg/cm², y el híbrido activado tiene una CL50 de 0.2 µg/cm² (López-Pazos et al. 2010).

Recientemente, investigadores de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y el (CIB) Corporación para Investigaciones Biológicas realizaron el desarrollo de 43 líneas transgénicas con el gen *cry1Ac* en tres variedades de papa denominadas Diacol capiro, parda pastusa y pandeazúcar, estas líneas transgénicas contenían de 1 a 4 copias del gen *cry1Ac*, y niveles de expresión de 0,02 a 17 µg/g de tejido. Los tubérculos obtenidos en este estudio causaron una mortalidad entre 83,7 a 100% sobre larvas de la polilla guatemalteca de la papa (Valderrama et al. 2007). Para el año 2012 se desarrollaron líneas transgénicas con la variedad androestéril de papa pastusa suprema transformada con el gen *cry1Ac* para resistencia a *T. solanivora* (Torres et al.,2012).

2. Metodología

2.1 Análisis de libertad de operación

Las secuencias de los promotores B33 (patatina) y CaMV35S, el terminador Tnos, el gen *cry1Ba1* fueron seleccionadas para la realización de cinco casetes de expresión para variedades de papa que otorgaran resistencia a *T. solanivora* y que se expresaran específicamente en el tubérculo. En este sentido, se realizó una búsqueda de solicitud y patentes concedidas para Colombia de las secuencias de los promotores B33, el terminador Tnos, y del gen *cry1Ba1*. Además se revisó bajo el mismo criterio, patentes relacionadas con el vector de transformación pCAMBIA2300 y la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404, que se seleccionaron para este trabajo. La base de datos utilizada de acceso público fue The Lens (<https://www.lens.org/>) para realizar un análisis de las reivindicaciones. The Lens permite ubicar patentes otorgadas por la Oficina de patentes de Estados Unidos y su contraparte de Europa, y además involucra los registros en el PCT que están en la base de datos de la OMPI. Además se usó la base de datos de patentes nacional de la Superintendencia de Industria y Comercio (SIC) (<http://www.sic.gov.co/es/banco-patentes>). Se realizó la búsqueda mediante palabras clave que estuviesen dentro de las reivindicaciones. Las palabras utilizadas fueron Cry1Ba1, B33, patatin promoter, CaMV35S promoter, NOS terminator,

2.2 Diseño y síntesis de casetes de expresión para papa

2.2.1 Análisis de actividad biológica y estructura bioquímica de la proteína Cry1Ba1

Con una exhaustiva revisión bibliográfica se pretendió determinar los parámetros esenciales que validarían elegir el gen *cry1Ba1* como una opción para la transgénesis de papa con resistencia a *T. solanivora*, dentro del contexto de su actividad tóxica hacia el insecto. Para ello se revisó los trabajos disponibles donde se hubiese evaluado la proteína Cry1Ba sobre larvas de la polilla guatemalteca de la papa, y se realizó una comparación con el producto de codificación del gen *cry1Ac* con el cual se han logrado adelantos relevantes en transformación genética de variedades de papa con resistencia a esta plaga. Paralelamente, se estudió la estructura del gen *cry1Ba1* en relación a su contraparte *cry1Ac1*, cuya importancia ya se mencionó. Para esto, y a partir de la base de datos de nucleótidos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se realizó la búsqueda de la secuencia de nucleótidos (DNA) codificantes del gen *cry1Ba1*, y se comparó con su contraparte *cry1Ac1* utilizando el programa Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). La predicción de estructura terciaria se llevó a cabo por identificación de una estructura equivalente depositada Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) la cual ha sido generada experimentalmente. Se eligió la estructura 1CIY, que corresponde a la proteína Cry1Aa. La estructura terciaria (3D) de la proteína se construyó con el método de modelamiento por homología. Los alineamientos estructurales entre la proteína molde y la secuencia problema Cry1Ba1 se generó usando el programa DeepView-Swiss-PdbViewer 4.1 (<http://spdbv.vital-it.ch/>) (Guex y Peitsch, 1997). Con este modelo se realizó un análisis teórico de los residuos relevantes para su funcionalidad.

2.2.2 Diseño *in silico* de casetes de expresión

Se diseñaron cuatro constructos que posiblemente confieren resistencia a *T. solanivora* usando la secuencia del gen *cry1Ba1* que se obtuvo de la base de datos de nucleótidos

del Centro Nacional de Información en Biotecnología (National Center for Biotechnology Information-NCBI) con número de acceso X06711.1. Los diseños fueron:

- Casete de expresión 1: contiene el gen *cry1Ba1* sin fragmento C-terminal y ajuste de uso codónico, está conformada por los primeros 1947 pb del gen *Cry1Ba1*. Esta construcción contiene el promotor B33.
- Casete de expresión 2: contiene el gen *cry1Ba1* sin fragmento C-terminal y ajuste de uso codónico en los primeros 87 aa, está conformada por 1947pb. Esta construcción contiene el promotor B33.
- Casete de expresión 3: contiene el gen *cry1Ba1* codificante de protoxina con ajuste de uso codónico, conformada por 3687pb. Esta construcción contiene el promotor B33.
- Casete de expresión 4: contiene el gen *cry1Ba1* codificante de toxina activa clivada en el N-terminal y C-terminal con ajuste de uso codónico, conformada por 1647pb que inician en el nucleótido 267 y termina en el nucleótido 1908 del gen *cry1Ba1*. Esta construcción contiene el promotor B33.
- Casete de expresión 5: contiene el gen *cry1Ba1* sin fragmento C-terminal y ajuste de uso codónico, está conformada por los primeros 1947 pb del gen *Cry1Ba1*. Esta construcción contiene el promotor CaMV35S.

Todos los casetes de expresión contienen un codón de inicio y parada, el promotor B33 (número de acceso NCBI A08215.1), (a excepción del número 5 que contiene el promotor CaMV35S - número de acceso NCBI AF234316.1), y el terminador T-nos (número de acceso NCBI AET75772.1). El vector de transformación seleccionado fue pCAMBIA2300 (donado por Paul Chavarriaga del Centro Internacional de Agricultura Tropical) que contiene un gen de selección vegetal por kanamicina en la región del T-DNA. La estructura general de los constructos diseñados como la indicada en la (Figura 2-1). El esquema del vector pCAMBIA2300 se indica en la (Figura 2-2).

Figura 2-1: Estructura del T-DNA insertado en el vector pCAMBIA2300, conteniendo los casetes de expresión basados en el gen *cry1Ba1*. El gen de selección para resistencia a kanamicina (*nptII*) está bajo el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S) con un terminador del mismo virus (TCaMV35S).

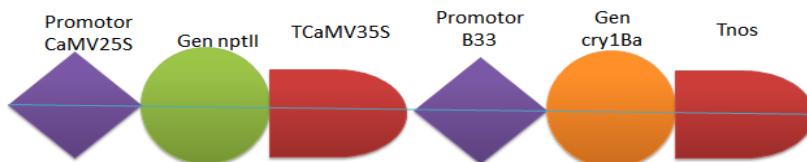
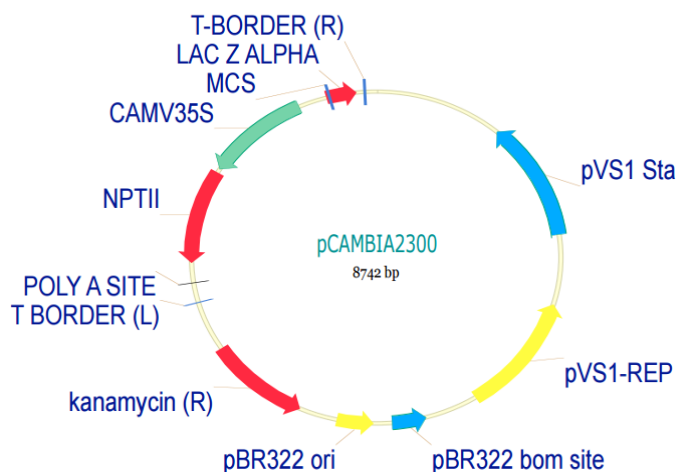


Figura 2-2: Vector Binario pCAMBIA2300 (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585>)



2.2.3 Modificaciones de uso codónico en las secuencias

El marco abierto de lectura (open Reading frame-ORF) del gen *cry1Ba1* se determinó mediante la herramienta ORF Finder del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/>). Para realizar la modificación de uso codónico se utilizó el software Visual Gene Developer 1.3 (visualgenedeveloper.net/). Para realizar la modificación del gen *cry1Ba1* se le realizaron modificaciones para que la secuencia tuviera mayor semejanza a secuencias de genes de papa, y al mismo tiempo se tenían en cuenta sitios de splicing, señales de poliadenilación y remoción de sitios de restricción que pueden interferir en la transcripción. Al software Visual Gene Developer se le introdujo el uso codónico de papa desde la base de datos Kasuza (<http://www.kazuza.or.jp/codon/>). Para las secuencias

finales diseñadas se hizo un análisis de los parámetros CAI, contenido de GC y número efectivo de codones (Nc).

2.2.4 Ensamblaje de secuencias y análisis *in silico*

Las secuencias se ensamblaron con el software ApE-A plasmid Editor 2.0 (biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/). En los extremos de la construcción se colocaron secuencias de reconocimiento de enzimas presentes en la región polilinker del vector pCAMBIA2300 y que no cortaran en ninguna parte de la secuencia del gen. Con este mismo software se verificó que los sitios insertados no corrieran el marco de lectura +1. Las modificaciones de uso codónico que se realizaron en la secuencia del gen *cry1Ba1* son modificaciones en nucleótidos pero no modifican la secuencia de aminoácidos de la proteína esperada para las construcciones diseñadas, que se corroboró con la herramienta ClustalOmega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Se contrató la síntesis y clonación de los cuatro casetes de expresión diseñados en el vector pCAMBIA2300 con la compañía Shanghai Generay Biotech Co Ltd (China).

2.3 Caracterización de cepas recombinantes de *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli*

2.3.1 Obtención y caracterización de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404

La cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* fue transformada por electroporación con el plásmido pCAMBIA2300 que contenía cada uno de los casetes de expresión. Con este fin se tomó 25 µl de células electrocompetentes y 1 µl de vector (100 ng/µl) en medio SOC (Tryptona2%, NaCl 8.56 mM, KCl 2.5mM, MgCl₂ 10mM y de MgSO₄ 10 mM heptahidratado) que se incubó durante 3 horas a 28°C y se sembraron en medio Luria Bertani (LB) con kanamicina (50mg/L) y rifampicina (50 mg/L). Estos medios fueron incubados a 28°C durante 48 horas. Las cepas bacterianas fueron seleccionadas por su crecimiento en medio solido LB con kanamicina (50 mg/L) y rifampicina (50 mg/L). La reacción de PCR se realizó igual que para el caso de *E. coli*. Confirmada la

transformación, las bacterias se dejaron crecer en medio LB líquido con kanamicina (50 mg/L) hasta alcanzar una densidad óptica de 1,0, y posteriormente se criopreservaron en glicerol 25%.

Para la caracterización fenotípica de *A. tumefaciens* LBA4404 se realizó regeneración y transformación *in vitro* de plántulas de papa de 3 a 4 semanas de edad, mantenidas en medio Murashige y Skog (MS) suplementado con 0,4 mg/L de tiamina, ácido D-pantoténico, 2mg/L, inositol 100mg/L, sacarosa 20mg/L, y Fitagel 2,5 g/L (Trujillo *et al* ; 2001). La regeneración se llevó a cabo a partir de segmentos internodales de tallo (longitud de 5-6 mm), con el casete de expresión 5 (que contiene el promotor CaMV35S con el gen *cry1Ba1* sin fragmento C-terminal y ajuste de uso codónico). El sistema de regeneración empleado basado en el método de (Jiménez *et al*; 2009) fue modificado empleando 3,0 mg/L de Zeatina ribósido, 0,3 mg/L de ácido naftalénacético y 1.0 mg/L de ácido gibérelico en medio MS, suplementado con vitaminas, sacarosa 2,5 mg/L y 0,4 mg/L de tiamina, a una temperatura de 18°C, y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Este medio permitió la formación de callos y regeneración de los explantes. La eficiencia del medio de cultivo se evaluó con la inducción de callos, porcentaje de regeneración, y número de regenerantes por explante. La transformación de las plántulas se realizó basada en el método propuesto por (López y Chaparro-Giraldo; 2007). Empleando 20 ml de medio líquido LB suplementado kanamicina (50 mg/L) a 28°C para cultivar la cepa recombinante de *A. tumefaciens* LBA4404. En el proceso de transformación vegetal se tomaron grupos de 40 explantes y colocándolos en el medio de cocultivo, que consiste de medio MS líquido suplementando con vitaminas y 20 mg/L de acetosiringona. Los explantes se pusieron en contacto con la suspensión bacteriana durante 8 minutos, usando como control un grupo de 40 explantes a los cuales no se les sometió a cocultivo y se trasladaron directamente a medio de cultivo sólido MS sin adición de hormonas. Los explantes que se cocultivaron fueron transferidos a cajas petri con medio de cocultivo sólido, y se incubaron en oscuridad a una temperatura de 20±3°C por un período de 18 horas. Posteriormente, los explantes se transfirieron a un medio de regeneración suplementado con 250 mg/L de cefatoxime por siete días, y los explantes se trasladaron al mismo medio suplementado con 50 mg/L de kanamicina como concentración de selección que se ha usado para explantes de pastusa suprema (López

y Chaparro-Giraldo 2007; Torres *et al.*; 2012) y de otras variedades (Andersson *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2006; Meiyalaghan *et al.*, 2011; Molla *et al.*, 2012).

2.3.2 Transformación genética de *Escherichia coli*

La transformación genética de la cepa comercial DH5alfa de *Escherichia coli* (Invitrogen), con cada uno de los casetes de expresión, se realizó a través de electroporación, y los viales resultantes se almacenaron a -80°C y a -20°C. Para la electroporación se tomó una alícuota de células electrocompetentes conservadas a -80°C que se mantuvieron en hielo durante el proceso. Se empleó 25 µl de células electrocompetentes y 1 µl de vector (100 ng/µl) en medio SOC (Triptona 2%, NaCl 8.56 mM, KCl 2.5mM, MgCl₂ 10mM y de MgSO₄ 10 mM heptahidratado). Se incubaron por 90 min a 37°C y después se cultivaron en medio LB con kanamicina (50 mg/L), y se dejaron crecer en incubadora por 10 horas a 37°C. Las cepas bacterianas fueron seleccionadas fenotípicamente por su crecimiento en kanamicina, teniendo en cuenta que el plásmido pCAMBIA2300 contiene un gen de resistencia a este antibiótico, y se confirmaron mediante PCR.

La extracción de DNA plasmídico se realizó con el kit GeneJET plasmid Miniprep Kit (Termofisher). La reacción de PCR se llevó a cabo con Buffer PCR 1X, dNTP MIX 0,5 uM, Mg 2,5 mM, 1 µM de primers que amplificaban el casete de expresión o específicamente el gen *cry1Ba1*, y Taq polimerasa 0,3 U. El ciclo de temperaturas tuvo las siguientes etapas: denaturación inicial (95°C por 5 min), síntesis (95°C por 1 min, 57°C por 2.5 min, 72°C por 1 min durante 30 ciclos), y extraelongación (72°C por 5 min).

3. Resultados y discusión

3.1 Análisis de libertad de operación de las secuencias utilizadas en los casetes de expresión

Los casetes de expresión diseñados debían cumplir con el concepto de libertad de operación para Colombia, por esta razón se buscaron patentes que podrían afectar el uso de los elementos utilizados en el proceso, y se determinó si estaban solicitadas o patentadas en Colombia. Se inició con la deconstrucción del producto y se determinó los principales elementos que podrían ser objeto de patente: cepa bacteriana LBA4404 de *A. tumefaciens*. vector de transformación pCAMBIA2300, gen *cry1Ba1*, promotores CaMV35S y B33 y terminador Tnos. Posteriormente se encontraron las patentes involucradas con estos elementos, que se listan en la tabla 3-1. Además se realizó una búsqueda con la secuencia del gen, lo cual se indica en la tabla 3-2.

Tabla 3-1: Patentes relacionadas con el término de búsqueda *cry1B* que incluyen la secuencia del gen *cry1Ba1* en las reivindicaciones.

TÍTULO Y AÑO	NÚMERO Y PROPIETARIO
Materials and methods for controlling Homopteran pests Abril 28 de 2000	US 6051550A Mycogen Corporation
Modified peptides having toxin enhancing effects Septiembre 8 de 2015	US 9127076 B2 Abdullah Mohd Amir-fursan Adang Michael Univerisidad de Georgia
Novel Genes Encoding Insecticidal Proteins Junio 1 de 2011	EP 199141 B1 Bayer Bioscience Nv
Optimization of Pest Resistance Genes Using Dna Shuffling Diciembre 31 de 2002	US 6500617 B1 Pioneer Hi bred International Inc, Codexis Mayflower, Holdings Llc, Maxygen Inc
Multiple Domain Lepidopteran Toxin Proteins Mayo 27 de 2014	US 8735560 B1 Monsanto Technology Llc

Tabla 3-2: Patentes relacionadas que incluyen la secuencia del gen *cry1Ba1*.

TÍTULO Y AÑO	NÚMERO Y PROPIETARIO
Insecticidal proteins Agosto 8 de 2012	EP2482639A2 WO2011041256A2 Syngenta Participations AG
Novel genes encoding insecticidal proteins Septiembre 16 de 2010	US20100235951A1 Bayer Bioscience
Novel <i>Bacillus thuringiensis</i> gene with lepidopteran activity Mayo 19 de 2011	WO 2011/060009 A2 Pioneer Hi-Bred International, Inc.
Use of <i>cry1ab</i> in combination with <i>cry1Be</i> for management of resistant insects Diciembre 20 de 2012	US20120324606A1 Dow Agrosciences Llc.
Insecticidal Proteins From <i>Bacillus thuringiensis</i> Noviembre 10 de 2011	Bayer Bioscience

Dentro del análisis de libertad de operación se encontró que aunque las patentes directamente relacionadas con el gen *cry1Ba1* son las presentadas en la tabla 3-2, si se hacían búsquedas adicionales con diferentes estrategias, como usar la secuencia de DNA del gen como termino de búsqueda, se encontraron patentes que indirectamente cubrían el gen ya que patentaban la cepa de la cual provenía, o la familia de genes con varios porcentajes de similaridad, o genes clonados en vectores o sintéticos, lo cual se indica en la Tabla 3-1. Por ejemplo, la patente US 6051550 A protege un método que comprende colocar en contacto la toxina Cry1B proveniente de una cepa de Bt para el control de insectos homópteros. Otro ejemplo de este mismo caso es el de la patente US9127076B2, que contempla dentro de sus reivindicaciones la protección de la secuencia que codifique un polipeptido de tipo estándar del gen y la modificación del uso codónico de dicha secuencia, y que este polipéptido se encuentre dentro de una planta transgénica, esta hace parte de una familia de ocho patentes solicitadas en México, Argentina, Australia y la Unión Europea. Adicionalmente, la patente EP1999141B1 hace referencia a un gen quimérico que comprende una región que codifica la proteína Cry1B, una célula vegetal transgénica que comprende el gen quimérico incorporado de forma estable en su genoma, esta es una patente que pertenece a una familia de 14 patentes, solicitada por PCT, entre los que se encuentran en solicitud China, Canadá, Unión Europea y Australia. Por otro lado, la patente US 6500617B1 incluye un método para obtener genes recombinantes resistentes a insectos y su inserción en plásmidos y

ensayos en plantas. Finalmente, la patente US8735560B1 relaciona la secuencia del gen *cry1B* protegiendo métodos de ensayo que permitan el contacto de la proteína con insectos.

Cabe destacar que para el gen *cry1B* que proviene de la cepa de Bt HD2 se solicitó la patente US4695462 en el año de 1987 (Mycogen Corporation), titulada “cellular encapsulation of biological pesticides”. En la Tabla 3-1 se encuentran patentes que están relacionadas con la secuencia del gen *cry1Ba1*, entre las que se encuentra la patente EP2482639A2 la cual hace parte de la solicitud por PCT número WO2011041256A2 (Syngenta), dentro de las reivindicaciones protege una molécula de ácido nucleico que codifica los tipos de proteína Cry1Ba, así como sus modificaciones en secuencias de aminoácidos y la inserción de esta con promotores como patatina, CaMV35S, el promotor RuBP de la carboxilasa subunidad pequeña S-E9 entre otros, y además a los vectores recombinantes que incluyan la secuencia codificante tipo *cry1Ba*, así como su presencia en células bacterianas y vegetales (trigo, girasol, tomate, papa, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada, canola y maíz), esta patente hace parte de una familia de patentes concedidas en Estados Unidos y Australia, con solicitudes de patente en Canadá, México, Israel, China, Unión Europea, Sudáfrica, Rusia, India y Ucrania. La patente US20100235951A1 incluye células vegetales o plantas que comprendan un gen quimérico *cry1C*, y al menos otro gen que codifique proteínas Cry1B o Cry1D, y hace parte de una familia de patentes concedidas en la Unión Europea y China, con solicitud de patente en Argentina, y Canadá. La patente WO 2011/060009 A2 protege una secuencia que posee una identidad del 88% con el gen *cry1Ba* y con los genes *cry1Bc* y *cry1Bb*, y protege una secuencia de nucleótidos caracterizada por al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos codificada, esta hace parte de una familia de patentes solicitadas en Canadá, Brasil y Argentina. La patente US20120324606A1 protege plantas transgénicas, y semillas de estas, que expresen las secuencias de los genes *cry1Ab* junto con el gen *cry1Be*, y una proteína que posea al menos el 99% de identidad con dichas proteínas insecticidas, y hace parte de una familia de patentes concedidas en China, Japón y Australia, solicitadas en Canadá, y solicitudes en Argentina, República de Corea, y México entre otros países (entre los que se encuentra Colombia con el número CO6561804A2), resaltando que el gen de esta patente es el *cry1Be* y no el gen *cry1Ba* utilizado en el diseño de los casetes de expresión. Similarmente a este último caso se observa en la patente US 2011/0277184

A1 donde se reivindica el gen *cry1Bf* (secuencia de nucleótidos, la proteína que codifica o una proteína con una identidad de al menos el 95%) y su utilización en plantas de maíz, arroz, algodón, soya, papa, tomate, tabaco, entre otros. Por otro lado, está la patente WO 2008/073877A2 presentada por la compañía Pioneer Hi-Bred, esta protege una molécula de nucleótidos que sea homóloga al menos en un 99%, así como polipéptidos que sean 99% homólogos y codifiquen para la protoxina, y el uso de estas secuencias de nucleótidos en casetes de expresión, y plantas con estos casetes de expresión, son secuencias que corresponden a genes *cry* aislados de las cepas Bt serovar *sotto*, Bt serovar *chinensis* CT-43, Bt serovar *kurstaki*, Bt serovar *aizawai*, Bt serovar *kurstaki* HD-1. La patente US 8772577 protege una secuencia de nucleótidos de genes *cry* de las cepas Bt *IBL 200* y Bt serovar *kurstaki*., estas especies cuenta con una gran variedad de patentes que protegen todos los genes *cry*, desde la relación con los genes *cry1A* y *cry3A*. Estas patentes señaladas incluyen la secuencia del gen *cry1B* en las reivindicaciones.

Se realizó una búsqueda para determinar si fueron presentadas y aprobadas en Colombia solicitudes de patente para el gen *cry1Ba1*. En la base de datos de la SIC, se hizo seguimiento de las patentes que involucran al *gen cry1B*, encontrando que la patente US20120324606A1, con solicitud CO6561804A2 ingreso por fase nacional el 16 de Junio de 2012 y fue negada entre otros factores porque en nuestro país no se permite patentar genes. Las otras patentes directamente relacionadas descritas anteriormente no tienen solicitudes en Colombia. Se encontró concedida la patente WO2007/140256 a la compañía Monsanto, que protege la secuencia de los genes *cry1A* y *cry2Ab* en plantas y semillas, para el evento de maíz transgénico MON89034, y la patente del gen *cry1Ab* para el evento de algodón CE43-67B concedida a la compañía Syngenta. También se identificó la patente WO 2010/147877 A1 concedida a la compañía Dow Agrosciences, en la cual se protege un polipéptido que comprenda al menos el 90% de identidad con la secuencia aminoácidos codificados por la secuencia del gen *cry1Ab*. En esta búsqueda no se encontró patentes concedidas, ni solicitudes de patentes, para el gen *cry1Ba1* utilizado en el diseño de los casetes de expresión.

En la tabla 3-3 se encuentran las patentes relacionadas con el promotor patatina, la cepa bacteriana *A. tumefaciens* LBA4404, y el vector pCAMBIA2300. Se encuentra la que contiene el registro EP 0375092 B1, que protege el uso del promotor B33 para la

producción de plantas cultivadas de papa, y su uso en cepas bacterianas LBA4404, es una patente que caduco en el año 2009, fue solicitada en España, Alemania, Japón, Estados Unidos, Canadá, entre otros países. Para la cepa de *A. tumefaciens* está la patente US 8334429, es una patente que contempla en sus reivindicaciones también a las cepas EHA101, C58, EHA105, AGL1, que fue concedida a la compañía Pioneer Hi Bred y hace parte de una familia de solicitudes presentadas en China, Australia y Canadá. La patente US20090075358A1 enmarca dentro de sus reivindicaciones la estructura general del vector pCAMBIA (esta patente vence en el año 2029 en Estados Unidos), que pertenece a CAMBIA, una corporación sin ánimo de lucro, que tiene como fines promover innovación para la sociedad, y garantizar acceso común a herramientas de innovación para promover el desarrollo y mejoramiento en las partes académicas y comerciales. La patente WO 1995/014098A1 que incluye el terminador nos en sus reivindicaciones, protege el casete de expresión para transformación de plantas, pero no la secuencia de la región Tnos, así mismo hay otra variedad de patentes que mencionan esta región dentro de constructos génicos, sin proteger su uso. De esta manera no se registran derechos de propiedad intelectual en Colombia, relacionados directamente con las secuencias seleccionadas para el diseño de los casetes de expresión de este trabajo.

Tabla 3-3: Patentes relacionadas con el promotor B33, CaMV35S, terminador nos, plásmido pCAMBIA2300 y cepa LBA4404, publicadas en las bases de datos internacionales consultadas.

NÚMERO	TÍTULO	PROPIETARIO	FECHA
EP 0375092 B1	Potato Tuber Specific Transcriptional Regulation	Inst Fur Genbiologische forschung Berlin	Diciembre 18 de 1989
US5352605	Chimeric for transforming plant cells using viral promoters	Monsanto Company	Octubre 4 de 1994
US 8334429	Auxotrophic <i>Agrobacterium</i> for plant transformation and methods thereof	Pioneer Hi Bred International Inc	Diciembre 30 de 2009
US20090075358 A1	Vectors for transformation of plants	Cambia	Marzo 19 de 2009

El análisis de libertad de operación se realizó haciendo búsquedas en la base de datos independiente, con estrategias de búsqueda lo más completa posible usando términos de búsqueda estándar, y complementándola con términos amplios. La base de datos empleada fue The Lens (<https://www.lens.org/lens/>), esta es una base de datos especializada en el campo de la biotecnología en la que se pueden buscar patentes que citen autores específicos en literatura científica y que sirve como herramienta para realizar mediciones del factor de impacto del trabajo de científico, así como permite el acceso público a patentes solicitadas internacionalmente por estos. Como segunda base de búsqueda se empleó Patentscope (<https://patentscope.wipo.int>), base de datos de la OMPI este sistema permite hacer búsquedas en 3 millones de documentos de patentes, incluyendo 58 millones de solicitudes de patentes internacionales publicadas por PCT, la tercera base de búsqueda fue la base de datos de la Superintendencia de Industria y Comercio (SIC) en la que se pueden consultar patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales presentados en Colombia, al público para consultar el estado de sus solicitudes de patente así como el proceso y el avance de los mismos (<http://www.sic.gov.co/es/banco-patentes>).

Con relación a la geografía de patentes, los casetes de expresión diseñados en este trabajo serán empleados en la transformación de la variedad de papa pastusa suprema para Colombia, la cual tiene un registro nacional mediante resolución del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) 2076 del 26 de julio de 2006, cuyos obtentores son los investigadores Carlos Eduardo Ñústés López y Nelson Estrada Ramos (ver <http://www.papaunc.com/catalogoExtendido.shtml?x=44>). Esta variedad tiene reportada como fecha de liberación el año 2002, y fue producida mediante técnicas de fitomejoramiento convencional con los parentales *S. tuberosum* var. *stoloniferum*, *S. phureja* y *S. tuberosum* var. *parda pastusa*. Posee una alta resistencia hacia patógenos como *Phytophthora infestans*, el virus S de la papa (PVS) y del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV) (Segura *et al.*.,2006). Esta es una variedad que posee androesterilidad lo que la convierte en una variedad ideal para modificación genética ya que evitaría problemas de flujo de genes (López y Chaparro; 2007).

3.2 Diseño de casetes de expresión para papa

3.2.1 Criterios de actividad biológica para la selección del gen *cry1Ba1*

Con respecto a la actividad biológica de la proteína Cry1Ba sobre *T. solanivora*, y la letalidad presentada por otras proteínas Cry, cabe anotar que se han logrado desarrollos importantes que llevan a pensar que esta proteína es una alternativa que vale tener en cuenta en planes de control biológico de este insecto, junto a otras opciones que se están implementando en la agricultura colombiana de la papa. En este sentido, se realizó una revisión bibliográfica de la cual se extrajeron las principales conclusiones, que apoyaran la idea de que el gen *cry1Ba1* es una opción posible para su utilización en transgénesis de papa para control de la polilla guatemalteca de la papa.

Inicialmente se desarrollaron estudios usando proteínas recombinantes sobre larvas de *T. solanivora*. En un proyecto, mediante el uso de cepas recombinantes de *E. coli* que expresaban las protoxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1C, Cry1D y Cry1E, purificadas y evaluadas en larvas de primer estadio de *T. solanivora* a una concentración de 4 µg/cm² (correspondiente a la CL50 de la cepa control positivo Bt *kurstaki* HD1) se logró encontrar resultados de toxicidad mayor para la protoxina Cry1Ac respecto a las demás proteínas evaluadas (porcentaje de mortalidad de 20% a una concentración de 4,37 µg/cm²). Las protoxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1B, Cry1C, presentaron porcentajes de 6,24%, 6,76%, 4,16% y 5,72% respectivamente, las protoxinas Cry1E y Cry1D fueron las menos tóxicas con un promedio de mortalidad del 3,12% (Martínez *et al.*, 2003). En otra experiencia, se identificó la actividad biológica de las toxinas recombinantes activadas con tripsina Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1B y Cry1C sobre larvas en primer estadio de *T. solanivora*, todas se purificaron por cromatografía de columna de intercambio iónico. Esta investigación determinó una CL50 para Cry1Aa de 0,103 µg/cm², para Cry1Ac de 0,107 µg/cm², para Cry1B de 0,085 µg/cm², y para Cry1C de 0,112 µg/cm². Estos datos fueron sometido a un análisis de varianza y no se encontró diferencias significativas entre las proteínas recombinantes demostrando que *T. solanivora* es altamente susceptible las

proteínas Cry1, ya que las mortalidades promedio fueron similares. En este trabajo las proteínas usadas estaban activadas (clivadas) y con un nivel mayor de purificación (cromatografía), lo cual le conferiría una mayor letalidad, debido a que la proteólisis de la protoxina se ha realizado *in vitro* favoreciendo el reconocimiento del receptor. Este efecto de las toxinas activadas tiene una influencia en el resultado final sobre las larvas, ya que el efecto es más rápido. Se comprobó que el mejor resultado lo tenía la proteína Cry1B (Pitre *et al.* , 2008). Posteriormente, evaluando una proteína híbrida Cry1B-Cry1I en el dominio II, obtenidas en un plásmido en *E. coli*, que codificaba la proteína híbrida construida mediante el remplazo de una sección del dominio II del gen *cry1B* con el fragmento correspondiente del gen *cry1I*, se obtuvieron las protoxinas a las que se les realizó un tratamiento con tripsina y purificación. En este trabajo se evidenció que la toxina activada Cry1Ba evaluada individualmente tiene alta actividad hacia *T. solanivora* con un 60% de mortalidad a una dosis de 0,5 µg/cm². En este trabajo se tuvo en cuenta como control positivo la proteína Cry1Ac con la CL50 con 0,389 µg/cm² (López-Pazos *et al.* 2010).

Posteriormente, se investigó la aplicación de proteínas Cry en cultivos de papa, mediante transgénesis vegetal. Una importante iniciativa llevada a cabo por investigadores de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) consistió en el desarrollo de 43 líneas transgénicas con el gen *cry1Ac* en tres variedades de papa denominadas Diacol capiro, parda pastusa y pandeazúcar. Estas líneas transgénicas contenían de una a cuatro copias del gen *cry1Ac*, y niveles de expresión de 0,02 a 17 µg/g de tejido. Los tubérculos obtenidos en este estudio causaron una mortalidad entre 83,7 a 100 % sobre larvas de la polilla guatemalteca de la papa (Valderrama *et al.* 2007). Del estudio se llevaron a campo confinado ocho líneas transgénicas, a las que se les realizó una evaluación molecular a partir de tejido foliar *in-vitro*, y un análisis de número de copias por PCR en tiempo real, y se realizó también pruebas inmunológicas a partir de hojas GM y tubérculos GM establecidas *in-vitro*, evaluaciones a nivel de invernadero de bioseguridad y en parcelas en campo confinado, y se detectó y cuantificó la proteína Cry1Ac, además se realizó una evaluación biológica en campo confinado en las que después de 56 días de sembrado el material y semanalmente, fueron expuestas a *T. solanivora*., Los estudios preliminares de equivalencia sustancial, como resultados de estos estudios se obtuvo que de cuatro

líneas GM de la variedad parda pastusa, tres líneas tenían una copia del gen mientras que en una línea no se logró diferenciar si poseía 1 o 2 copias. De las cuatro líneas GM de Diacol Capiro, dos líneas presentaban entre una a dos copias y una línea dos copias. En la evaluación inmunológica de las plantas *in vitro* de cada línea GM se detectó niveles entre el 2 y el 5% de proteína. En las hojas de plantas en invernadero se detectó proteína en niveles entre el 27 y el 31%, en la variedad Diacol Capiro. En la variedad parda pastusa la línea GM que expuso la mayor cantidad de proteína fue de 31,51% y la línea con menor porcentaje 26,15%, A nivel de expresión en el tubérculo siete de las ocho líneas del estudio GM fueron positivas en los tubérculos a nivel de invernadero, las líneas de Diacol Capiro tuvieron mayor cantidad de proteína con 40.5 y 36.86 %, solo una línea presento valores menores al 1%. Estas diferencias en los porcentajes de expresión en laboratorio e invernadero fueron asociadas a factores ambientales o genéticos como mutaciones, deleciones o arreglos en el ADN. La construcción genética realizada contenía el promotor constitutivo 2X35S, y en otras el promotor de la ubiquitina, por tanto se esperaba la expresión homogénea en todos los tejidos. Tubérculos cosechados en invernadero y almacenados durante seis meses fueron positivos para la proteína Cry1Ac con porcentajes entre el 4,5 y 11,6%, en los tubérculos cosechados en campo confinado se detectó la proteína Cry1Ac en niveles muy bajos con valores inferiores al 1%. (Villanueva *et al.* 2014). En estudios posteriores se encontró que las variedades desarrolladas tienen un elevado nivel de expresión del gen *cry1Ac*, y por presentar una expresión constitutiva, podrían suponer problemas de bioseguridad al liberar la planta comercialmente (Vanegas *et al.* , 2009). Por esta razón se realizó un estudio donde se propuso un sistema de transformación de plantas de papa var. pastusa suprema mediada por *A. tumefaciens*, ya que se ha demostrado que en la transformación de papa mediada por esta bacteria es dependiente del genotipo de la variedad de papa con la que se trabaje, y que permitiera procesos de mejoramiento genético de la var. pastusa suprema. En esta variedad se realizaron ensayos de transformación a partir de explantes internodales mediante el vector pCAMBIA2301 que posee un gen reportero de la beta-glucoronidasa (GUS) y un gen de resistencia a kanamicina, y se obtuvo un porcentaje de transformación de 31 +- 2,5%, y una frecuencia de expresión de GUS del 30%. La var. pastusa suprema posee una característica de androestérilidad, lo que indica que los órganos reproductores masculinos (gametos) de las plantas se encuentran mal desarrollados de tal manera que no se forma polen viable, esta característica biológica es de gran importancia para los organismos modificados genéticamente, ya que en

procesos regulatorios no habrían implicaciones por flujo de genes entre especies relacionadas (Lopez, Chaparro-Giraldo, 2007). Posteriormente, se desarrollaron líneas transgénicas con la variedad androestéril de papa pastusa suprema, transformada con el gen *cry1Ac* potencialmente resistente a *T. solanivora* (Torres *et al.*, 2012). La androesterilidad es una característica de importancia en la bioseguridad ambiental de las plantas modificadas genéticamente para la liberación de estas en centros de origen, o en áreas de alta biodiversidad de los cultivos, debido a que son áreas geográficas donde existe diversidad genética y morfológica en las que se alberga poblaciones de los parentales silvestres de determinadas especies; como parte de la bioseguridad de plantas de papa para su liberación en centros de origen y diversidad se realizan estudios de flujo de genes, y una posible solución para este problema es el uso de una variedad de papa androestéril, como base para pruebas de campo en la región andina, y en Colombia es la única variedad de papa con esta característica, la cual fue obtenida por procesos de fitomejoramiento convencional. Estas líneas fueron transformadas con el método de *A. tumefaciens* en explantes de hoja *in vitro*, con el vector de transformación p1AcPRD el cual contenía dos constructos: un casete marcador de selección que contenía el gen *nptII*, con el terminador *nos*, y un casete de interés que llevaba un gen sintético *cry1Ac*, junto con el promotor CAMV35S 2x. Este plásmido fue donado bajo un acuerdo de material de transferencia (ATM), y el desarrollo de estas líneas permitió la obtención de plántulas transgénicas con eficiencias de transformación de 22 y 37%, con niveles de expresión de proteína Cry1Ac entre 88 a 639 ng/mg de tejido foliar fresco (Torres *et al.*, 2012). Posteriormente, se realizó un estudio de libertad de operación para la línea modificada genéticamente de papa, en cual se concluyó que la libertad de operación estaba afectada por el ATM, y complejidad en los acuerdos interinstitucionales suscritos, debido a que el ATM con el que se recibió el casete de expresión del gen *cry1Ac* (facilitado por la Universidad de Ottawa) contenía las condiciones de uso exclusivo para investigación, prohibición de comercializar o negociar con terceros, el beneficiario se compromete a utilizar el material solo como parte de un plan de investigación acordado entre los científicos beneficiarios participantes, y la institución, y por otro lado está el complejo escenario de negociación entre las cláusulas de propiedad intelectual firmadas por las instituciones participantes (Hincapie, Chaparro-Giraldo, 2014).

Bajo este panorama, se encuentra que aunque en Colombia se han iniciado programas de ingeniería genética para el control de *T. solanivora* con el gen *cry1Ac*, este estudio evidencia la posibilidad de obtener plantas transgénicas de papa con otros genes evaluados, y el gen *cry1B* es un buen candidato para plantas resistentes a *T. solanivora*. En este trabajo se realiza una comparación de los principales resultados obtenidos en las experiencias investigativas ya descritas, se realizó un análisis de la posible concentración letal para el 83% de la población de larvas de la polilla guatemalteca de la papa, correspondiente al peor escenario de actividad de los resultados del estudio de (Valderrama et al., 2007) donde desarrollaron variedades con el gen *cry1Ac*, y así poder tener una posible visión de las posibilidades del gen *cry1Ba1* con respecto al éxito del gen *cry1Ac*, este cálculo se hizo teniendo en cuenta la circunferencia del tubérculo transgénico evaluado de mayor tamaño (3,5 cm de diámetro) y el dato más alto de expresión de proteína (Tabla 3-4).

Tabla 3-4 Comparación de los resultados de los estudios realizados para evaluar la especificidad de las proteínas Cry1Ac y Cry1Ba para control de *T. solanivora*.

ESTUDIO	PROTEÍNA	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	MORTALIDAD %
Martínez et al., 2003	Protoxina Cry1Ac	4,73	20
Pitre et al., 2008	Toxina Cry1B	0,08	50
López-Pazos., 2010	Toxina Cry1Ba	0,5	60
	Toxina Cry1Ac	0,39	50
Valderrama et al., 2007	Protoxina Cry1Ac	17 $\mu\text{g}/\text{g}$ **	83*

* Una dosis de 0,016 μg de toxina sería suficiente para causar la muerte de una larva.

**Expresión de protoxina Cry1Ac por gramo de tubérculo de 3,5 cm de diámetro, aproximadamente 22,4 cm^3 en un área de 38.4 cm^2 . Una dosis de 0,23 μg de protoxina sería suficiente para causar la muerte de una larva. En un tubérculo de papa existiría 37,9 μg de protoxina/ cm^3 .

Finalmente, cabe destacar que en el centro Internacional de la papa (CIP) se generó desarrollos con introducción de genes foráneos en el genoma de la papa, para conferir resistencia a patógenos como *Erwinia sp.* y *Ralstonia sp.* (Ghislain et al., 1998). En esta misma institución Lagnaoui et al. (2000) evaluaron el gen *cry1la1* con plantas transgénicas y larvas de *Phthorimaea operculella*, y *Symmetrischema tangolias*, y en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Perú, trabajan en el desarrollo de líneas transgénicas para el control de *T. solanivora* con variedades Perricholi y la Única. La introducción de variedades GM en los países que son centro de origen y diversidad del cultivo genera cuestionamientos acerca del impacto de estos sobre la

diversidad biológica, lo que lleva a especular que el movimiento de transgenes de papa GM llegaría a las especies que constituyen la biodiversidad, se propone que los organismos GM deberían ser prohibidos en su centro de origen y diversidad. La papa fue domesticada, probablemente, a partir de una especie silvestre que produce tubérculos *S. bukasovii* en Perú, y los países andinos albergan una alta diversidad de papa cultivada que son nativas y de especies silvestres. En el proceso de domesticación de la papa se generaron procesos de flujo de genes, saltos en ploidía e hibridación interespecífica, lo que lleva a especular que el movimiento de transgenes llegaría a las especies que constituyen la biodiversidad. Dentro de los factores que interfieren y condicionan en el flujo de genes se encuentran la fecundidad de la variedad, la coincidencia de floración, la promiscuidad o hibridación entre parientes, insectos polinizadores, germinación de la semilla, supervivencia del híbrido, y la selección del híbrido por el agricultor. En Perú se han realizado análisis acerca de los riesgos de la introducción de una planta de GM en este país como centro de origen, y si estas plantas GM podrían reducir la agrobiodiversidad. En Perú existe separación geográfica en donde las variedades nativas se cultivan en áreas en donde no se producen variedades mejoradas. La exposición de los transgenes de variedades mejoradas de papa hacia papas nativas, o especies silvestres estaría sujeta a condiciones múltiples y se debe tener en cuenta que la papa nativa por su naturaleza mantiene una alta diversidad genética, y se cuenta con colecciones en bancos de germoplasma (Ghislain et al., 1998).

3.2.2 Comparación de las proteínas Cry1Ba1 y Cry1Ac

Con la intención de determinar diferencias relevantes entre la proteína Cry1Ba1 de este trabajo, y la proteína Cry1Ac con la cual ya se tienen desarrollos avanzados en generación de variedades de papa transgénicas en Colombia con resistencia a *T. solanivora*, se realizó un análisis de la estructura primaria y terciaria de ambos polipéptidos. Con respecto a la estructura primaria de ambas proteínas se hizo alineamiento estructural identificando las diferentes clases de aminoácidos, los dominios I, II y III, y residuos relevantes en el reconocimiento del receptor proteico (caderina), ubicados en el loop 2, según el mecanismo de acción de Bt (Pigott y Ellar., 2007) que se indican en la Figura 3-1.

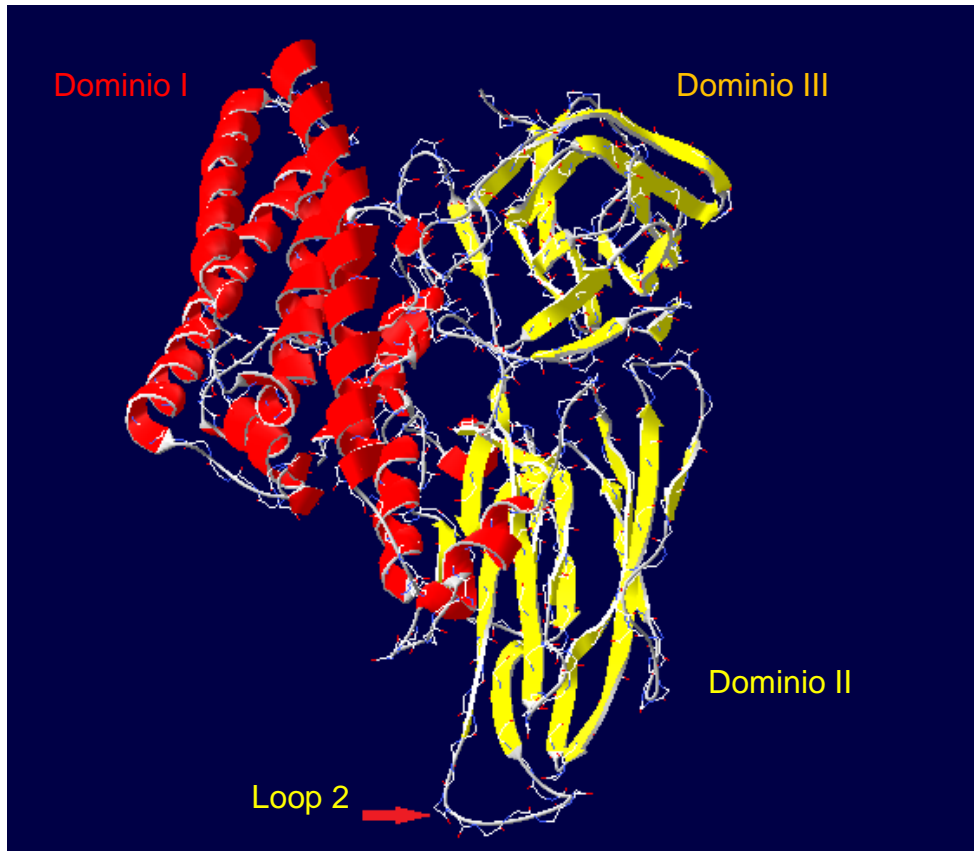
neutros poseen grupos funcionales capaces de formar enlaces de hidrogeno, interaccionan fácilmente con el agua (hidrófilos), pertenecen a esta categoría, serina, treonina, tirosina, asparagina, y glutamina. Los residuos de serina, treonina y tirosina contienen un grupo hidroxilo polar para participar en enlaces de hidrogeno, y en el caso de serina y treonina se unen los hidratos de carbono; para los residuos de asparagina y glutamina, dado que el grupo amida es muy polar, la capacidad de formar enlaces de hidrogeno siempre tienden a encontrarse en la superficie de proteínas en contacto con el agua que los rodea. Los aminoácidos ácidos poseen cadenas laterales con grupos carboxilato, en los que se encuentran los aminoácidos ácido glutámico y el ácido aspártico. En los aminoácidos básicos se encuentra la lisina, arginina e histidina, estos llevan una carga positiva a pH fisiológico, por lo tanto pueden formar enlaces iónicos con los aminoácidos ácidos (Mckee *et al.*, 2003; Mathews *et al.*, 2002).

El cuadro rojo de la (figura 3-1), indica el loop 2 de las toxinas Cry1Ba1 conformado por 11 aminoácidos VYRTESYAGVL (valina, tirosina, arginina, treonina, ácido glutámico, serina, tirosina, alanina, glicina, valina, leucina), y Cry1Ac1 conformado por 14 aminoácidos VYRTLSSTLYRRPF, (valina, tirosina, arginina, treonina, leucina, serina, serina, treonina, leucina, tirosina, arginina, arginina, prolina, fenilalanina), los aminoácidos VYRT de la secuencias Cry1Ac1 y Cry1Ba1 son iguales conformándose por valina, tirosina, arginina y treonina, seguido por el aminoácido E en Cry1Ba1 (ácido glutámico) que es un aminoácido hidrófilo que lleva carga negativa a un pH de 7,0, y en la secuencia de Cry1A, se encuentra el aminoácido L (leucina) conformado por una cadena lateral alifática e hidrófoba. En la secuencias de ambas toxinas sigue el aminoácido S (serina) el cual debido a las características de su cadena lateral es débilmente polar, seguidamente se encuentra un gap de tres aminoácidos en la secuencia de Cry1Ba, que se conforma por los aminoácidos STL (serina, treonina y leucina) en la secuencia de Cry1Ac1 está un residuo de serina, un aminoácido que posee los grupos (-OH) que se unen a los hidratos de carbono, y participa en enlaces de hidrogeno, un factor importante en la estructura proteica, al igual que la treonina (otro aminoácido polar neutro) y la leucina (un aminoácido hidrófobo). En orden en la secuencia sigue el aminoácido Y (tirosina) conformado por cadenas laterales aromáticas, representa un carácter ligeramente hidrófobo, atenuado por grupos polares de sus cadenas laterales y puede ionizarse a pH elevado. Los últimos cuatro aminoácidos de

Cry1Ba1 son AGVL (alanina, glicina, valina y leucina) los cuales son aminoácidos polares neutros de cadena lateral alifática, Caso distinto se ve en Cry1Ac1 que son RPPF (arginina, arginina, prolina y fenilalanina), donde la arginina hace parte de los aminoácidos básicos y sus cadenas laterales están siempre cargadas positivamente en condiciones fisiológicas, es muy polar y en consecuencia suele hallarse en las superficies exteriores de la proteína, la prolina comparte muchas propiedades con los aminoácidos alifáticos, a pesar de ser un aminoácido cíclico, su cadena lateral tiene un carácter principalmente alifático, y por último se encuentra el residuo de fenilalanina, un aminoácido polar de cadena lateral alifática, es uno de los aminoácidos más hidrófobos (Mathews *et al.*, 2002). En general podemos observar que aunque hay variaciones en los residuos de ambas proteínas, las características estructurales que aportan son similares para ambos casos, dado que es una estructura en contacto con el solvente está formada por residuos polares y neutros, con algunos de naturaleza hidrofóbica y apolar, lo cual explica en cierta medida su interacción con otras proteínas como receptores de superficie de la membrana intestinal de insectos, u otras proteínas Cry de la misma naturaleza para formar oligómeros estables que llevan a la formación de poro (Pigott y Ellar, 2007).

El modelo tridimensional de la proteína Cry1Ba1 indica una estructura básica de este tipo de proteínas, con tres dominios estructurales, y el loop 2 expuesto al solvente (Figura 3-2). El dominio II es el principal componente de la proteína Cry que está implicado en el reconocimiento del receptor, y es responsable de la especificidad de una determinada proteína Cry. El dominio II está implicado en las interacciones proteína-receptor a través de los loops, expuestos en la superficie en los ápices de las tres hojas beta, y a través de deleciones en la toxina Cry. La mutagénesis sitio-dirigida es empleada para explorar la participación de regiones de proteínas específicas de Cry, afectando negativamente la acción de la toxina, o dando lugar a la generación de moléculas con toxicidad mejorada, como en el caso de mutaciones en las posiciones N372A o N372G de Cry1Ab, localizadas en el loop 2 del dominio II el cual dio lugar a un aumento de 8 veces en la toxicidad contra *Lymantria dispar*, y un mutante triple situado en el loop 2 N372A, A282G y L283S, mostró un aumento de 36 veces en toxicidad (Rajamohan *et al.*, 1996).

Figura 3-2 Estructura terciaria de la proteína Cry1Ba1. El dominio I está conformado por alfa hélices (rojo), el dominio II contiene beta láminas plegadas antiparalelas, con tres loops, de los cuales el loop 2 sería relevante en el reconocimiento del receptor (flecha roja). El dominio III se encuentra sobre el dominio III, está formado por dos láminas beta plegadas antiparalelas a manera de emparedado, y su función sería aportar a la estabilidad de la proteína (Soberón y Bravo, 2007).



3.2.2 Criterios para la selección de las diferentes secuencias *cry1Ba1* en los casetes de expresión

Para definir las características de la región codificante para la proteína Cry1Ba1 se tuvo en cuenta el mecanismo de acción de las proteínas Cry1 en lepidópteros (Pigott y Ellar, 2007). Un paso crucial para el modo de acción de estas proteínas, después de la ingestión del cristal y la solubilización de la protoxina dependiente del pH (para los órdenes Lepidóptera y Díptera es a pH alcalino, en tanto para los órdenes Coleoptera y Hemíptera tienen un pH neutro a ácido), es que las protoxinas deben ser procesadas por proteasas de insectos que escinden el polipéptido de protoxina, en secuencias específicas (Deist et al., 2014; Peterson et al.; 1994). Para el caso de la proteína Cry1A (~130-135 kDa) el clivaje resulta en una toxina activa de 65 kDa, lo que es causado por proteasas tipo tripsina y quimiotripsina, o similares a tripsina, donde la digestión enzimática elimina una secuencia de ~600 aminoácidos en el C-terminal y los primeros 28 aminoácidos en el N-terminal. Para el orden Lepidóptera y Díptera las principales proteasas intestinales son de tipo serina, mientras que en coleópteros las principales proteasas son cisteína y ácido aspártico proteasas, aunque algunos utilizan catepsina G, e incluyendo también tripsinas y quimiotripsinas (serin proteasas). En el jugo intestinal de diversos insectos se han identificado otras proteasas (elastasas, pronasas, o termolisinas) que han sido reconocidas por sus posibles interacciones con las protoxinas de Bt. El clivaje de la protoxina es un requisito previo para la inserción en la membrana, estas interacciones son complejas y el proceso de activación *in vivo* no está claro, y podría variar debido a las diferencias en proteasas en el intestino de los insectos (Miranda *et al.*, 2001).

La estructura secundaria de la toxina y los receptores de la toxina en las células epiteliales del intestino medio del insecto son importantes determinantes de la especificidad de la toxina, y es probable que la proteólisis diferencial de la protoxina por el jugo intestinal de las diferentes larvas pueden afectar la toxicidad, y ha sido demostrado en diferentes especies (Bah *et al.* 2004). Oppert et al. (1996) demostró que *Plodia interpunctella* (Lepidoptera) puede desarrollar resistencia a las toxinas Cry1A, mediante la alteración de la expresión de proteasas intestinales.

Mohan y Gujar (2003) realizaron el estudio de poblaciones resistentes y susceptibles de la polilla *Plutella xylostella*, en el intestino de esta se encontraron proteasas tipo tripsina con pesos moleculares de 97, 32, 29, 27, y 25 kDa, de estas cinco proteasas la proteasa tipo tripsina (29,5 kDa) fue predominante en la activación de las protoxinas Cry1Aa y Cry1Ab. En un estudio realizado por Díaz-Mendoza (2005) a partir del lumen de primer instar de *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) se encontró tripsinas activas (tripsina tipo I, tripsina IIA, tripsina IIB, y tripsina III) las cuales se diferencian por cambios en aminoácidos de lisina y arginina, y a la manera de responder frente a diferentes inhibidores proteicos.

Los diferentes tipos de tripsinas purificadas en insectos muestran diferencias de especificidad que pueden diferir en su interacción con las proteínas Cry, activando o degradando la toxina a diferentes tasas de tiempo y en consecuencia influyendo en la toxicidad o resistencia. La activación es un paso crucial para conseguir la toxicidad, el tipo y/o abundancia de proteasas en el insecto es importante para contribuir a la especificidad de la toxina. La toxicidad de las proteínas Cry se puede lograr en especies de insectos no objetivo mediante la activación de protoxinas antes de la alimentación, de igual manera las proteasas de los insectos también pueden ser perjudiciales para la toxicidad degradando o inactivando protoxinas por escisión en sitios inapropiados (Deist *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta la importancia de la activación proteolítica de la protoxina Cry1Ba1, era necesario determinar la estructura de la respectiva toxina activa. Exactamente donde realiza el clivaje cada tipo de proteasa depende del tipo de proteína Cry y de la población de proteasas específica de cada insecto (Pigott y Ellar, 2007). Debido a que el mecanismo de acción de las proteínas Cry1 en *T. solanivora* no está completamente dilucidado, en este trabajo se realizó el diseño de cinco casetes de expresión que contemplan escenarios posibles del mecanismo de acción de la proteína Cry1Ba1 en esta plaga. Para este fin se identificó los dominios funcionales de la proteína Cry1Ba1, según la base de datos de dominios conservados del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) lo cual corresponde al a) dominio I N-terminal (aminoácido 89, nucleótido 264), dominio II (aminoácido 267, nucleótido 798) y dominio III (aminoácido 489, nucleótido 1467), c) dominio III (aminoácido 490-636,

nucleótido 1468-1908) (Figura 3-3). Este análisis contempla un putativo procesamiento por proteasas que se ha identificado en otras proteínas Cry.

Figura 3-3: Dominios funcionales de la protoxina Cry1Ba1, a) dominio I, b) dominio II, c) dominio III.

a) `/db_xref="UniProtKB/Swiss-Prot:P0A373"`

```

ORIGIN
1 mtsnrkne iinavsnhsa qmdllpdari edscliaegn nidpfvsast vqtginiagr
61 ilglvgvpfa gqslasfysfl vgelwprgrd qweiflehve qlinqqiten arntalarlq
121 glgdsfrayq qsledwlenr ddartsrsvly tqyialeldf lnampfair nqevpllmvy
181 aqaanhlhll lrdaslfqse fgltsqeiqr yyerqvertr dysdycvewy ntglnslrqt
241 naaswvryng frrdltlgvl dvalfpsyd trtypintsa qltrevytda igatgvnmas
301 mmwvnnnaps fsaieaaair sphlldfleq ltifsassrw sntrhmtyrw ghtiqrspig
361 gglntstgha tntsinpvtl rfasrdvyrt esyagvllwg iylepihgvp tvrnfntnpg
421 nisdrgtany sqpyespglq lkdsetelpp etterpnyses yshrlshigi ilqsrnvvpv
481 yswthrsadr tntignprrit qipmvkasel pggttvvrpg gftggdilir tntggfpir
541 vtvnpgltqr yrigrfryast vdfdfvsvrg gttvnnfrfl rtmnsqdelk ygnfvrraft
601 tpftftqiad iirtsiaqglg gngevyidki eiipvtatfe aeydleraqe avnalftntn
661 prrlktvdtd yhidqvsnlv acsdefcld ekrellekvk yakrlsdern llqdpnftsi
721 nkqpdfistn eqsnftsie qsehgwwgse nitieqgndv fkenyvtlpg tfnecyptyl
781 yqkigeselk aytryqlrgy iedsqdeley lirynakhet ldvpgteslw plsvespigr
841 cgepnrcaph fewnpdlcs crdgekcahh shhfsldidv gctdlhenlg vvvvfkiktq
901 egharlgfle fieekpllge alsrvkraek kwrdrkrelq letkrvytea keavdalrvd
961 sqydrldqad nigmihaadk lvhrireayl selvpivgvn aeifeeleg h iitaislyda
1021 rrvvkngdfn ngltcwnvkg hvdvqsshrr sdvipewea evsqavrvcp gcgyilrvta
1081 ykegygegc tviheienntd elkfknree evyptdtgtc ndytahagta gcadacns
1141 agyedayevev dtasvnykpt yeetytdvr rdnhceydr g yvnyppvpag yvtkeley
1201 etdtvwieig etegkfivds velllme
//

```

`/region_name="Endotoxin_N"`
`/note="delta endotoxin, N-terminal domain; pfam03945"`
`/db_xref="CDD: 281878 "`

b) `/db_xref="UniProtKB/Swiss-Prot:P0A373"`

```

ORIGIN
1 mtsnrkne iinavsnhsa qmdllpdari edscliaegn nidpfvsast vqtginiagr
61 ilglvgvpfa gqslasfysfl vgelwprgrd qweiflehve qlinqqiten arntalarlq
121 glgdsfrayq qsledwlenr ddartsrsvly tqyialeldf lnampfair nqevpllmvy
181 aqaanhlhll lrdaslfqse fgltsqeiqr yyerqvertr dysdycvewy ntglnslrqt
241 naaswvryng frrdltlgvl dvalfpsyd trtypintsa qltrevytda igatgvnmas
301 mmwvnnnaps fsaieaaair sphlldfleq ltifsassrw sntrhmtyrw ghtiqrspig
361 gglntstgha tntsinpvtl rfasrdvyrt esyagvllwg iylepihgvp tvrnfntnpg
421 nisdrgtany sqpyespglq lkdsetelpp etterpnyses yshrlshigi ilqsrnvvpv
481 yswthrsadr tntignprrit qipmvkasel pggttvvrpg gftggdilir tntggfpir
541 vtvnpgltqr yrigrfryast vdfdfvsvrg gttvnnfrfl rtmnsqdelk ygnfvrraft
601 tpftftqiad iirtsiaqglg gngevyidki eiipvtatfe aeydleraqe avnalftntn
661 prrlktvdtd yhidqvsnlv acsdefcld ekrellekvk yakrlsdern llqdpnftsi
721 nkqpdfistn eqsnftsie qsehgwwgse nitieqgndv fkenyvtlpg tfnecyptyl
781 yqkigeselk aytryqlrgy iedsqdeley lirynakhet ldvpgteslw plsvespigr
841 cgepnrcaph fewnpdlcs crdgekcahh shhfsldidv gctdlhenlg vvvvfkiktq
901 egharlgfle fieekpllge alsrvkraek kwrdrkrelq letkrvytea keavdalrvd
961 sqydrldqad nigmihaadk lvhrireayl selvpivgvn aeifeeleg h iitaislyda
1021 rrvvkngdfn ngltcwnvkg hvdvqsshrr sdvipewea evsqavrvcp gcgyilrvta
1081 ykegygegc tviheienntd elkfknree evyptdtgtc ndytahagta gcadacns
1141 agyedayevev dtasvnykpt yeetytdvr rdnhceydr g yvnyppvpag yvtkeley
1201 etdtvwieig etegkfivds velllme
//

```

`/region_name="delta_endotoxin_C"`
`/note="delta-endotoxin C-terminal domain may be associated with carbohydrate binding functionality; cd04085"`
`/db_xref="CDD: 271151 "`

c) `/db_xref="InterPro:IPR005638"`
`/db_xref="InterPro:IPR005639"`
`/db_xref="InterPro:IPR008979"`
`/db_xref="InterPro:IPR015790"`
`/db_xref="UniProtKB/Swiss-Prot:P0A373"`

```

ORIGIN
1 mtsnrkne iinavsnhsa qmdllpdari edscliaegn nidpfvsast vqtginiagr
61 ilglvgvpfa gqslasfysfl vgelwprgrd qweiflehve qlinqqiten arntalarlq
121 glgdsfrayq qsledwlenr ddartsrsvly tqyialeldf lnampfair nqevpllmvy
181 aqaanhlhll lrdaslfqse fgltsqeiqr yyerqvertr dysdycvewy ntglnslrqt
241 naaswvryng frrdltlgvl dvalfpsyd trtypintsa qltrevytda igatgvnmas
301 mmwvnnnaps fsaieaaair sphlldfleq ltifsassrw sntrhmtyrw ghtiqrspig
361 gglntstgha tntsinpvtl rfasrdvyrt esyagvllwg iylepihgvp tvrnfntnpg
421 nisdrgtany sqpyespglq lkdsetelpp etterpnyses yshrlshigi ilqsrnvvpv
481 yswthrsadr tntignprrit qipmvkasel pggttvvrpg gftggdilir tntggfpir
541 vtvnpgltqr yrigrfryast vdfdfvsvrg gttvnnfrfl rtmnsqdelk ygnfvrraft
601 tpftftqiad iirtsiaqglg gngevyidki eiipvtatfe aeydleraqe avnalftntn
661 prrlktvdtd yhidqvsnlv acsdefcld ekrellekvk yakrlsdern llqdpnftsi
721 nkqpdfistn eqsnftsie qsehgwwgse nitieqgndv fkenyvtlpg tfnecyptyl
781 yqkigeselk aytryqlrgy iedsqdeley lirynakhet ldvpgteslw plsvespigr
841 cgepnrcaph fewnpdlcs crdgekcahh shhfsldidv gctdlhenlg vvvvfkiktq
901 egharlgfle fieekpllge alsrvkraek kwrdrkrelq letkrvytea keavdalrvd
961 sqydrldqad nigmihaadk lvhrireayl selvpivgvn aeifeeleg h iitaislyda
1021 rrvvkngdfn ngltcwnvkg hvdvqsshrr sdvipewea evsqavrvcp gcgyilrvta
1081 ykegygegc tviheienntd elkfknree evyptdtgtc ndytahagta gcadacns
1141 agyedayevev dtasvnykpt yeetytdvr rdnhceydr g yvnyppvpag yvtkeley
1201 etdtvwieig etegkfivds velllme
//

```

`/region_name="Endotoxin_M"`
`/note="delta endotoxin; pfam00555"`
`/db_xref="CDD: 278954 "`

3.2.3 Diseño *in silico* de casetes de expresión basados en el gen *cry1Ba1*

Se diseñaron cinco casetes de expresión para el gen *cry1Ba1* (Tabla 3-5), que posiblemente conferirían resistencia a *T. solanivora*.

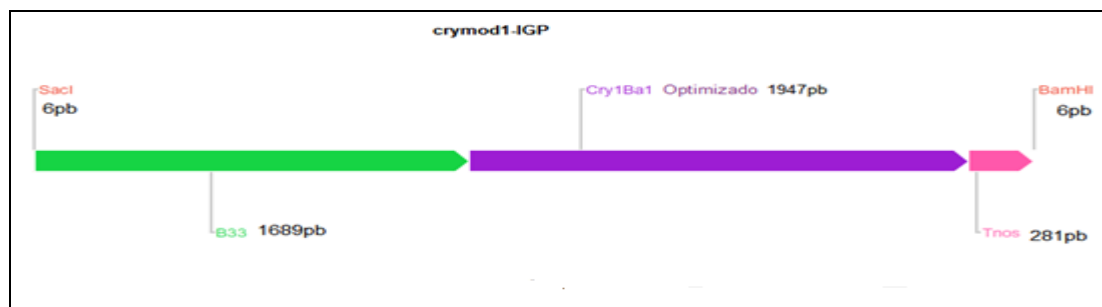
Tabla 3-5: Estructura de los casetes de expresión de este trabajo.

CASETE DE EXPRESIÓN	NOMBRE	PROMOTOR	TAMAÑO DEL GEN <i>cry1Ba1</i>	TERMINADOR	TAMAÑO
1	Gen <i>cry1Ba1</i> sin fragmento C-terminal con ajuste de uso codónico	B33	1947pb	T-nos	3929pb
2	Gen <i>cry1Ba1</i> sin fragmento C-terminal con ajuste de uso codónico en los primeros 87 aminoácidos	B33	1947pb	T-nos	3929pb
3	Gen <i>cry1Ba1</i> codificante de protoxina, con ajuste de uso codónico	B33	3687pb	T-nos	5669pb
4	Gen <i>cry1Ba1</i> codificante de toxina activa (clivaje en los extremos N-terminal y C-terminal) con ajuste de uso codónico	B33	1647pb	T-nos	3629pb
5	Gen <i>cry1Ba1</i> sin fragmento C-terminal con ajuste de uso codónico	CaMV35S	1947pb	T-nos	2602pb

A continuación se describe los parámetros de diseño de cada casete de expresión. La composición del casete de expresión 1 implica al gen *cry1Ba1* sin fragmento C-terminal

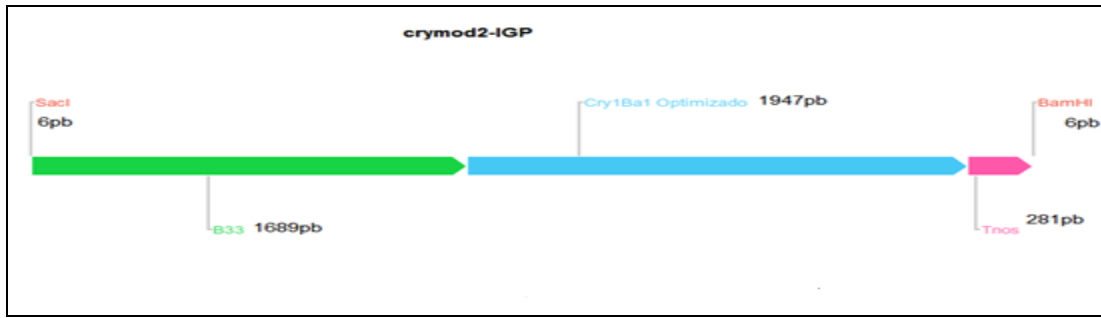
y con ajuste de uso codónico, está determinada por un total de 3929 pb, que comprenden el promotor B33 con 1689 pb, el terminador T nos con 281pb y los sitios de reconocimiento de las enzimas *SacI* y *BamHI*. La secuencia del gen de interés está conformada por la región codificante para los primeros 1947 aminoácidos de la proteína *Cry1Ba1*, que corresponde a la toxina activada únicamente para el extremo C-terminal, con ajuste completo de uso codónico en la secuencia completa, favoreciendo la preferencia de codones de la planta, reducción de sitios críticos de splicing y poliadenilación prematuros, tomando como una posibilidad que en el intestino medio de *T. solanivora* no se encuentren las proteasas necesarias para el clivaje del fragmento N-terminal, produciendo una toxina activa que se uniría a los receptores de la microvellosidad apical de las células intestinales (figura3-4).

Figura 3-4: Casete de expresión 1 con el gen *cry1Ba1* sin fragmento C-terminal y ajuste de uso codónico.



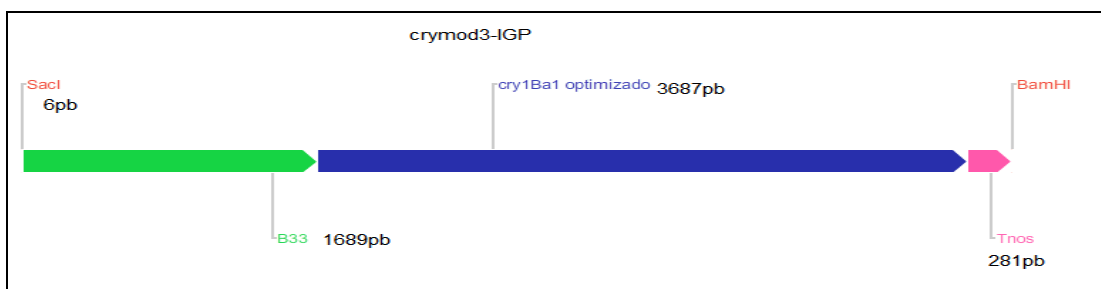
El casete de expresión 2 corresponde al gen *cry1Ba1* sin fragmento C-terminal con ajuste de uso codónico solo para los primeros 87 aminoácidos, contiene el promotor B33 que consta de 1689 pb, y los primeros 1947pb del gen *cry1Ba1*, con la diferencia de que a esta secuencia se le realizó la modificación de uso codónico en los primeros 261 nucleótidos que codifican los 87 aminoácidos iniciales del extremo N-terminal de la protoxina, y el terminador Tnos compuesto por 281 pb, el tamaño del casete de expresión es de 3929 pb en las que se incluyen las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *SacI* y *BamHI* ubicadas en la región del polilinker del plásmido pCAMBIA2300. El diseño de esta construcción se realizó asumiendo que el mecanismo de transcripción de la planta solo necesita ajuste de uso codónico en los primeros aminoácidos para sintetizar (Breitler *et al*; 2000; 1992; Vega, 2010) (Figura 3-5).

Figura 3-5: Casete de expresión 2 con el gen *cry1Ba1* sin fragmento C-terminal y ajuste de uso codónico en los primeros 87 aminoácidos.



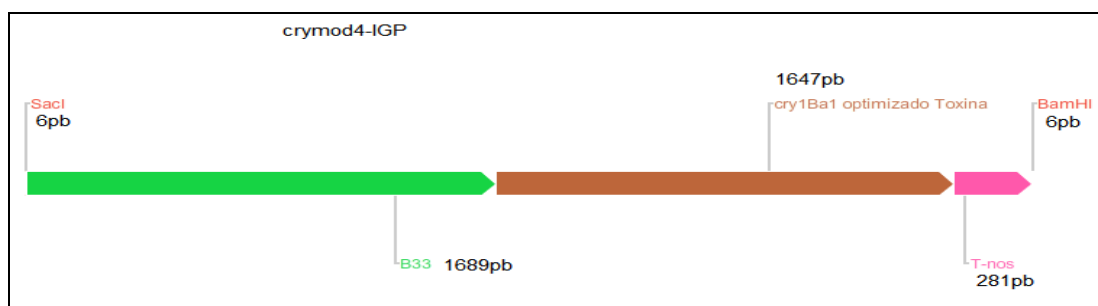
El casete de expresión 3 está conformado por el promotor B33 y el terminador Tnos, los sitios de reconocimiento para las enzimas Sacl y BamHI, la secuencia de interés seleccionada para este diseño fue la secuencia completa del gen *cry1Ba1* que codifica para la protoxina Cry1Ba1, esta secuencia tiene ajuste completo de uso codónico favoreciendo factores de la transcripción en la planta de papa, y basados en el mecanismo descrito para otros insectos lepidópteros con proteínas Cry, en el que esta protoxina producida por la planta serían ingeridas y solubilizadas por las larvas de *T. solanivora*, y asumiendo que el insecto cuenta con las proteasas que clivan fragmentos N-terminal y C-terminal, dejando una toxina activa de aproximadamente 60 kDa, que se uniría a los receptores de membrana del epitelio intestinal (Figura 3-6).

Figura 3-6: Casete de expresión 3, con el gen *cry1Ba1*, codificante de la correspondiente protoxina, con ajuste de uso codónico.



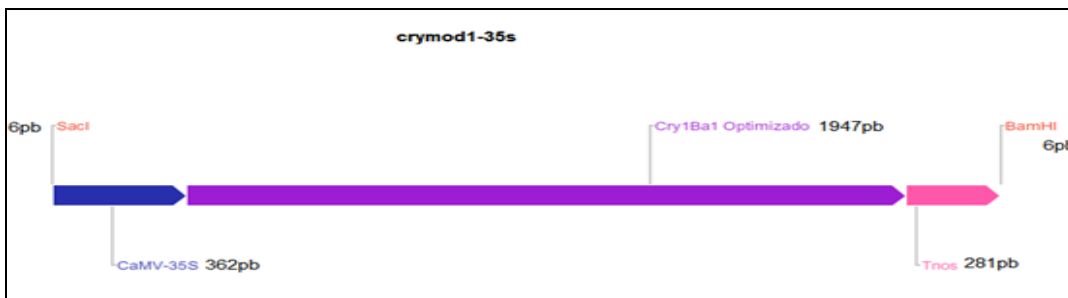
El diseño del casete de expresión 4 contiene el gen *cry1Ba1* codificante de toxina activa para los extremos N-terminal y C-terminal con ajuste de uso codónico. Sería reconocida por los receptores de membrana en el intestino de las larvas de *T. solanivora*, directamente, sin necesidad de pasar por proceso de solubilización y clivaje (figura3-7).

Figura 3-7: Casete de expresión 4 conteniendo el gen *cry1Ba1* codificante de toxina activa en el extremo N-terminal y C-terminal con ajuste de uso codónico.



El casete de expresión 5 (Figura 3-8) corresponde al gen *cry1Ba1*, sin fragmento C-terminal y con ajuste de uso codónico, está determinada por un total de 2602 pb, que comprenden el promotor CaMV35S con 346 pb, el terminador *Tnos* con 281 pb y los sitios de reconocimiento de las enzimas *Sacl* y *BamHI*. La secuencia del gen de interés está conformada por la región codificante para los primeros 1947 aminoácidos de la proteína *Cry1Ba1*, que corresponde a la toxina activada únicamente para el extremo C-terminal, con ajuste completo de uso codónico en la secuencia completa, favoreciendo la preferencia de codones de la planta, reducción de sitios críticos de splicing y poliadenilación prematuros, de la misma manera que el casete de expresión 1, tomando como una posibilidad que en el intestino medio de *T. solanivora* no se encuentren las proteasas necesarias para el clivaje del fragmento N-terminal, produciendo una toxina activa que se uniría a los receptores de la microvellosidad apical de las células intestinales, esta construcción posee el promotor constitutivo (CaMV 35S) más utilizado en transformación genética de plantas.

Figura 3-8: Casete de expresión 5 con el gen *cry1Ba1* sin fragmento C-terminal y ajuste de uso codónico.



3.2.4 Modificaciones de uso codónico de las secuencias

Cada casete de expresión tiene ajuste de uso codónico para expresión en plantas de papa. Estos casetes se describen a continuación:

- **Casete de expresión 1, o gen *cry1Ba1* sin fragmento C-terminal con ajuste de uso codónico.** Para el diseño de esta construcción se utilizaron los primeros 1947 pb del gen codificante de protoxina Cry1Ba1 (3687 pb), que corresponde a la región codificante con clivaje virtual del extremo C-terminal (Breitler et al; 2000). Como se observa en la (tabla 3-6), la secuencia sin modificar del gen *cry1Ba1* tenía un valor CAI 0.72 y un porcentaje de GC de 39.34, observándose en especial que en el tercer codón la concentración GC era del 24.34%. Se realizó la modificación para ajustar la secuencia al uso codónico de papa, aumentando el porcentaje de GC, logrando un valor promedio en la secuencia del 45.91%, intentando lograr un porcentaje más cercano al 47% se observó que el valor CAI disminuía, por esta razón se establecieron valores promedio para CAI y porcentaje de GC teniendo en cuenta que ambos parámetros de modificación de uso codónico son importantes. La secuencia original tenía un Nc de 44.37, lo que indica que no había un uso codónico sesgado ya que hacía 44 de 61 codones posibles, sin embargo con la modificación este parámetro quedó en 55.8, lo que puede brindar mayor versatilidad al proceso de traducción. A la secuencia de 1947 pb del gen *cry1Ba1* se le cambiaron 452 bases (23.21%) y 372 codones (69.64%). Se realizó el análisis de señales cripticas de

splicing y sitios de poliadenilación prematuros. En la secuencia original se identificaron 23 sitios de poliadenilación prematuros (1 AATAAA, 1GATAAA, 2 TATAAA, 1ACTAAA, 2 ATATAA, 1 AACAAA, 2 AATCAA, 2 AATGAA, 1 AATTAA, 1 AATACA, 1 AATAGA, 1 AATATA, 1 AATAAC, 3 AATAAT, 1 AATATT, 1 AATAAA, 1 TTTGTA) (figura 3-3), y 13 sitios de splicing crípticos (2 GCAGG, 7 CAGG, 4 AGGTA). La secuencia del gen modificado tiene cuatro sitios de sitios de poliadenilación prematuros (1 AACAAA, 2 AATCAA, 1 AATAAT) y, 1 sitio de splicing críptico (CAGG).

Tabla 3-6: Resultado de la optimización de uso codónico del gen *cry1Ba1* para el casete de expresión 1

	CAI	%GC total	%GC codón 1	%GC codón 2	%GC codón 3	Nc
No optimizado	0.725	39.342	49.306	44.376	24.345	40.319
Optimizado	0.691	54.916	49.768	44.376	43.605	55.882

- **Casete de expresión 2, o gen *cry1Ba1* sin fragmento C-terminal y ajuste de uso codónico en los primeros 87 aa:** se tomó una parte de la secuencia del gen iniciando en el nucleótido 1 y terminando en el nucleótido 1947 de la secuencia del gen completo *cry1Ba1* (compuesto por 3687 pb). Se realizaron modificaciones de la secuencia en los primeros 87 nucleótidos, a esta secuencia se le cambiaron 18 bases (0.92%) y 17codones (2.77%). La secuencia inicial contenía un valor CAI: 0.72 con un porcentaje de GC del 39.34% (Tabla 3-7), y los sitios de splicing crípticos son los mismos del caso anterior. La secuencia del gen modificado tiene un valor CAI: 0.75 y una concentración GC del 39.65%, y por ser modificada solo en los primeros nucleótidos es muy similar a la secuencia inicial con 14 sitios sitio de splicing crípticos (2 GCAGG, 8 CAGG, 4 AGGTA) y 23 sitios de poliadenilación prematuros (1AATAAA, 1GATAAA, 1TATAAA, 1ACTAAA, 2ATATAA, 1 AACAAA, 2AATCAA, 1 AATGAA, 2 AATTAA, 1 AATACA, 1 AATAGA, 1 AATATA, 1 AATAAC, 4 AATAAT, 1AATATT, 1AATAAA, 1TTTGTA), igual a la secuencia inicial. El Nc inicial de la secuencia del gen era 40.31, en comparación con la secuencia final 44.50 no es una diferencia marcada, pero mejora el sesgo de uso codónico.

Tabla 3-7: Resultado de la optimización de uso codónico del gen *cry1Ba1* para el casete de expresión 2.

	CAI	%GC Total	%GC codón 1	%GC codón 2	%GC codón 3	Nc
No optimizado	0.725	39.342	49.306	44.376	24.345	40.310
Optimizado	0.753	39.650	49.460	44,376	25.115	44.508

- **Casete de expresión 3, o gen *cry1Ba1* codificante de protoxina con ajuste de uso codónico.** Se tomó la secuencia del gen *cry1Ba1* que abarca el nucleótido 1 al 3687, y que codifica para la protoxina Cry1Ba1. A esta secuencia se le cambiaron 896 bases (24.30%) y 589 codones (47.9%). La secuencia inicial contenía un valor CAI de 0.729 y de GC del 39.43%, el número efectivo de codones paso de 48.17 a 55.80, una amplia variedad de codones (tabla 3-8), con 21 sitios de splicing crípticos (3 GCAGG, 12 CAGG 6 AGGTA), 36 sitios de poliadenilación prematuros (1 AATAAA, 2 GATAAA, 2 TATAAA, 2 ACTAAA, 3 ATATAA, 2 AAAAAA, 2 AACAAA, 2 AAGAAA, 2 AATCAA, 2 AATGAA, 3 AATTAA, 2 AATACA, 1 AATAGA, 1 AATATA, 1 AATAAC, 1 AATAAG, 4 AATAAT, 1 AATATT, 1 AATAAA, 1 TTTGTA), la secuencia del gen modificado contiene un valor CAI de 0.725 y porcentaje de GC de 44.20%, se mantuvieron las concentraciones en los codones 1 y 2 y se aumentó la concentración del codón 3 en un 13.58%.

Tabla 3-8: Resultado de la optimización de uso codónico del gen *cry1Ba1* para el casete de expresión 3.

	CAI	%GC Total	%GC codón 1	%GC codón 2	%GC codón 3	Nc
No optimizado	0.729	39.43	51.017	40.358	26.932	48.176
Optimizado	0.725	44.209	51.749	40.358	40.520	55.806

- **Casete de expresión 4, o gen *cry1Ba1* codificante de toxina activa en el N-terminal y C-terminal con ajuste de uso codónico.** Este gen fue diseñado con la región que codifica específicamente para la toxina activada que comprende los nucleótidos 265 a 1908 (1641 pb) mas 6 bases correspondientes a un codón de parada e inicio (1647pb). A esta secuencia se le cambiaron 366 bases (22.22%) y 326 codones (59.38%). Inicialmente esta secuencia contenía un porcentaje de GC de 39.04%, y un valor CAI de 0.73, con 21 sitios de poliadenilación prematuros (1 AATAAA, 1 GATAAA, 1 TATAAA, 1 ACTAAA, 2 ATTAAA, 1 AACAAA, 2 AATCAA, 1 AATGAA, 1 AATTAA, 1 AATACA, 1 AATAGA, 1 AATATA, 1 AATAAC, 3 AATAAT, 1 AATATT, 1 AATAAA, 1 TTTGTA) y con 13 sitios de splicing crípticos (2 GCAGG, 7 CAGG, 4 AGGTA). La secuencia final contiene un valor CAI de 0.70 con porcentaje de GC de 43.23%, y en la modificación de esta secuencia se redujo el índice de adaptación codónico para lograr favorecer el porcentaje de GC de la secuencia. El Nc de la secuencia inicial estaba sesgado en comparación con las secuencias iniciales de los otras secuencias *cry1Ba1* utilizadas, con un parámetro de 37.40 modificado a 52.88 (Tabla 3-9).

Tabla 3-9: Resultado de la optimización de uso codónico del gen *cry1Ba1* para el casete de expresión 4.

	CAI	%GC Total	%GC codón 1	%GC codón 2	%GC codón 3	Nc
No optimizado	0.730	39.040	48.816	44.626	23.679	37.406
Optimizado	0.702	43.230	49.726	44.626	35.337	52.880

- **Casete de expresión 5, o gen *cry1Ba1* codificante de toxina activa en el N-terminal y C-terminal con ajuste de uso codónico.** Para el diseño de esta construcción se utilizaron los primeros 1947 pb del gen codificante de protoxina Cry1Ba1 (3687 pb), que corresponde a la región codificante con clivaje virtual del extremo C-terminal, esta secuencia corresponde a la empleada en el casete de expresión 1y conserva los ajustes de uso codónico, sitios de poliadenilación prematuros, sitios de splicing crípticos y valor CAI (Tabla 3-10).

Tabla 3-10: Resultado de la optimización de uso codónico del gen *cry1Ba1* para el casete de expresión 5.

	CAI	%GC total	%GC codón 1	%GC codón 2	%GC codón 3	Nc
No optimizado	0.725	39.342	49.306	44.376	24.345	40.319
Optimizado	0.691	54.916	49.768	44.376	43.605	55.882

Para realizar la modificación de uso codónico se utilizó el software Visual Gene Developer 1.3 (visualgenedeveloper.net/). Este se basa en el algoritmo de Monte Carlo y utiliza una tabla de uso codónico para reemplazar los codones originales manteniendo la identidad de los aminoácidos (Jung & McDonald, 2011). Las secuencias modificadas de cada casete de expresión se ensamblaron con los demás elementos (promotor B33, promotor CaMV25S, secuencias optimizadas del gen *cry1Ba1*, y terminador nos) consecutivamente, y se realizó la búsqueda de sitios de restricción para seleccionar y se seleccionaron las enzimas *SacI* y *BamHI* para los bordes, de tal manera que fueran sitios de restricción que se encontraran en la región polilinker, y en ninguna otra región de los casetes de expresión diseñados. A través de la herramienta ORF del software Gene Designer 2.0 se identificaron las posibilidades del marco abierto de lectura de la secuencia nucleotídica, y la respectiva longitud de aminoácidos de la proteína que codifica cada una de las opciones. Por medio de la herramienta ORF finder del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>) se corroboró que el ORF de cada uno de los genes fuera correcto.

Mediante el software VGD 1.3 se realizaron cambios iterativos en el ORF de la secuencia codificante del gen *cry1Ba1*, favoreciendo los codones preferentes de la papa. Teniendo en cuenta que cuando se realizan cambios de uso codónico, existen diferentes secuencias de nucleótidos que pueden codificar para una misma secuencia de aminoácidos, cada aminoácido podría ser codificado por un promedio de tres codones diferentes, por esto para las secuencias hay parámetros que permiten determinar el sesgo codónico. El número efectivo de codones *Nc* (Wright, 1990) es un parámetro que mide el grado de sesgo codónico, este es un número entre 20 y 61, donde 20 significa extremadamente sesgado, y 61 un sesgo o patrón de uso igual entre los codones

sinónimos. Dentro de la importancia de la modificación de uso codónico en genes *cry*, se ha descrito la transformación genética de brócoli (*Brassica oleracea*) con los genes *cry1Ba1* y *cry1Ca5*, demostrando que su expresión confería alta mortalidad para las larvas de *Pieris rapae* y *P. xylostella* en 48 horas (Christey et al. 2006). En transformación de plantas con genes *cry* se han obtenido mejores niveles de expresión de ARNm y proteína con genes modificados (Li et al. 2013). En una comparación de los niveles de expresión del gen *cry1A* con su contraparte modificada parcial y totalmente en tabaco y tomate, se encontró que el gen parcialmente modificado presentaba 10 veces más contenido de proteína en la planta, y el modificado completamente 100 veces más en comparación con el gen nativo *cry1A* (Perlak et al., 1991). En papa usando el gen *cry3A* se desarrolló líneas transgénicas con variantes de este gen adaptadas para el uso codónico de la papa, obteniendo una alta mortalidad de larvas para el escarabajo colorado de la papa (Mi et al. 2015).

La concentración GC es una de las mayores diferencias entre genes *cry* y genes en plantas, este es un factor que se tuvo en cuenta en el diseño de casetes de expresión, y que está relacionado con el uso codónico. Se ha descrito mejora de genes *cry1B* y *cry3A* con base en la importancia de la concentración GC del gen modificado con respecto al nativo, teniendo en cuenta que los genes en plantas tienen un contenido promedio de GC del 47% (Sutton et al 1992; Breitler et al; 2000). Se sabe, que el contenido de GC es más alto en plantas monocotiledóneas que en dicotiledóneas, lo cual es más notorio en el tercera base de cada codón (Kawabe y Miyashita, 2003; Murray et al., 1989). La base de datos Kazusa reporta que *S. tuberosum* L. contiene un porcentaje de GC de 42.4%, en el primer codón 50.45%, su segundo codón 39.18%, y en el tercer codón 37.57%. Para discriminar el uso codónico entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, se reporta que en monocotiledóneas 16 de 18 aminoácidos favorecen GC en esta posición, mientras que en dicotiledóneas únicamente 7 de 18 aminoácidos posibles lo hacen (Murray et al., 1989).

En los genes *cry* se pueden encontrar regiones AATAAA que son señales de poliadenilación, estas usualmente limitan a la región 3' no traducida en genes eucariotas. La secuencia ATTTA, secuencia que desestabiliza el ARNm de hemoglobina (Shaw y Kamen, 1986), no es frecuente en secuencias de codificación en plantas, pero se puede encontrar repetitivamente en las secuencia del gen *cry*. Varias secuencias de A' y T', son

comunes en intrones en plantas pero poco comunes en exones. Se sabe que secuencias ricas en AT dentro del gen podrían causar terminación transcripcional prematura, y niveles de mRNA reducidos (Gustafsson *et al.*, 2012), por ello es común evitar este tipo de secuencias cuando se modifica la secuencia de genes, las regiones ricas en AT (potenciales sitios de poliadenilación), secuencias ricas en ATTTA también deben evitarse. No se sabe cuál de estos factores es el más importante, por lo tanto todos los factores mencionados se consideraron igualmente importantes (Sutton *et al.*, 1992).

No existe una regla clara sobre cuanto modificar una secuencia. La mayoría de los genes usados en transgénesis vegetal son modificados para favorecer el uso codónico de la planta receptora, pero los autores no indican valores CAI ni muestran las secuencias finales de los genes posteriores a la edición realizada para genes que han sido utilizados en el desarrollo de líneas transgénicas comerciales. Kucho *et al.* (2013) mejoraron la eficiencia de traducción del gen que confiere resistencia a la gentamicina utilizando una versión modificada, cuyo valor de CAI era de 0.835.

Utilizando mejoramiento de uso codónico para optimizar expresión de proteínas Cry se realizó la obtención de papa Bt con el gen *cry3A* de Bt *tenebrionis* para el control de *L. decemlineata* (Perlak *et al.*, 1991). La compañía Monsanto lanzo por primera vez (1993) papa Bt con el gen *cry3A* bajo la marca Newleaf® en Estados Unidos. En el año 1997 se da la liberación de papas Bt *cry3A* combinada con la característica de resistencia al virus del enrollamiento de la hoja con el nombre comercial a NewLeaf Y® y NewLeaf Plus® (Thomas *et al.*, 1997, ISAAA, 2016) estas variedades no tuvieron el éxito comercial esperado por la compañía Monsanto, por factores relacionados con el ahorro de semilla por parte de los agricultores y la entrada de imidicloprid que dio un excelente control para *L. decemlineata*, además de las campañas organizadas en contra de la tecnología transgénica (Simon, 2003), lo cual llevó a la desaparición comercial de cultivos de papa Bt debido a que su aceptación no fue la misma que se obtuvo con el algodón Bt, maíz Bt y soya Bt. Para el control de plagas en el cultivo de papa se requiere de múltiples insecticidas y ensayos en papa Bt ha sido éxito en Sudáfrica y Egipto; la universidad del estado Michigan ha trabajado en resistencia a *P. operculella*, en China la Universidad de Lanzhou y el Instituto de Microbiología de Beijing ha trabajado en el desarrollo de líneas Bt con el gen *cry3A* para *L. decemlineata* (Mi *et al.* 2015). La tecnología de papa

GM ha tenido deficiencias en su implementación debido a los permisos y los procesos regulatorios para su liberación comercial (Grafius y Douches, 2008).

3.3 Caracterización fenotípica y molecular de cepas recombinantes de *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli*

Se realizó la transformación de bacterias usando los casetes de expresión 1, 2 y 5 para establecer el protocolo de caracterización, estos casetes que estaban disponibles al término de este trabajo. La transformación se hizo mediante electroporación de las bacterias de *E. coli*. Se realizó una siembra por agotamiento en medio de selección LB con kanamicina 50 mg/L, y se procedió a caracterización molecular de estas cepas por PCR. Las bacterias transformadas de *A. tumefaciens* se sembraron en medio de selección con kanamicina 50 mg/L y rifampicina 50 mg/L, luego se realizó la caracterización molecular igualmente mediante PCR. Los primers utilizados para las PCR se muestran en la tabla 3-11, son específicos para el gen y regiones de interés en las construcciones diseñadas.

Tabla 3-11: Primers para caracterización molecular de cepas recombinantes de *E. coli* DH5alfa y *A. tumefaciens* LBA4404 con los casetes de expresión 1, 2 y 5.

REGIÓN DE AMPLIFICACIÓN	NOMBRE DEL PRIMER	SECUENCIA	TM
Promotor B33	PAT	FW: TGCAAGCTATGTGTCACCAC RV: ACCGCAACTGTCGTTAGTGA	57
Promotor CaMV25S	P35S	FW: GCTCCTACAAATGCCATCA RV: GATAGTGGGATTGTGCGTCA	54
Terminador T-nos	TNOS	FW: GAATCCTGTTGCCGGTCTTG RV: ATCGCGCGTTTGATCCTATT	56
Constructo 1 Gen cry1Ba	CRYB1	FW: GAGCATACCAGCAGTCACTC RV: TTGCGTCTCTCAAAGTAGC	56
Constructo 2 Gen cry1Ba	CRYB2	FW: TGAGTCACCTGGGCTTCAAT RV: CATTGGGATTTGGGTGATTC	58

Como característica fenotípica las colonias no transformadas no presentaron crecimiento, y las colonias positivas para PCR fueron subcultivadas en medio de selección para posterior criopreservación a -80°C. Como caracterización fenotípica las colonias no transformadas no presentaron crecimiento en el medio de selección (figura 3-9 y 3-10). La cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*, ha sido utilizada en ensayos de transformación de papa. El antibiótico de kanamicina es mecanismo de selección fenotípica de las cepas debido a que el gen *nptII* es transferido a la cepa en momento de la transformación con el plásmido pCAMBIA2300 confiriéndole la característica de resistencia, y rifampicina es utilizada debido a que la cepa LBA4404 posee resistencia natural a este antibiótico (Mi et al. 2015; Torres *et al.*, 2012). Se realizó PCR de las colonias positivas transformadas con los casetes de expresión 1 y 2 utilizando los primers directo para el promotor B33 y reverso para el terminador Tnos, se consideraron positivas las colonias que presentaron un amplicon de 3917 pb (Figura 3-11), y los primers directo para el promotor CaMV35S y reverso para el terminador Tnos (Figura 3-12). Además las colonias *A. tumefaciens* y de *E. coli* que presentaron crecimiento fueron sometidas a PCR para una región del gen *cry1Ba1*, y se subcultivaron en medio de selección. Estas colonias subcultivadas fueron positivas para los genes de los casetes de expresión 1 y 2, y se consideró positivo cuando se obtuvo amplicones de 200 pb respectivamente (Figura 3-13).

Figura 3-9: Cepa recombinante de *E. coli* DH5alfa. Se observa crecimiento diferenciado según la presencia del antibiótico kanamicina.

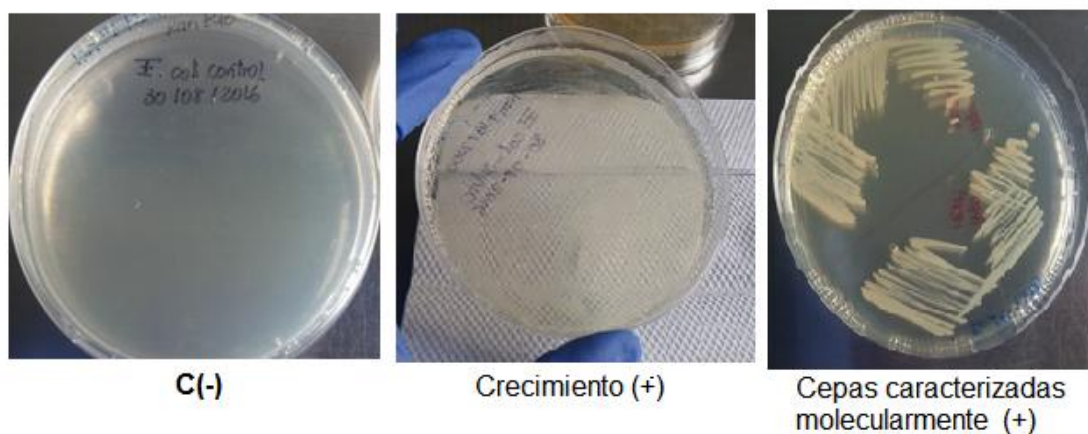


Figura 3-10: Cepa recombinante de *A. tumefaciens* LBA4404. Se observa crecimiento diferenciado según la presencia de los antibióticos kanamicina y rifampicina.

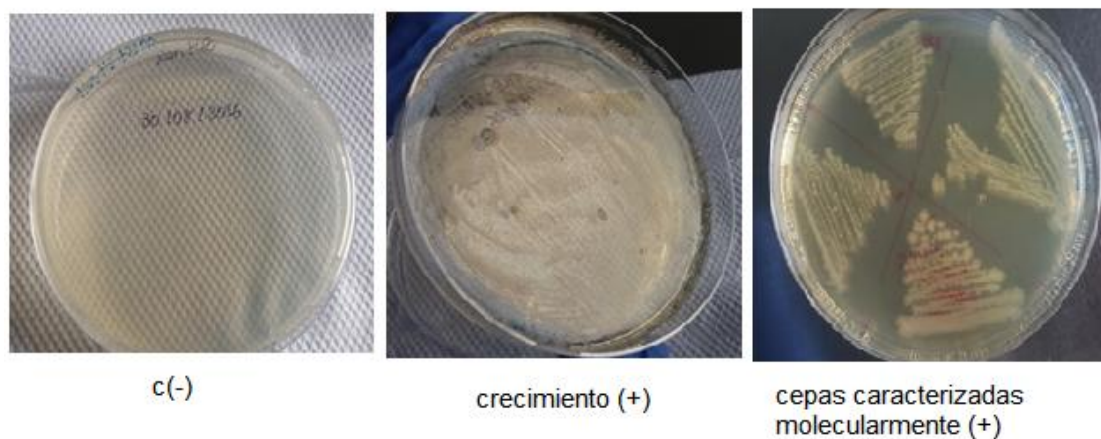


Figura 3-11: Amplificaciones de los casetes de expresión 1 y 2 en cepas de *E. coli* y *A. tumefaciens*, con el promotor B33. Carril1 y 2 *E. coli*, Carril 3 y 4 *A. tumefaciens*, Carril5: Agua, Carril 6: control negativo plásmido pCAMBIA2300.

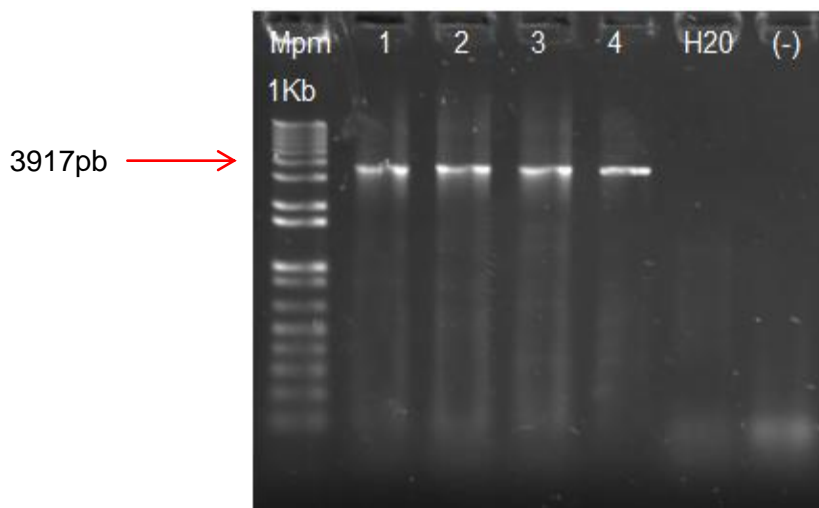


Figura 3-12: Amplificación del casete de expresión 5 en cepas de *E. coli* y *A. tumefaciens* con el promotor CaMV35S. Carril 2 y 3 *E. coli*, Carril 4 y 5 *A. tumefaciens*, Carril 6: Agua, Carril 7: control negativo plásmido pCAMBIA2300.

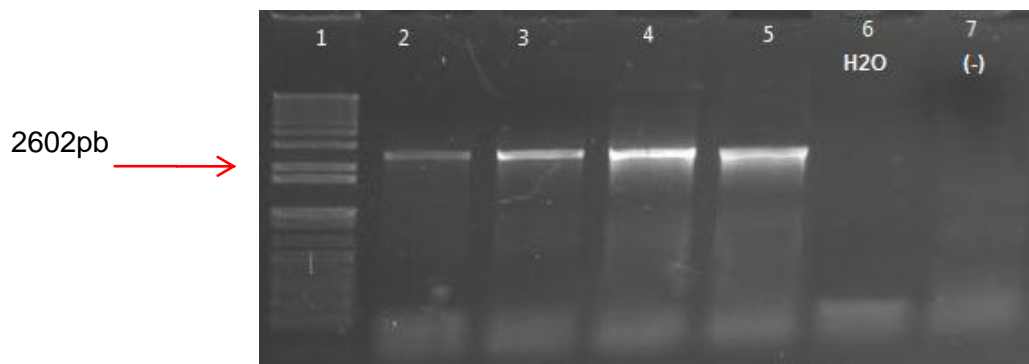


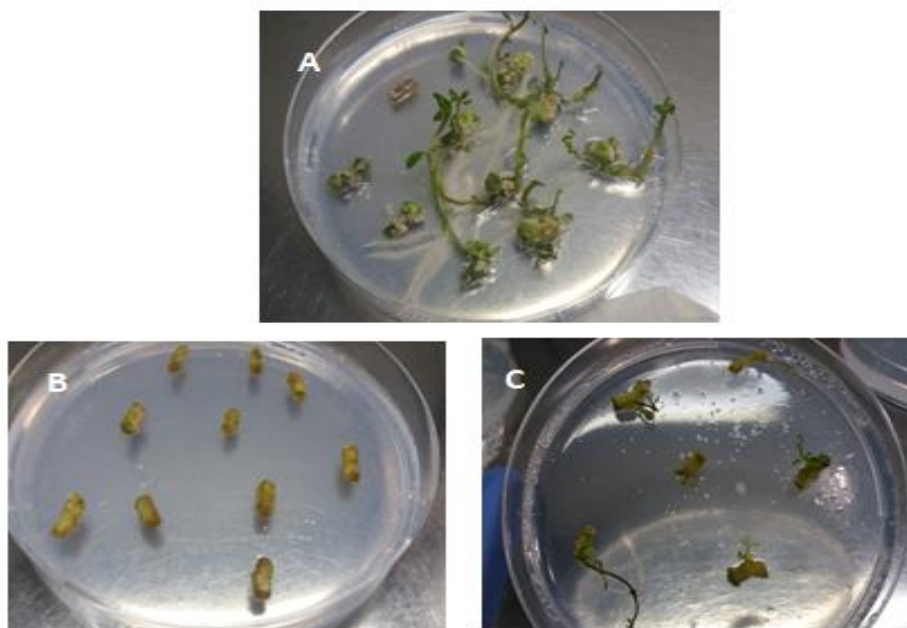
Figura 3-13: Amplificaciones de los casetes de expresión 1, 2, en cepas de *E. coli* y *A. tumefaciens*. Carril 1 y 3: gen *cry1Ba1* en *E. coli*, Carril 2 y 4 gen *cry1Ba1* en *A. tumefaciens*, Carril 5: control positivo plasmido pCAMBIA2300 con casetes de expresión 1, Carril 6: control positivo plasmido pCAMBIA con casete de expresión 2, Carril 7: Agua, carril 8: control negativo plasmido pCAMBIA2300.



Con el fin de determinar la capacidad infectiva de *A. tumefaciens* LBA4404 sobre segmentos internodales de papa, que lleven a la posterior introducción del T-DNA con el gen de interés y su inserción en el genoma de la planta, se llevó a cabo la aplicación de un protocolo de transformación, y su evaluación mediante el crecimiento de regenerantes en presencia de kanamicina, usando el casete 5 que contiene como marcador de selección para plantas el gen *nptII*. El grupo control de explantes regenerados sin transformar con el casete de expresión presentó formación de callos a la segunda semana, con un porcentaje de inducción de callos del 96%, es decir aproximadamente 38 explantes internodales de 40 cultivados en medio de regeneración, y un porcentaje de regeneración del 90%, aproximadamente 36 explantes regenerados con un número de brotes por explante de 4 ± 1 . Los explantes sin transformar con la cepa recombinante LBA4404 en medio de regeneración con antibiótico de selección a la semana 1 comenzaron a presentar oxidación, y en la semana 2 presentaron oxidación y clorosis en medio con kanamicina 50 mg/L, el proceso de calogénesis lo logro iniciar el 20% de los explantes cocultivados, y a partir de la segunda semana empezaron a perder viabilidad y mostraron oxidación completa. El 80% de los explantes cocultivados no evidencia proceso de calogénesis, ni regeneración en el medio, lo que podría estar asociado a los efectos en el genoma vegetal en el momento del cocultivo, daño físico y por la presencia del antibiótico de selección la presencia del antibiótico. Los explantes transformados con la cepa recombinante LBA4404 muestran un comportamiento similar al del grupo anterior

con la diferencia de que a partir de la cuarta semana un 10 % logra mantenerse en el medio de selección, y producir regenerantes, Esta resistencia que presentan los explantes al medio de selección podría asociarse a la inserción del gen *nptII* transferido por la cepa recombinante LBA4404 que contiene el casete de expresión 5 (Figura 3-14). Se ha descrito que medio de regeneración que contiene 50 mg/L de kanamicina, como marcador de selección, es útil para la selección preliminar de posibles transformantes cuando se usa explantes de papa, evitando presión de selección y pérdida de posibles explantes transformados por oxidación, clorosis o necrosis en tejidos que no han sido transformados si se usa concentraciones más altas del antibiótico, como en algunas experiencias que han usado concentraciones de 100 mg/L (Andersson *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2006; López y Chaparro, 2007; Meiyalaghan *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2012; Molla *et al.*, 2012).

Figura 3-14: Aplicación de protocolo de transformación en explantes de papa usando la cepa recombinante de *A. tumefaciens* LBA4404. A. Explantes sin transformar con la cepa LBA4404 en medio de regeneración sin kanamicina evidenciando proceso de calogénesis y regeneración, B. Explantes sin transformar con la cepa LBA4404 en medio de regeneración con 50mg/L de kanamicina, no se evidencia regeneración C. Explantes transformados con la cepa LBA4404 en medio de regeneración con kanamicina 50mg/L, se evidencia regenerantes.



4. Conclusiones

- El análisis de libertad de operación para el diseño de los casetes de expresión, muestra que pueden ser utilizados en transformación genética de variedades de papa libremente en Colombia, a la fecha indica que su uso no afecta derechos de terceros y no tendría problemas legales de propiedad intelectual relacionados a la secuencia del gen, el promotor y el terminador, empleados en el diseño, así como la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 y con el vector de transformación seleccionado.
- Se eligió el gen *cry1Ba1* como una opción viable al gen *cry1Ac*, que podría servir para obtener nuevas líneas de papa, o realizar piramidaje de genes. Se realizó el diseño de cinco casetes de expresión teniendo en cuenta la actividad biológica específica contra *T. solanivora* reportada para la proteína Cry1Ba, y el mecanismo de acción de proteínas Cry1 en insectos lepidópteros, en especial lo concerniente a la activación proteolítica.
- El diseño *in silico* de casetes de expresión permite obtener versiones modificadas del gen *cry1Ba1* para su introducción en plantas de papa, con ajuste de uso codónico, disminución de sitios de poliadenilación prematuros y señales crípticas de splicing que posibiliten obtener líneas con niveles deseables de expresión del gen foráneo. El uso del promotor B33 y la variedad androestéril de papa pastusa suprema permitiría prevenir problemas de bioseguridad relacionados con flujo de genes.
- Este trabajo genera una base para nuevas alternativas en la transformación genética de papa en el contexto agrícola colombiano para resistencia a larvas de *T. solanivora*, que considera el panorama bioquímico de la proteína Cry1Ba1, los elementos necesarios para transformación de variedades de papa en el contexto de expresión del transgen y su bioseguridad, y los derechos de propiedad intelectual inherentes que permitan la posible liberación.

4.1 Recomendaciones

- Continuar con los ensayos de transformación de explantes de papa *S. tuberosum* variedad pastusa suprema con los casetes de expresión basados en el gen *cry1Ba1*.

Bibliografía

1. Andersson, M., A, Trifonova., A, Andersson., M. Johansson., L, Bulow y P. Hofvander. (2003). A novel selection system for potato transformation using a mutated AHAS gene. *Plant Cell Reports*, 22 (4), 261-267.
2. Bah, A., Frankenhuyzen, K. Van, Brousseau, R., & Masson, L. (2011). The *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin: effects of trypsin and chymotrypsin site mutations on toxicity and stability, 85(2004), 120–127. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2004.02.002>
3. Barrett, L W., Fletcher., Wilton, S.D. (2013). *Untranslated Gene Regions and Other Non-coding Elements. Regulation of Eukaryotic Gene Expression*. <http://doi.org/10.1007/978-3-0348-0679-4>
4. Benfey, P. N., Ren, L., & Chua, N. H. (1990). Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *The EMBO Journal*, 9(6), 1677–1684.
5. Bennett AB, Chi-Ham C, Graff G, Boettiger S. (2008). Intellectual Property in Agricultural Biotechnology: Strategies for Open Access. In: Steward C, editor. *Plant biotechnology and Genetics. Principles Techniques and applications*.
6. BIOS. 2009. Biological Open Source .What does “freedom to operate” mean? Patent lens. Citada 28 de Agosto de 2012. en:[http://www.patentlens.net/Daysi/patent lens/ 2768.html](http://www.patentlens.net/Daysi/patent%20lens/2768.html).
7. Bosa, F., Witzgall, P., Cotes, A., Fukumoto, T., & Barreto, N. (2005). Evaluación de la técnica de la interrupción de la cópula de *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Entomología*.
8. Breitler, J. C., Marfà, V., Royer, M., Meynard, D., Vassal, J. M., Vercambre, B., Guiderdoni, E. (2000). Expression of a *Bacillus thuringiensis* cry1B synthetic gene protects Mediterranean rice against the striped stem borer. *Plant Cell Reports*, 19(12), 1195–1202. <http://doi.org/10.1007/s002990000247>
9. Cai, Y., Hartnett, B., Gustafsson, C., y Peccoud, J. (2007). A syntactic model to design and verify synthetic genetic constructs derived from standard biological parts. *Bioinformatics*, 23(20), 2760-2767
10. Christey, M. C., Braun, R. H., Conner, E. L., Reader, J. K., White, D. W. R., & Voisey, C. R. (2006). Cabbage white butterfly and diamond-back moth resistant *Brassica oleracea* plants transgenic for CRY1BA1 or CRY1Ca5. *Acta Horticulturae*, 706, 247–253.

11. Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH. (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*, 18(4):675-689.
12. Crickmore ,N, Baum , J, Bravo A, Lereclus, D, Narva, K, Sampson, K, Schnepf, E, Sun, M, and Zeigler,D.R. " Bacillus thuringiensis" toxin nomenclature. (2016). en: [http:// www.btnomenclature.info/](http://www.btnomenclature.info/).
13. Chilton, M. D., Saiki, R. K., Yadav, N., Gordon, M. P., & Quetier, F. (1980). T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(7), 4060–4. <http://doi.org/10.1073/pnas.77.7.4060>
14. DANE. (2014). Polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*), plaga de gran impacto económico en el cultivo de la papa. Recuperado de: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos_factores_de_produccion_jul_2014.pdf
15. DANE. (2016). Encuesta Nacional Agropecuaria ENA 2015, Recuperado de: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2015/boletin_ena_2015.pdf.
16. De Maagd, R., Bravo, A., Crickmore N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics, Cell press*. 17, (4) 193-199. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02237-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02237-5)
17. Deist, B., Rausch, M., Fernandez-Luna, M., Adang, M., & Bonning, B. (2014). Bt Toxin Modification for Enhanced Efficacy. *Toxins*, 6(10), 3005–3027. <http://doi.org/10.3390/toxins6103005>
18. Díaz-Mendoza, M., Ortego, F., Garcia de Lacoba, M., Magaña, C., de la Poza., M, Farinós, G., P, Castañera P & Hernandez-Crepo, P. (2005). Diversity of trypsins in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35 (9)1005–1020.
19. Espinal, G., Covalada ,H., Ruiz, N & Urrutia, C. 2005. "La Cadena De La Papa En Colombia. Una Mirada Global De Su Estructura y Dinamica 1991-2005. *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural* http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6325/2/2005112163731_caracterizacion_papa.pdf

20. Gallo, M. & Flynn, A. (2008). *Molecular Genetics of Gene Expression*. In: Steward C, editor. *Plant biotechnology and Genetics. Principles Techniques and applications*. New Jersey: John Wiley & sons, INC., publications.
21. Goo, Y. M., Kim, T. W., Lee, M. K., & Lee, S. W. (2013). Accumulation of PrLeg, a perilla legumin protein in potato tuber results in enhanced level of sulphur-containing amino acids. *Comptes Rendus - Biologies*, 336(9), 433–439. <http://doi.org/10.1016/j.crv.2013.09.002>
22. Grafius, E.J., & Douches, D. S. (2008). The Present and Future Role of Insect-Resistant Genetically Modified Potato Cultivars in IPM. *Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs*, 195–221.
23. Guex, N. y Peitsch, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. (1997). *Electrophoresis*, 18 (15), 2714-2723.
24. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22 (7) 346-353.
25. Hincapie V, Chaparro-giraldo, A. (2014). Estudio de libertad de operación para una línea genéticamente modificada de papa (*Solanum tuberosum* L.) Study of freedom to operate for a genetically modified potato (*Solanum tuberosum* L.) line, *XVII*(1), 119–128.
26. Hodson de Jaramillo, E. (2005). Transformación Genética de Plantas Resistencia a Virus. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 29(110), 5–24.
27. ICA. (2011). Instituto Colombiano Agropecuario. *Manejo Fitosanitario del cultivo de la papa*. Recuperado el 13 de Noviembre de 2015, de <http://www.ica.gov.co/getattachment/b2645c33-d4b4-4d9d-84ac-197c55e7d3d0/Manejo-fitosanitario-del-cultivo-de-la-papa-nbsp;-.aspx>.
28. ISAAA. (2016). International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. Recuperado de <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/crop/default.asp?CropID=19&Crop=So ybean>.
29. Gelvin, S.B. (2003). Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1):16–37.

30. Ghislain ,M., Ñopo,I., Malagamba,P., López, M. y Echeandía E.(1998). Desarrollo y Utilización de Papas Transgénicas Resistentes a enfermedades Bacterianas, Memorias del taller llevado a cabo en Lima y San Ramón Perú.
31. James Clive. (2015). 20th Anniversary of the Global Commercialization of Biothech Crops and Biothech Crop Highlights in 2015. ISAAA. 51 1-17.
32. Jiménez, J.P. Chaparro-Giraldo, A., Blanco J. (2009). Evaluación de diferentes combinaciones fitohormonales en la regeneración de *Solanum tuberosum* (Solanaceae) Var. Pastusa Suprema a partir de explantes internodales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11 (2). 66-74.
33. Khan, R. S., Nishihara, M., Yamamura, S., Nakamura, I., & Mii, M. (2006). Transgenic potatoes expressing wasabi defensin peptide confer partial resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Biotechnology*, 23(2), 179–183. <http://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.23.179>
34. Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Doskocilova, A., Komis, G., & Samaj, J. (2015). Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1024–1042. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.012>
35. Kucho, K., Kakoi, K., Yamaura, M., Iwashita, M., Abe, M y Uchiumi, T. (2013). Codon-optimized antibiotic resistance gene improves efficiency of transient transformation in *Frankia*. *Journal of Biosciences*, 38(4), 713-717.
36. Lagnaoui, A., Cañedo, V., Douches, S. (2000). Evaluation of Bt-cry1Ia1 (*cryV*) transgenic potatoes on two species of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* and *Symmetrischema tangolias* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Peru. En: *CIP Program Reports 1999-2000*: 117-121.
37. Li, N., Sun, M., Jiang, Z., Shu, H., & Zhang, S. (2016). Genome-wide analysis of the synonymous codon usage patterns in apple. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(5), 983–991. [http://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61333-3](http://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61333-3)
38. Linares y Gutiérrez A. (2002). El mercado mundial de la papa. *Aldea mundo*. 5, 59-69
39. Lopez, A., Chaparro-Giraldo, A., (2007). Propuesta de un sistema de transformación de plantas de papa (*Solanum tuberosum* sp. andigena var.

- Pastusa suprema) mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. *Agronomía Colombiana*. 25 (1), 16–25.
40. López-Pazos, S. A., Arias, A. C. R., Ospina, S. A., & Cerón, J. (2010). Activity of *Bacillus thuringiensis* hybrid protein against a lepidopteran and a coleopteran pest. *FEMS Microbiology Letters*, 302(2), 93–98. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01821.x>
41. López-Pazos, S.A., Cerón, J. (2013). Biological activity of insecticidal toxins: structural basis, site-directed mutagenesis and perspectives. En: genetic manipulation of DNA and protein - examples from current research, Dr Figurski D(Ed), ISBN: 978-953-51-0994-5, Editorial In Tech, 273-302.
42. Martínez, W., Uribe, D., Cerón, J. (2003). Efecto tóxico de proteínas Cry1 de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 29, 89-93.
43. Mathews, C., Van Holde, K., Ahern, K. (2002). *Bioquímica. España*. Pearson Addison Wesley.
44. McKee, T y McKee James R. (2003). *Bioquímica La Base Molecular de la Vida*. Madrid. McGraw-Hill Companies, Inc.
45. Mazier, M., Pannetier, C., Tourneur, J., Jouanin, L. Giband, M. (1997). Expression of *Bacillus thuringiensis* toxin genes in plant cells. *Biotechnology Annual Review*, 3, 313-347.
46. Meiyalaghan, S., Barrell, P. J., Jacobs, J. M. E., & Conner, A. J. (2011). Regeneration of multiple shoots from transgenic potato events facilitates the recovery of phenotypically normal lines: assessing a cry9Aa2 gene conferring insect resistance. *BMC Biotechnology*, 11(1), 93. <http://doi.org/10.1186/1472-6750-11-93>
47. Mi, X., Ji, X., Yang, J., Liang, L., Si, H., Wu, J., Wang, D. (2015). Transgenic potato plants expressing cry3A gene confer resistance to Colorado potato beetle. *Comptes Rendus - Biologies*, 338(7), 443–450. <http://doi.org/10.1016/j.crv.2015.04.005>
48. MINAMBIENTE.(1988) .Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Recuperado de: <http://www.minambiente.gov.co/>.
49. Miranda, R., Zamudio F y Bravo, A. (2001). Processing of Cry1Ab δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut

proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31 (12), 1155–1163.

50. Mohan, M y Gujar, G.T., (2003). Characterization and comparison of midgut proteases of *Bacillus thuringiensis* susceptible and resistant diamondback moth (Plutellidae: Lepidoptera). *J. Invertebr. Pathol* 82 (1):1-11.
51. Molla.M.H., Nasiruddin K.M., Al-Amin. M, Haque.M. S., Maniruzzaman.(2012). Standardization of protocol for Agrobacterium Mediated transformation in potato (*Solanum tuberosum* L.) Bangladesh *J. Agril. Res.* 37(2): 185-194.
52. Murray, E., Lotzerl, J., Eberle, M. (1989). Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Research*, 17(2):477-498.
53. Nagori, B.P. y Mathur, V., (2009). Basics of Writing Patent Non-Infringement and Freedom-to- Operate Opinions. *Journal of Intellectual Property Rights* 14(1):7-13.
54. Niño, L. (2004). Revisión sobre la Polilla de la Papa Tecia solanivora en Centro y Suramérica. *Suplemento Revista Latinoamericana de la papa*, 4-21.
55. OMPI. Organización Mundial de la Propiedad Intelectual. (2008). ¿ Que es la propiedad intelectual?. Recuperado de: <http://www.wipo.int/about-ip/es/>.
56. Oppert, B., Kramer, K.J., Johnson, D.S., Upton, J., McGaughey, W.H., (1996). Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* Cry1a(C) protoxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 571–583.
57. Peremarti, A., Twyman, R.M., Gómez-Galera, S. et al. *Plant Mol Biol* (2010). “Promoter Diversity in Multigene Transformation.” *Plant Molecular Biology*, 73 (4): 363–78.
58. Pérez, O., Rodríguez, A., Cotes, A. (1997). Método rápido y confiable para evaluar la actividad insecticida de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra Tecia solanivora Povolny (Lepidoptera Gelechiidae. *Revista Colombiana de Entomología*, 23, 113-118.
59. Perlak, F J, R L Fuchs, D A Dean, S L McPherson, and D A Fischhoff. 1991. “Modification of the Coding Sequence Enhances Plant Expression of Insect Control Protein Genes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (8): 3324–28.
60. Pigott C. R., & Ellar D. J.(2007) . Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, (2) 255-281
61. Pitre, L., Hernández-Fernández, J., Bernal, J. (2008). Toxicidad de δ -endotoxinas

- recombinantes de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 85–96.
62. Potenza, C., Lorenzo, A. y Sengupta-Gopalan, C. (2004). Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental Applications: promoters used in plant transformation. *In vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 40(1):1-22.
63. Rajamohan, F., Alzate, O., Cotrill, J. a, Curtiss, a, & Dean, D. H. (1996). Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), 14338–14343. <http://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14338>
64. Sharp, P. M., & Li, W. (1987). The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acid Res* 15(3):1281-1295.
65. Sauka, D. H., y Benintende, G. B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades: Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista argentina de microbiología*, 40(2), 124-140.
66. Segura, M., Santos, C., M & Núñez, C. (2006). Desarrollo fenológico de cuatro variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el municipio de Zipaquirá (cundimarca). *Fitotecnia Colombiana*, 6(2), 33–43.
67. Scout, G. J., Rosegrant, M. W., Ringler, C. 2002. Una visión de la alimentación, la agricultura y el medio ambiente en el año 2020 (traducción del inglés). *International Food Policy Research Institute*. Resumen 2020 No 66
68. Shewry, P. R. (2003). Tuber storage proteins. *Annals of Botany*, 91(7), 755–769. <http://doi.org/10.1093/aob/mcg084>
69. Soberón, M., & Bravo, A. (2007). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología*, 14, 303–314. Retrieved from http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_27.pdf
70. Sinaipa. (2002). El correo de lapapa. Boletín Mensual 8, Semillas de papa y tubérculos de semilla1-4.
71. SIC. (2008). Solicitudes en Otros Países a través del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT) Superintendencia de industria y comercio.

72. Sutton, D. W., Havstad, P. K., & Kemp, J. D. (1992). Synthetic cryIIIA gene from *Bacillus thuringiensis* improved for high expression in plants. *Transgenic Research*, 1(5), 228–236. <http://doi.org/10.1007/BF02524753>
73. Robertis, Eduardo y Hib, J. (2004). *Fundamentos de Biología Celular y Molecular de Robertis*. Tercera Edición, Buenos Aires.
74. Torres, E. S., Torres, J., Moreno, C., & Arango, R. (2012). Desarrollo de líneas transgénicas de una variedad androestéril de papa, potencialmente resistentes a *Tecia solanivora* Povolny. *Agroonomía Colombiana*, 30(2), 163–171.
75. Trujillo, C., E. Rodríguez, S. Jaramillo, R. Hoyos, S. Orduz, R. Arango. (2001). One step transformation of two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. sp. andigena). *Plant Cell Rep*, 20 (7), 637-641.
76. Klümper, W., & Qaim, M.(2014). A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops. *PLoS ONE*, 9(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0111629>
77. Valderrama, A. M., Veásquez, N., Rodríguez, E., Zapata, A., Zaidi, M. A., Altosaar, I., & Arango, R. (2007). Resistance to *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) in three transgenic Andean varieties of potato expressing *Bacillus thuringiensis* CryIAC protein. *Journal of Economic Entomology*, 100(1), 172–179.
78. Vanegas, P.A., Blanco, J., Chaparro-Giraldo A. (2010), Expresión de la proteína Cry1Ac en tejidos de líneas transgénicas de papa (*Solanum tuberosum*) spp Andígena. var Diacol capiro. *Acta Biológica Colombiana* 15 (2), 101-114.
79. Vargas, B., Rubio S., López Ávila. (2004). Estudios de hábitos y comportamiento de la polilla guatemalteca *Tecia Solanivora* (Lepidoptera Gelechiidae) en papa almacenada. *Revista Colombiana de Entomología*, 30. (2), 211-217.
80. Vega, A. (2010). Expresión de genes *cry1* de *Bacillus thuringiensis* en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), para el control de la polilla de tomate, *Tuta absoluta*. Universidad de Talca. Comunicación personal.
81. Vincent, V., Raynald, L., Jean-Louis, S. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. (2012). *Journal of Invertebrate Pathology*, 111.(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.05.001>.
82. Villalobos, A., Ness, J. E., Gustafsson, C., Minshull, J., & Govindarajan, S. (2006). Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments.

BMC Bioinformatics, 7, 285. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-7-285>

83. Villanueva, D. (2013). *Tecia solanivora*, Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae): una revisión sobre su origen, dispersión y estrategias de control biológico, 9(18), 197–214.
84. Villanueva, D., Torres, J., Rivera, H., Núñez, V., Arango, R., & Ángel, F. (2014). Líneas colombianas de papa genéticamente modificadas resistentes a *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) bajo campo confinado. *Revista Colombiana de Entomología*, 40(2), 148–157.
85. Welch, M., Govindarajan, S., Ness, J.E., Villalobos, A., Gurney, A., Minshall, y Gustafsson C. (2009). Design Parameters to Control Synthetic Gene Expression in *Escherichia coli*, *Plos One* 4(9):e7002.
86. Welch, M., Villalobos, A., Claes, G. y Jeremy M. (2011). Designing Genes for Successful Protein Expression. *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc, 498, 43-66.
87. Wenzler, H., Mignery, G., Fisher, L. y Park, W. (1989). Sucrose-regulated expression of a chimeric potato tuber gene in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol*. 13(4), 347-54.
88. Zupan, J. R., & Zambryski, P. (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiology*, 107(4), 1041–7. <http://doi.org/10.1104/pp.107.4.1041>