

CARACTERIZACION MOLECULAR Y EVALUACION DE RESISTENCIA DE
PLANTAS DE PAPA CRIOLLA (*Solanum phureja* cv. YEMA DE HUEVO)
TRANSFORMADAS CON EL GEN DE LA CAPSIDE DEL PLRV

JORGE ALONSO LEYVA ROJAS

Trabajo de Tesis presentado como requisito parcial
para optar al título de M.Sc. en Ciencias Agrarias
Area: Fitomejoramiento

Director

FABIO ARISTIZABAL Ph.D.
Prof. Asistente Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias

Directores Asociados

ORLANDO ACOSTA Ph.D.
Prof. Asociado Dpto. Ciencias
Fisiológicas
Facultad de Medicina

MARINA CARO M.
Dir. Lab de Cultivo de Tejidos
Vegetales
Instituto de Biotecnología

BOGOTA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE AGRONOMIA
ESCUELA DE POSGRADOS

AGOSTO 14 DE 2001

JURADO CALIFICADOR



Presidente
ALEJANDRO CHAPARRO Ph. D.

Jurado

ANTONIO ANGARITA Z. Ph. D.

Jurado

FABIO ARISTIZABAL Ph. D.

QUIERO DEDICAR ESTE TRABAJO A MIS PADRES, HERMANOS, CUÑADOS, A MI
SOBRINO ALEJITO, A MI NOVIA MARIA ISABEL POR SU PACIENCIA Y APOYO
DURANTE TODA LA MAESTRIA.

JORGE ALONSO

AGRADECIMIENTOS

Cualesquiera que hayan sido nuestros logros, alguien nos ayudó siempre a alcanzarlos...

Athea Gibson

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a:

Dr. Fabio Aristizabal, y al Dr. Orlando Acosta por valiosa y ardua colaboración en la realización y dirección de la investigación.

Dra. Marina Caro, Directora del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del IBUN, por su invaluable e incansable dirección en el desarrollo de la investigación, especialmente en la evaluación de resistencia y por brindarme siempre una voz de aliento maternal para no desfallecer en el trabajo.

Claudia Rosas y Ana Myriam Caro, Biólogas especialistas en cultivo de tejidos vegetales y Bibiana Gómez por su apoyo y aporte de conocimientos en esta área de la biotecnología.

Dr. Guillermo Corredor por la asesoría en el análisis estadístico del trabajo y su gran amistad y compañerismo durante el posgrado.

Dr. Oscar Oliveros, Dras. Luz Helena Aranzales y Sixta Tulia Martínez, Luz Stella Rodríguez (de pregrado) y Miguel Ospino investigadores y compañeros del Laboratorio de Biología Molecular del Virus por los conocimientos compartidos en esta área y su amistad.

La Universidad Nacional de Colombia y los profesores de la Maestría en Fitomejoramiento por la formación académica y científica.

Finalmente a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron con la realización de esta investigación.

Este trabajo hace parte de las investigaciones realizadas por la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Sin embargo, las ideas emitidas por los autores son de su exclusiva responsabilidad y no expresan opiniones de la Universidad.

(Artículo 14 de la Resolución No. 00047 de 1981).

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Pág.
RESUMEN	1
SUMMARY	3
1. INTRODUCCION	5
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivos generales	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. REVISION DE LITERATURA	11
3.1. <i>Solanum phureja</i> Juz. et Buk	11
3.2. Enfermedades causadas por virus	13
3.2.1. Virus del enrollamiento de la hoja (PLRV)	17
3.2.2. Virus Y (PVY)	19
3.2.3. Virus X (PVX)	21
3.2.4. Virus S (PVS)	23
3.2.5. Virus A (PVA)	23
3.2.6. Virus "Rattle" del tabaco (TRV)	24
3.2.7. Viroide del Tubérculo ahusado (PSTVd)	24
3.3. Resistencia derivada del patógeno	25
3.3.1. Resistencia generada por la proteína de la cápside	25
3.3.2. Pruebas de campo con plantas transgénicas transformadas con el gen de la cápside (CP) del PLRV	28
3.4. Asignación de fotoasimilados y efecto de la infección viral	29
3.5. Obtención de plantas transgénicas de <i>Solanum phureja</i> cv. Yema de Huevo	31

4.	MATERIALES Y METODOS	33
4.1.	Localización	33
4.2.	Micropropagación y mantenimiento in vitro del material vegetal	33
4.3.	Adaptación a condiciones de campo y obtención de tubérculos	34
4.4.	Evaluación de resistencia	34
4.4.1.	Primera inoculación	34
4.4.2.	Segunda inoculación	36
4.4.3.	Análisis estadístico	37
4.4.4.	Prueba de ELISA	38
4.5.	Extracción de DNA genómico	39
4.6.	Electroforesis de DNA en gel de agarosa	40
4.7.	Purificación de DNA	41
4.8.	Cuantificación de DNA	42
4.9.	Pruebas moleculares	43
4.9.1	Amplificación del gen de la cápside por PCR	43
4.9.2.	Síntesis de la sonda marcada con digoxigenina	44
4.9.3.	Digestión de DNA genómico	46
4.9.4.	"Southern Blotting"	47
4.9.5.	"Dot Blotting"	48
4.9.6.	Hibridación	48
5.	RESULTADOS Y DISCUSION	50
5.1.	Caractetización molecular de clones transgénicos	50
5.1.1.	Amplificación del gen de la cápside del PLRV con PCR	50
5.1.2.	Construcción de la sonda	52
5.1.3.	Hibridación de DNA total "Dot Blotting"	53
5.1.4.	Determinación del número de insertos con "Southern Blotting"	54
5.2.	Evaluación de resistencia	57
5.2.1.	Evaluación de la infección primaria	57
5.2.2.	Infección secundaria	59
5.2.2.1.	Determinación del título viral en tallos	59
5.2.2.2.	Determinación del título viral en hojas	63

5.3.	Producción de tubérculo	68
5.4.	Relación entre título viral y producción de tubérculos	69
6.	CONCLUSIONES	74
7.	BIBLIOGRAFIA	76
	ANEXOS	92

RESUMEN

Se evaluó la resistencia a la acumulación del virus PLRV en los clones transgénicos de *Solanum phureja* cv. yema de huevo, AT49, 63 y 100 y los clones AT14 y 81 obtenidos por organogénesis de hoja (Franco, 1998), empleando como testigo absoluto el clon1. La evaluación se realizó en condiciones de invernadero en la Estación Experimental ICA-San Jorge ubicada en el municipio de Soacha Cundinamarca a 2800 msnm.

Los clones micropropagados in vitro y adaptados a condiciones de invernadero fueron inoculados por injerto utilizando como púa la especie *Solanum tuberosum* cv. Maris Piper portador del virus. La evaluación de resistencia se hizo en la segunda inoculación, bajo un diseño experimental completamente al azar, que permitió comparar los títulos virales en hojas y tallos laterales a los 30, 60 y 90 días de inoculación. Con esta evaluación se determinó, que los clones transformados presentaron una acumulación viral significativamente menor a la presentada en los clones no transformados y estos a su vez con el testigo clon1, atribuyéndose a la expresión del transgen.

De igual forma se evaluó, bajo el mismo diseño experimental la producción de tubérculos, determinando que hubo una respuesta significativamente mayor en los clones transformados AT49, 63 y 100 comparados con los no transformados y clon1. La relación entre la acumulación de virus en tallos y hojas con la producción de tubérculos, presentó una relación inversamente proporcional con un coeficiente de determinación del 92,33% y 69,59% respectivamente.

Por otro lado, las evaluaciones moleculares por PCR y "Dot Blotting" efectuadas, determinaron la presencia física del gen de la cápside en los clones transformados y su estabilidad durante las fases de propagación clonal. Finalmente con la técnica de "Southern Blotting", se determinó el número de insertos del transgen presente en los clones AT49, 63 y 100, señalando que no se presentaron diferencias significativas entre el número de insertos y la resistencia a la acumulación viral en estos clones.

SUMMARY

The resistance was evaluated to the accumulation of the virus PLRV in the transgenic lines of *Solanum phureja* cv. Egg yolk, AT49, 63 and 100 and the lines AT14 and 81 obtained by leaf organogenesis (Franco, 1998), using as absolute witness the clone1. The evaluation was carried out under greenhouse conditions in the Experimental Station ICA-San Jorge located in the municipality from Soacha Cundinamarca to 2800 altitude.

Lines AT and clone1 adapted to greenhouse were graft-inoculated with scions from infected " Maris Piper" plants. The resistance evaluation was made in the second inoculation, under an experimental design totally at random that allowed to compare the viral titles in leaves and lateral stem to the 30, 60 and 90 days of inoculation. This evaluation it was determined that the transformed lines presented a significantly smaller viral accumulation to the one presented in turn in the not transformed lines and these with the witness clone1, being attributed to the expression of the transgen.

Of equal formed it evaluated, under the same experimental design the production of tubers, determining that there was a significantly bigger answer in the transformed lines AT49, 63 and 100 compared with those no transformed and clone1. The relationship among the virus accumulation in stem and leaves with the production of tubers, indicated a relationship inversely proportional of 92,33% and 69.59% respectively.

On the other hand, the molecular evaluations for PCR and Dot Blotting, they determined the physical presence of the coat protein gene in the transformed clones and their stability

during the phases of propagation clonal. Finally with Southern Blotting's technique, the number of insert of the present transgen was determined in the lines AT49, 63 and 100, indicating that significant differences were not presented between the insert number and the resistance to the viral accumulation in these lines.

INTRODUCCION

La introducción de características útiles en las plantas por medio de las técnicas tradicionales de Mendel, ha transformado el mundo haciendo la llamada "revolución verde". Sin embargo, las técnicas tradicionales son dispendiosas y consumen gran cantidad de tiempo para seleccionar y establecer una característica particular y deseable en un cultivar; a menudo, es imposible incorporar algunas características empleando estos medios convencionales. La biotecnología junto con la tecnología del DNA recombinante, en cambio, posee un gran potencial para la introducción de características deseables en plantas, complementando los esfuerzos del mejoramiento vegetal clásico. No obstante, esta tecnología no debe considerarse como un fin sino como un instrumento adicional para alcanzar el objetivo final de modificar y mejorar las plantas (Roca, et-al, 1993; Cubillos, 1990).

La introducción estable de genes foráneos en plantas representa uno de los desarrollos significativos en los continuos avances de la tecnología para la agricultura. (Gasser y Fraley, 1989). Genes de virus, bacterias y especies vegetales no relacionadas, que codifican para una amplio grupo de caracteres han sido exitosamente transferidos a plantas superiores (Roca, 1993). Esta tecnología ha permitido el desarrollo de nuevas variedades de plantas que aumentan la producción de los cultivos a la vez que incrementan sus valores nutricionales, como también la modificación de flores de ornato de gran valor estético y comercial (Glick and Pasternak, 1994), de igual forma se han obtenido plantas resistentes a herbicidas que permiten el control de malezas (Chaparro, 1995).

La ingeniería genética para el mejoramiento de los cultivos se enfoca en la transferencia individual de genes o de grupos de genes que se introducen en las plantas por transformación (Von Wettsein, 1989; Glick and Pasternak, 1994). Se asume que esta estrategia es prometedora si se conocen los genes que codifican para enzimas o proteínas que proveen una propiedad valiosa a una planta (Von Wettsein, 1989).

Un caso particular de la transformación aplicado a la virología vegetal, ha sido el desarrollo de la protección derivada de estos patógenos. Parte de la información genética derivada del virus vegetal se inserta en el genoma de una planta, haciéndola en alguna medida resistente al virus donante (Acosta et al, 1995). Se han utilizado genes que codifican para la proteína de la cápside viral (CP), tanto en versiones antisentido como versiones con sentido (Van den Elzen et-al., 1989), genes que codifican para satélites de ARN viral (Harrison et-al, 1987); versiones de genes antisentido complementarios (Rezaïn et-al., 1988; Pang et-al, 1993) y genes de las replicasas vírales (Rubino et al, 1993). Con estas técnicas se han logrado obtener plantas con resistencia a enfermedades causadas por virus. Aunque el mecanismo no es completamente conocido, hay una amplia evidencia que muestra que la expresión constitutiva de proteínas de la cápside viral reduce la infección significativamente (Thomson, 1994), retrasando el desarrollo de síntomas y disminuyendo la acumulación de virus en las plantas infectadas, como se ha demostrado con TMV, PVX, PVY, PVS y PRLV entre otros (Tremaine, et al, 1990; Dudits et al, 1992; Mayo, et al, 1993; Dougherty, et al, 1993; Jones, 1997).

Uno de los cultivos alimenticios más importantes a nivel mundial es la papa. En Colombia este cultivo ocupa el tercer lugar en importancia después del café y el banano; desempeña un papel fundamental en la economía del país ya que representa alrededor

del 4.7% del producto interno agropecuario. En el año 2000 se cultivaron alrededor de 154.000 hectáreas, involucrando cerca de 100.000 productores (Min. Agricultura, 2000).

Se estima que entre el 15 y 20% de los costos de producción por hectárea del cultivo de la papa están representados por el control de plagas y enfermedades. Los resultados del mal manejo de plagas y enfermedades del cultivo en el país han conducido a la inducción de resistencia de algunos insectos plagas en algunos casos vectores de virus, con una disminución notoria de la población de fauna benéfica (Rodríguez, 1996), de igual forma, por la ampliación de áreas de cultivo en páramos y el mal manejo de plaguicidas se ha observado alteraciones ecológicas que han afectando los nacimientos de agua la fauna y su flora de estos lugares (Pineda, 1996).

En el caso de los virus, se han realizado estudios que muestran claramente la reducción en rendimiento, llegando en muchos casos a ocasionar pérdidas hasta del 60% del material cosechado, cuando se presentan PVX, PVY, PVS y PLRV en los diferentes mosaicos. Además las enfermedades virógenas son las principales responsables de la progresiva degeneración de la semilla de la papa, ya que se transmiten en forma sistémica de generación en generación y en forma acumulativa, deteriorando visiblemente los rendimientos (Estrada, 2000).

En el caso particular de la papa criolla (*Solanum phureja* var. yema de huevo), una especie que se caracteriza por sus cualidades organolépticas y nutritivas, de gran consumo en Colombia y en la cual FEDEPAPA tiene gran interés para que se convierta en un producto importante en el sector campesino colombiano (Del Valle; 1994; Arguello, 1996), es susceptible a la infección por virus, principalmente por el causante del

enrollamiento de la hoja de papa (PLRV, por sus siglas en inglés), un luteovirus de RNA de cadena sencilla, transmitido de manera persistente por más de diez especies de áfidos entre las que sobresale el *Myzus persicae* Sulz (Acosta et al., 1995); convirtiéndose este en un problema para tales propósitos. La obtención de plantas transgénicas origina una alternativa para el control de dichos patógenos; en los países desarrollados este enfoque ha sido aplicado exitosamente en la producción de plantas transgénicas de papa resistentes a los virus económicamente importantes.

En la presente investigación se estableció como objetivo principal evaluar la respuesta de las plantas transgénicas de *S. phureja* c.v. yema de huevo obtenidas por Franco (1998) a la infección del PLRV en condiciones de invernadero, en el centro experimental ICA San Jorge; relacionándola con el número de inserciones del gen de la cápside del virus presente en cada uno de los clones, frente a la variedad sin transformar. De igual forma se evaluó el efecto de la infección viral en la producción de tubérculos, determinando su efecto negativo en el rendimiento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales

- Realizar la caracterización molecular de los clones transformados determinando la presencia del inserto.
- Determinar la resistencia de las plantas transformadas y no transformadas de *Solanum phureja* c.v. yema de huevo a la infección del virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV).

2.2. Objetivos específicos

- Determinar el número de inserciones presentes en cada clon transformado por "Southern blotting" y relacionarlos con la resistencia presentada a la infección viral.
- Establecer la presencia del inserto por amplificación con PCR de una región de la cápside, tanto en las generaciones clonales por tubérculo como *in vitro*.
- Cuantificar los títulos virales de la infección con PLRV en tallos y hojas, utilizando la técnica de ELISA y realizar la comparación entre plantas transformadas y no transformadas.

- Determinar síntomas de enrollamiento en hoja en los clones transformados y no transformados como consecuencia a la infección viral.

- Comparar la producción de tubérculos en los diferentes clones evaluados y determinar la relación entre título viral y producción.

3. REVISION DE LITERATURA

3.1. *Solanum phureja* Juz. et Buk.

La especie *S. phureja* está distribuida desde el norte de Bolivia hasta el sudeste de Venezuela, en el área de la cordillera de los Andes, y presenta un centro de diversidad genética en el sur de Colombia (Carrasco y Pineda, 1993). Esta especie es una variedad nativa de papa cuyo tubérculo es ampliamente consumido, especialmente en Colombia. *S. phureja* parece haber evolucionado a partir de *Solanum stenotomum* por selección humana, siendo sus principales características la diploidía de su genoma, la rápida maduración y baja dormancia de los tubérculos una vez cosechados (Hawkes, 1988). Esta especie es cultivada desde los 2000 hasta aproximadamente 3500 msnm., en condiciones un poco más cálidas que *S. tuberosum* subespecie andígena preferiblemente en lugares donde no se presenten heladas (Mariño, 1982).

Según Hawkes (1990), la selección de diferentes grupos indígenas pudo haber conducido a una evolución polifilética. Sin embargo, estudios más recientes realizados en el Centro Internacional de la papa, a partir de 163 accesiones colectadas en los valles cálidos de la cordillera Andina (entre 2000 y 3700 m.s.n.m), desde Bolivia hasta Venezuela y analizados mediante la técnica de RAPD, sugieren que *S. phureja* es una especie homogénea, que es diferente de otras especies silvestres de papa. Esta especie tiene una larga historia de domesticación en los Andes que pudo haberla mantenido relativamente aislada (Ghislain, 1996).

Una característica importante de *S. phureja* es que algunos de sus clones han sido utilizados como inductores de dihaploidía en *S. tuberosum*. En esta técnica, se fertilizan flores tetraploides de *S. tuberosum* con polen de *S. phureja* con el fin de producir semillas dihaploides de *S. tuberosum*. Teniendo en cuenta el éxito de esta técnica, es posible suponer que en la naturaleza existe una muy poca posibilidad de que ocurra este evento. Infortunadamente, el clon 1 no ha sido estudiado para determinar si tiene la capacidad para fertilizar flores de *S. tuberosum* (Liu, 1993).

En Colombia se cultivan comercialmente varios morfotipos de *S. phureja*, pero solo la variedad conocida como "papa criolla" o "yema de huevo", que produce tubérculos amarillos y redondos es ampliamente cultivada. Basado en las características morfológicas y modelos electroforéticos de proteínas totales, se han identificado 11 genotipos diferentes (Carrasco y Pineda, 1993; Carrasco, 1994).

Estos morfotipos son susceptibles a algunas plagas que atacan *Solanum tuberosum*, especialmente a la gota (*Phytophthora infestans*) y al gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*), como también existen reportes de susceptibilidad a la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) (Carrasco 1994). En cuanto a virus, se sabe que algunos clones son susceptibles a PLRV, PVX y PVY, aunque no se han hecho estudios detallados para cada morfotipo, se determinó que *S. phureja* clon1 es muy afectado por PLRV (Artunduaga 1989).

3.2. Enfermedades causadas por virus

Los virus son los patógenos más dañinos en la papa porque causan grandes pérdidas en rendimiento (degeneración) y porque se mantienen indefinidamente en el cultivo por su propagación vegetativa. En las zonas templadas, sobre los 25° de latitud sur o norte, los virus son un factor crucial y los rendimientos disminuyen en casi 20% en cada generación sucesiva si no se renueva la semilla. Lo mismo ocurre en las zonas tropicales por debajo de los 2500 m. En el altiplano tropical, sobre los 3000 m, la degeneración progresa más lentamente porque los agricultores no se han preocupado en usar continuamente semilla certificada (Estrada, 2000).

La infección natural por virus se realiza por contacto, heridas causadas en las plantas por el hombre, los animales, las máquinas o el viento, como en el caso de PVX; por áfidos solamente como en PLRV; por contacto y por áfidos como en PVY, PVA, PVS y PVM; por nematodos como en TRV; o por hongos como en PMTV (Salazar, 1995).

Los métodos de transmisión artificial son por inoculación con virus presente en la savia, por injertos de tallos o tubérculos y por infección con insectos (De Bokx, 1972; Ross, 1978). Una vez inoculados los virus se replican y son transportados entre células a través de los plasmodesmas y a otras partes de la planta a través del sistema vascular (Carrington, 1996). Sólo permanecen libres de virus la semilla madura y los meristemos apicales, aunque existen algunos virus que pueden infectar la semilla. Los cultivares infectados se pueden liberar de virus por medio del cultivo axénico de los meristemos apicales. Los síntomas son típicos para cada tipo de virus y varían con el genotipo del hospedante, su edad y el ambiente. PVA, PVM, PVS, PVY y TRV se expresan claramente

por la alternancia de manchas más claras sobre el color verde normal de las hojas (mosaicos o moteados). (Salazar 1995).

Cada virus se presenta en forma de diferentes variantes o biotipos en la naturaleza. Las variantes pueden distinguirse por a) los síntomas que producen, b) sus características físicas y químicas, c) su concentración en el huésped y d) sus reacciones serológicas (Chuquillanqui, 1992).

La composición de la población de las variantes de un virus puede cambiar cuando nuevas variantes entran a una región, cuando cambia el espectro de los cultivares por cambios en el cultivo o cuando aparecen nuevos mutantes. Las variantes que producen síntomas muy suaves en los cultivares de amplia difusión son muy peligrosas porque las plantas enfermas son difíciles de reconocer. También resulta más laboriosa la producción de semilla sana de tales cultivares (Ross, 1986).

Después de la invasión por virus, los genes de resistencia del hospedante se pueden activar y originar diferentes reacciones (Salazar, 1995). La resistencia a la infección (o resistencia de campo) es una reacción general de defensa de las plantas frente a todos los virus y se observa en diferentes grados en cada variedad. Barker (1984) observó que los cultivares con resistencia a la multiplicación de PLRV contenían menos virus que los cultivares susceptibles y que son fuentes pobres de inóculo para la adquisición de PLRV por áfidos.

El efecto de la resistencia de campo es menor en comparación con los tipos de resistencia necrogénica. Sólo se logra una protección satisfactoria cuando la presión de la

infección es más bien baja. El grado de resistencia a la infección se determina por el porcentaje de plantas infectadas durante el ciclo vegetativo. Se ha probado que la multiplicación del virus está relacionada con la resistencia de los cultivares (Ross, 1983).

Desde que los virus pueden infectar protoplastos *in vitro*, es posible efectuar una selección por resistencia a la infección a nivel celular. Se pueden establecer diferencias cuantitativas entre el número de protoplastos infectados. Estas diferencias reflejan las diferencias de resistencia a la infección entre diferentes genotipos. Esto economizaría años de pruebas en campo (Ross, 1986).

Si se quiere obtener una progenie a partir de clones con resistencia a la infección controlada por genes menores, es necesario que ambos padres tengan un nivel intermedio de resistencia, pues si uno de los padres tiene una resistencia muy baja, la progenie tendrá un nivel de resistencia bajo (Estrada 2000).

En contraste, los tipos de resistencia necrogénica, como la hipersensibilidad localizada o resistencia extrema, confieren una protección absoluta, por ser localizada y más intensa. En casos de resistencia extrema (genes Rx, Ry) no aparecen síntomas o apenas se notan puntos necróticos como de aguja en las hojas superiores; en los injertos se observa una necrosis del borde de las hojas (gen Ry). El tallo principal del brote deja de crecer y las yemas laterales se desarrollan y producen tallos sanos. Las pruebas serológicas muestran resultados negativos en ambos casos (Salazar, 1995).

Los genes mayores para la reacción necrogénica generalmente se presentan en condición *símplice* en los cultivares y líneas seleccionados. Al cruzar las plantas que

contienen estos genes con un progenitor susceptible, aproximadamente el 50% de la progenie tiene la misma resistencia completa. La selección de plántulas resistentes se puede hacer inoculando el virus con una pistola a presión (Ross, 1986).

La mayoría de los genes mayores no son específicos para las variantes (Cockerham, 1970; Ross, 1983) y no se ha observado la pérdida de esta resistencia. Robinson (1976) la llama, en forma apropiada, "resistencia vertical congelada". La escasa presencia de mutantes de virus que rompen la resistencia puede deberse a las pocas unidades de información que un virus puede almacenar en su código genético. Se ha observado que es mucho más difícil para un virus que para un hongo romper la resistencia del hospedante. Rara vez se ha visto en experimentos de invernadero que las variantes de PVX y PVY rompan la resistencia de los genes mayores.

Una importante defensa contra los virus transmitidos por áfidos pueden estar constituidos por los tricomas glandulares que se encuentran en algunas especies silvestres de papa (Mehlenbacher y Plaisted, 1983). Tanto los tricomas de tipo A, de cuatro lóbulos, como los de tipo B, simples, atrapan físicamente a los áfidos y los inmovilizan. Los tricomas B secretan además una feromona de alarma que afecta el comportamiento del áfido (Gibson, 1984). Se ha observado que la herencia de la densidad de los tricomas y el tamaño de los lóbulos, en el caso de la especie *S. x berthaultii*, es de tipo cuantitativo. Sin embargo, el porcentaje de infección con diversos virus transmitidos por áfidos puede variar entre el 22% y 100% en pruebas hechas en *S. x berthaultii*.

3.2.1. Virus del enrollamiento de la hoja (PLRV)

Uno de los mayores desafíos del mejoramiento genético de papa es la incorporación de un tipo de resistencia a PLRV que pueda excluir a este virus del cultivo. En varios países se ha obtenido hipersensibilidad localizada y resistencia extrema para los virus PVA, PVS y PVY, pero no para PLRV. Un cultivar que pueda excluir a PLRV y PVY haría innecesaria la aplicación de aficidas y permitiría que los agricultores de papa de los países en desarrollo usaran semilla de su propia cosecha. Los altos costos de los tratamientos químicos y de la semilla certificada constituyen un gran obstáculo para extender el cultivo de papa en estos países (Estrada, 2000).

PLRV es transmitido por varias especies de áfidos y el más común es *Myzus persicae*. Este áfido transmite el virus en forma efectiva y lo hace durante toda su vida. El 20-40% de los cultivares contraen la infección cada año según las condiciones (Salazar, 1995).

Se han encontrado tres tipos de resistencia a PLRV: resistencia a la infección, resistencia a la multiplicación e intolerancia. Esto puede deberse a razones anatómicas ya que PLRV está restringido al floema y se mueve por este medio sin atravesar el parénquima (Weideman, 1982; Barker, 1990).

La resistencia a la infección se hereda por efecto de genes menores (Baerecke, 1958 y 1961; Davidson, 1973; Hamann, 1979). Para evaluar este tipo de resistencia, se realizan ensayos de campo en regiones que tienen una infestación mediana y estable de áfidos. Se siembran diez plantas de cada clon en surcos intercalados con plantas infectadas. El año siguiente se siembran uno o más tubérculos de cada plántula para detectar el virus

por indexación de tubérculos o usando antisueros. El porcentaje de infección anual puede oscilar entre el 10% y 70%, según los genotipos, bajo condiciones apropiadas para la infección. Otra prueba consiste en distribuir áfidos infectivos en plántulas de pocos centímetros de altura. Después de pocas semanas, se reconocen las plántulas enfermas (Chuquillanqui, 1980).

Entre los materiales resistentes podemos citar a *S. demissum* y a los híbridos *tuberosum-andigena*, a las "razas W" de Müller y a los cultivares originados de la familia MPI 44335, que proviene del clon MPI 19268, ancestro de muchos cultivares holandeses resistentes. Se ha observado alta resistencia en retrocruzamientos de híbridos de *S. acaule* x *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*, como el MPI 441046/10.

Otras fuentes promisorias de germoplasma con alta resistencia a la infección pueden ser obtenidas de las especies *S. eutuberosum* y *S. brevidens*, nativas de Chile y Argentina, o de *S. acaule*.

Hawkes (1947) observó que *S. brevidens* no mostró infección por PLRV en un ambiente de alta infestación de áfidos y Jones (1979) no logró infectar esta especie con FLRV por medio de áfidos. Rizvi (1983) tampoco pudo infectar híbridos de *S. eutuberosum* x *S. pinnatisectum* por medio de áfidos o mediante injertos de patrones con PLRV. Austin (1985) logró híbridos de *S. brevidens* x *S. phureja* por fusión, que luego fueron inoculados con áfidos que portaban PLRV. La mayoría de los clones mostraron la misma resistencia a la multiplicación de virus que *S. brevidens*.

Mediante cruzamientos de *S. stoloniferum* *S. brevidens* se obtuvieron dos resultados prácticos sobresalientes: los híbridos 84-75-16 y 84-630-4. El primero se adaptó muy bien en Bolivia, donde mostró resistencia al tizón tardío (*P. infestans*), al nematodo del rosario (*Nacobbus aberrans*) y a PLRV; fue lanzado como el nuevo cultivar "Jaspe". El segundo híbrido, obtenido del cruzamiento StoPI.160225.6 x brd PI218228.2, también ha mostrado resistencia al tizón y a PLRV, alto rendimiento y excelente calidad para el consumo fresco -como papa salada y al horno- pues su textura es harinosa. Este híbrido dio origen al cv. Morita (Estrada, 2000).

Según Ross (1986), otra fuente de resistencia es *S. acaule*, que parece mostrar un tipo nuevo de resistencia no necrótica a la multiplicación de virus, en la cual no se puede detectar al virus por inoculación por injerto (Brown, 1984b).

Otro tipo de resistencia es la hipersensibilidad sistémica o intolerancia encontrada en los cultivares Apta, Carla, Ida, Monza v Sedira de Alemania y en Kama de Polonia (Arenz, 1956; Baerecke, 1958 y 1968). Si la variedad también presenta resistencia a la infección, puede permanecer completamente sana.

3.2.2. Virus Y (PVY)

Las plantas infectadas con PVY frecuentemente sufren daños más severos que las plantas infectadas con PLRV. Otra característica desfavorable de PVY es que puede presentarse en forma de variantes suaves que causan síntomas leves e incluso en forma latente o no visible. Su transmisión por *Myzus persicae* y otros áfidos es de tipo no persistente, o sea, que requiere corto tiempo entre la adquisición y la inoculación (Kostiw,

1981). Los áfidos comunes no son efectivos porque inducen una fase hiperactiva de los áfidos (Schepers, 1972; Müfler y Hettich, 1983).

Se conocen tres grupos de variantes de PVY. Las variantes comunes (PVY^o) causan los síntomas primarios típicos como líneas oscuras en el envés de las hojas y caída de las hojas inferiores primero y de las superiores al final también. En generaciones posteriores la planta puede mostrar un mosaico severo. Algunas progenies muestran falsos síntomas de PVY debido a factores genéticos. Esto se puede observar en plántulas de semilla botánica. (Estrada, 2000).

El mejoramiento para resistencia es de dos tipos: resistencia a la infección e hipersensibilidad. La primera se basa en genes menores y se observa como una reacción necrótica en algunos cultivares y en clones de *S. phureja* y *S. stenotomum*. Los métodos de selección son similares a los de PLRV. La temperatura debe estar por encima de 18°C cuando se hace la inoculación con pistola (Ross, 1986).

Los genes mayores Ny y Ry participan en la resistencia necrogénica. La reacción depende mucho del biotipo de virus. Los genes Ry proveen una protección completa y controlan la resistencia extrema. Esta fue encontrada por Stelzner (1950) y Cockerham (1970) en *S. stoloniferum* y el gen no es específico para razas (Fernández, 1983). Algunos genotipos con el gen Ry tienen resistencia extrema a PVA, el cual está relacionado con PVY.

En estado temprano las plántulas se pueden seleccionar por su resistencia inoculándolas en bandeja o semillero con una pistola cargada con la savia del virus (Ross, 1960;

Wiersema, 1961 y 1972; Brown, 1981). Las plántulas que no muestran síntomas deben inocularse de nuevo para evitar errores por infecciones latentes. Para asegurarse de la presencia del gen Ry en la población, se deben hacer injertos de prueba en varios de los clones selectos.

Los cultivares que poseen el gen Ry, según varias publicaciones, son Santé, Corine, Bzura, Pilica, San, Szignal, Bárbara, Bison, Fanal, Cordia, Esta, Forelle, Pirola y Wega. Bárbara tiene además el gen Rx para resistencia extrema a PVX. La resistencia de todos, excepto de Corine, proviene de *S. stoloniferum*. Estos cultivares son el resultado de retrocruzamientos con *tuberosum* de tercero a séptimo grado. Un progenitor muy empleado ha sido el MPI 61.303/34 que posee genes de *andigena*, *acaule* (Rx), *demissum*, *spgazzini* (Fb) y *stolonifrrum* (Ry). También se ha detectado resistencia extrema en cultivares de la subsp. *andigena*, que se hereda por un gen dominante (Muñoz, 1975; Gálvez, 1980).

3.2.3. Virus X (PVX)

El virus X se transmite por contacto por medio de heridas y ocasionalmente por hongos del suelo. Tiene una alta infectividad. El mejoramiento para resistencia es de tres tipos: resistencia a la infección, hipersensibilidad local y resistencia extrema. La resistencia a la infección es muy y alta en algunos cultivares; pero sólo se mantiene en la progenie cuando ambos padres tienen alta resistencia. Si un padre es susceptible, se obtiene sólo un 50% de progenie resistente (Estrada 2000).

Las variantes del virus están divididas en varios grupos según su reacción a diferentes genes y el mejoramiento se basa en las reacciones de hipersensibilidad (Nb, Nx) y resistencia extrema (Rx) (Ross, 1986).

Los cultivares con Nx reaccionan con acronecrosis y permanecen siempre libres del virus. La variante agresiva PVX_{HB} se halla en el 7% de los cultivares bolivianos e invade las plantas con los genotipos Nb, Nx, Rx y Rx_{aci} (Moreira et al., 1980). Brown (1984) encontró un gen de resistencia extrema al biotipo HB en *S. sucrense*.

La selección para hipersensibilidad y resistencia extrema se puede realizar inoculando las plántulas con una pistola de aspersion. Se puede obtener mayor precisión por medio de injertos. La variedad alemana Clivia es la más conocida por su hipersensibilidad a PVX pero no se conoce ni el tipo ni el origen del gen.

El gen Rx (Mills, 1965; Cockerham, 1970) se originó en la variedad chilena Villaroela de *S. tuberosum* y ha sido transferido a los cultivares Atlantic, Carlton y Saco y a la línea 41956 de USDA.

El gen Rx_{adg} fue detectado por Wiersema (1961) en la subsp. *andigena* CPC 1673 que también resiste a los patotipos de *Globodera* Ro-1 y Ro-4. El gen Rx_{aci} fue hallado en *S. acaule* (Ross, 1954; Cockerham, 1970; Delhey, 1974) y se incorporó en los cultivares Aguti, Bárbara, Natalie, Saphir y Serrana-INTA, por cruzamiento con el híbrido MPI 44.1016/10. Algunos híbridos de *S. acaule* x *S. stoloniferum* x *tuberosum* tienen ambos genes, Ry y Rx_{aci} (Ross, 1954; Davidson, 1979).

El CIP tiene en sus listas de híbridos para distribución varios clones avanzados con resistencia al tizón combinada con resistencia a PVX a PVY o a ambos virus (Estrada, 2000).

3.2.4. Virus S (PVS)

PVS y PVM son dos carnavirus que están muy relacionados. Sólo se puede hacer un buen diagnóstico de estos virus por ELISA. La reducción del rendimiento a causa de PVS varía entre 10% y 15%. La forma de transmisión más común es por heridas y en algunas variantes por áfidos (Bode y Weidemann, 1971; Kostiw, 1981). Los síntomas son muy leves y por ello es difícil la detección sintomatológica; algunos cultivares tienen altos porcentajes de infección. Por eso se requiere el cultivo de meristemas para un programa de semilla (Ross, 1986).

El cultivar Saco de EE.UU. tiene alta resistencia de campo a la infección. Para la selección, se usan los mismos métodos que para PVY.

3.2.5. Virus A (PVA)

PVA es un miembro del grupo potyvirus y está relacionado con PVY. Los síntomas son diferentes y parecen más como un mosaico o moteado. Su distribución es limitada y está controlada por el gen Na hipersensitivo. El gen Ry_{sto} para resistencia extrema a PVY también es útil con PVA (Ross, 1958; Cockerham, 1970).

3.2.6. Virus "Rattle" del tabaco (TRV)

Algunas variantes de este virus causan un moteado oscuro o verde mas claro en las hojas de papa. Infecta sólo los tubérculos en formación; éstos se deforman y pueden presentar arcos necróticos en la pulpa. En algunos casos los síntomas se asemejan a los síntomas del virus mop top, TRV se transmite por nematodos del género *Trichodorus* (Beemster y Rozendaal, 1972).

3.2.7. Viroide del tubérculo ahusado (PSTVd)

Los viroides son moléculas infecciosas de RNA sumamente pequeñas y circulares, de bajo peso molecular, que carecen de cubierta proteica. Posiblemente se originaron por evolución de los genes del núcleo. En muchos casos no producen síntomas en el follaje; los tubérculos se alargan, se deforman y se cuarteán (Pfannenstied, 1981).

Este viroide es muy peligroso no sólo porque induce la deformación de los tubérculos y la reducción del rendimiento, sino porque se transmite por semilla botánica y por contacto. Si se contaminan los progenitores de un cruzamiento, se produce un problema para la producción de nuevos cultivares; por eso, se debe tener mucho cuidado cuando se envía semilla botánica a otro país. Este viroide se difunde más en altas temperaturas y es raro en las zonas andinas, sobre los 2500 m. (Pfannenstied, 1981).

Ningún cultivar tiene resistencia extrema a PSTVd. Bagnall (1972) inoculó *S. guerreroense* y lo encontró libre en pruebas posteriores. Salazar (1981) no logró infectar el clon Och 11603 de *S. acaule* por inoculación mecánica, pero sí por injerto y también

con *Agrobacterium* como portador del plásmido Ti transformado con secuencias completas de PSTVd.

3.3. Resistencia derivada del patógeno

Como se anotó anteriormente, se han identificado varios tipos de resistencia contra PLRV en diferentes especies de papa. Una alternativa para obtener resistencia al virus fue propuesta por Hamilton (1980), quien propuso la introducción de genes derivados del patógeno. Esta forma de resistencia podría trabajar por expresión de los genes del patógeno en la planta interrumpiendo el ciclo del virus e interrumpiendo la infección.

Los experimentos de Powell (1986) demostraron que plantas transgénicas de tabaco que expresan el gen de la cápside del mosaico del tabaco (TMV) fueron resistentes a la infección con este virus. Subsecuentemente una serie de experimentos fueron realizados para generar resistencia a virus por transformación de plantas con genes estructurales del virus, tal como el gen de la cápside viral y genes no estructurales, como replicasas, proteínas de movimiento y regiones no codificantes (Franco, 1999).

3.3.1. Resistencia generada por la proteína de la cápside (CP)

En plantas de tabaco se han logrado introducir y expresar genes que codifican para la proteína de la cápside (CP) viral y que confirieron resistencia contra el virus del mosaico del tabaco (TMV) (Nejidat, 1990); el virus del sonajero del tabaco (TRV) (Angenent, 1990); el virus del rayado del tabaco (TSV) (Van dun, 1988). También el tabaco se ha utilizado como modelo para estudiar la protección mediada por genes CP en virus que atacan otras

especies: virus X de la papa (PVX) (Hemenway et al., 1988), virus del mosaico del cohombro (CMV) (Candelier –Harvey, & Hull 1993), virus del anillado de la papaya (PRV) (Ling, et al 1991), y virus del dorado temprano de arveja (PeBV) (Van dun et al., 1988).

La interferencia en el ciclo de multiplicación viral, similar a la que ocurre en la protección cruzada, es una de las explicaciones teóricas sobre la protección mediada por genes CP. Esta explicación es sostenida entre otras razones en que ambas pueden ser superadas por altas concentraciones de virus y poseen una baja efectividad contra inoculaciones con RNA (Van den Elzen et al., 1989).

Estudios que buscan extender la protección mediante una CP determinada contra varios virus, han llegado a demostrar que se requieren altos grados de homología. Alrededor del 60%, entre las CP y los virus que se quieren controlar (Nejidat & Beachy, 1990). El mecanismo propuesto para este tipo de protección es el de la heterocapsidación (Candelier-Harvey & Hull, 1993). Dentro de los ensayos exitosos reportados en este contexto se encuentran: protección contra el virus del mosaico del cohombro (CMV) por la CP del virus del mosaico de la alfalfa AIMV (Candelier-Harvey & Hull, 1993); protección diferencial contra varios potivirus por la CP del virus del anillado de la papaya (PRV) (Ling et al., 1991); protección diferencial contra varios tobamovirus por la CP del virus del mosaico del tabaco (TMV) (Nejidat y Beachy, 1990); protección contra el virus del dorado temprano de la arveja (PeBV) por la CP del virus del mosaico del tabaco (TMV) (Van dun et al., 1988).

Estos ensayos demostraron la existencia de un posible riesgo, la interacción entre el transgene y el genoma viral infectivo, produciendo enfermedades virales superinfectivas

(Candelier-Harvey y Hull, 1993). Para contrarrestar este riesgo los mismos investigadores propusieron la contención biológica, consistente en manipular la región del gene CP involucrada con el vector de transformación para eliminar interacciones con genomas vírales.

Estudios de heredabilidad de genes CP fueron realizados con CMV mediante ensayos de ELISA, encontrándose una herencia mendeliana para un gen simple (Ling et al., 1991).

Kawchuck y colaboradores (1990) transformaron tabaco y papa con el gen de la CP de PLRV bajo el control del promotor 35S de CaMV. Se observaron niveles relativamente altos de RNA del transgen que fueron observados en algunas líneas, pero bajas cantidades de CP fueron detectados. Posteriormente fue transformado el cultivar de papa Russet Burbank, con tres diferentes constructos, llevando el gen de CP de PLRV, bajo el control del promotor 35S del CaMV. Dentro de los resultados obtenidos se determinó que el número de copias del transgen no determinaba la expresión del mismo (Kawchuck et al., 1991)

El cultivar Désirée fue transformado con dos constructor, conteniendo el gen del CP en orientación con sentido y antisentido, ambos bajo el promotor 35S del CaMV. El gen de CP en orientación antisentido expresa más bajas cantidades de RNA que el gen con sentido. Por otro lado, la proteína de la CP no fue detectada, usando varios antisueros en ninguna de las 25 líneas y en una de las líneas que expresa el gen antisentido no se observó reducción en la acumulación del virus (van der Wilk et al., 1991).

Barker y colaboradores (1992) en una transformación realizada al los cvs. Désirée y Pentland Squire, con un constructo que contiene el gen de CP de PLRV bajo el promotor 35 S del CaMV, determinaron una alta cantidad de RNA transcrito, pero la proteína no fue detectada en el cultivar Désirée, mientras que en el cultivar Pentland Squire se detectaron pequeñas cantidades. La cantidad de proteína detectada no fue relacionada con la resistencia.

Finalmente, Watherhouse y colaboradores (1997) obtuvieron plantas de papa que tienen el gen de la CP de PLRV bajo el control de dos promotores específicos para sistema vascular, el promotor *RolC* de *Agrobacterium rhizogenes* y el promotor *Sh* del maíz. Los resultados obtenidos muestran que las plantas portadoras del gen de CP bajo el promotor *RolC* presentaron resistencia a la acumulación del virus y una alta expresión en floema, al igual las líneas que tenían el gen bajo el promotor *Sh* presentaron resistencia a la acumulación del virus aunque su expresión en el floema fue más baja.

3.3.2. Pruebas de campo con plantas transgénicas transformadas con el gen de la proteína de la cápside (CP) del PLRV

Kawchuck y colaboradores (1997) seleccionaron una línea no transformada y dos líneas transformadas que contienen dos constructos diferentes obtenidos a partir del cDNA del gen de la CP del PLRV en orientación con sentido. Las líneas fueron seleccionadas con base en sus características agronómicas. Las tres líneas fueron evaluadas en campo para determinar la resistencia al virus y la severidad de los síntomas. En todas las líneas se observó bajos niveles de virus, aunque los síntomas fueron mas severos en la línea no transgénicas.

La reducción en la dispersión del virus del PLRV en campo, en plantas de Russet Burbank transformadas con el gen de la cápside fue observada por Thomas y colaboradores (1997). Ellos usaron dos constructos que contenían el gen de la CP modificado. Cada constructo contiene dos copias del gen de la CP bajo el control transcripcional de dos diferentes promotores: en el primer caso, el promotor 35 S del CaMV y el promotor de la glutamina sintetasa y en el segundo caso el promotor 35 S del CaMV y el promotor del virus del mosaico del figwort. Las líneas que contienen cualquiera de los dos constructos fueron evaluadas en campo, mostrando resistencia al virus en la primera infección. Posteriormente fueron evaluadas en una segunda infección y mostraron marcada resistencia a la dispersión del virus.

3.4. Asignación de fotoasimilados y efecto de la infección viral

A partir de los trabajos clásicos de Warren Wilson (1972, 1981) surgieron los conceptos de potencial de la fuente y potencial de la demanda donde:

Potencial de la fuente (hojas) = tamaño de la fuente x actividad de la fuente, y

Potencial de la demanda (Tubérculos y órganos en crecimiento) = tamaño de la demanda x actividad de la demanda.

La actividad de la fuente corresponde a la tasa de asimilación neta de la planta (TAN) y el tamaño de la fuente al área foliar; la potencia de la fuente es, por tanto, la tasa absoluta de crecimiento de la planta (TAC), es decir, el incremento de peso de la planta por unidad de tiempo.

La actividad de la demanda corresponde a la tasa relativa de crecimiento de los órganos de almacenamiento y metabolismo activo, en tanto que el tamaño de la demanda corresponde al peso seco de estos tejidos; por tanto, la potencia de la demanda corresponde a la tasa absoluta de crecimiento de los órganos de demanda.

Se considera que cuando se logra aislar apropiadamente una unidad fuente-demanda en una planta, el potencial de la fuente es igual al potencial de la demanda, lo cuál es válido por definición: la tasa absoluta de crecimiento de la unidad corresponde a la tasa absoluta de crecimiento de los órganos demanda.

En las plantas puede ocurrir que las limitaciones no ocurran ni en la fuente, ni en la demanda, sino en la vía que comunica estos órganos; por lo tanto se entraría a analizar la relación que se presenta en el modelo fuente-vía-demanda.

Los fotoasimilados producidos en el parénquima fotosintético de las hojas deben ser exportados a otros órganos de la planta donde son requeridos para producción de energía metabólica, crecimiento y almacenamiento; el transporte de dichos compuestos se hace por medio de un sistema especializado denominado floema (considerado como la vía de comunicación entre la fuente y la demanda) que se encuentra localizado en los haces vasculares (Rhodes, 1998 # 5). El proceso por el cual los carbohidratos y demás fotosintetizados son llevados desde las células que los producen hasta el floema (y particularmente, hasta los tubos cribosos del floema), se denomina carga del floema.

La primera parte del transporte de fotoasimilados desde el parénquima fotosintético hasta los haces vasculares ocurre por difusión principalmente vía simplasto, es decir, por el

interior de la célula, pasando de célula a célula a través de conexiones denominadas plasmodesmos, hasta llegar a las células del parénquima floemático (Rhodes, 1998 #7); el paso posterior de fotoasimilados hasta los tubos cribosos del floema puede ocurrir según dos posibles vías; por el apoplasto o por el simplasto (Van Belaje, 1993). En el caso particular de la papa la descarga a los tubérculos es de tipo simplástico (Stitt & Sonnewald, 1995).

Finalmente, el modelo fuente-vía-demanda se puede ver afectado principalmente por la acumulación de virus en el floema. Se ha observado que el virus utiliza este tejido, como vía de dispersión y ruta de transporte en la planta, vía plasmodesmos (Mushegian & Koonin, 1993, Lucas & Gilbertson, 1994). En la mayoría de los casos se observa necrosis asociada con la infección (Golinowski et al, 1987, Wilson & Jones, 1992). Barker & Derrick (1997) determinaron que la acumulación de virus en tallos causa alteraciones morfológicas en las células del floema, ellos consideran que esta afección es la causa directa del rompimiento en la comunicación entre la fuente y la demanda, generando una reducción en la producción de tubérculos.

3.5. Obtención de plantas transgénicas de *Solanum phureja* cv. Yema de Huevo

Franco (1998) obtuvo clones transgénicos de *S. phureja* cv. Yema de huevo (clon1), denominados líneas "AT", a partir de discos de folíolos que fueron cocultivados con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, que posee del plásmido pSCR107 (Barker et al., 1992), desarrollado del pROK2, un vector binario basado en pBin19 (Bevan, 1984).

Este vector contiene una secuencia de cDNA complementario desarrollada del genoma del PLRV que va desde el nucleótido 3582 a 4581 e incluye el ORF3 que corresponde al gen de la proteína de la cápside (CP) del virus, bajo la regulación del promotor CaMV 35S, terminando con la secuencia de poliadeninas de la nopalina sintetasa.

Las plantas fueron obtenidas por organogénesis *in vitro* a partir de los discos de folíolos de *S. phureja* en medios con kanamicina, incubados a 20°C y 2000 lux. Cuando los brotes se desarrollaron fueron transferidos a medio MS30 con cefotaxime y kanamicina y finalmente fueron adaptados a condiciones de invernadero (Franco, 1998).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Localización

Las fases de micropropagación *in vitro* se realizaron en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Biotecnología; el trabajo de Caracterización Molecular se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Virus de la Facultad de Medicina, ambos de la Universidad Nacional de Colombia. Las evaluaciones de resistencia se trabajaron en condiciones de invernadero, en la Estación Experimental San Jorge del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), ubicada en el municipio de Soacha a una altura de 2800 msnm.

4.2. Micropropagación y mantenimiento *in vitro* del material vegetal

Los clones transformados 49, 63, y 100 y los no transformados AT 14 y 81 obtenidos por organogénesis de hoja de *S. phureja* cv. Yema de Huevo, al igual que el clon1 utilizados en este trabajo, fueron micropropagados y mantenidos en medio líquido compuesto por las sales de acuerdo con la formulación Murashige y Skoog (1962), suplementado con vitaminas Morel y sacarosa 30 g/L, el pH se ajustó 5.8 y posteriormente se esterilizó a 121°C, durante 20 minutos.

Los clones se mantuvieron en cuarto de crecimiento a una temperatura de 18°C ± 2 con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

4.3. Adaptación a condiciones de campo y obtención de tubérculos

Una vez micropropagadas las plantas de los diferentes clones, tuvieron una pre-adaptación a condiciones *ex vitro*, utilizando papel celofán en frío estéril, como tapa para los frascos donde se mantuvieron las plantas en condiciones *in vitro*. Luego de 25 días, las plantas fueron transplantadas en materas con turba (Sunchine) en condiciones de invernadero. Estas fueron cubiertas con vasos plásticos transparentes que se fueron perforando hasta observar la completa adaptación en condiciones de exterior luego de 30 días. Posteriormente fueron transplantadas a materas con 3 Kg de suelo fertilizado con Calfos Paz del Río en una proporción de 1000 kg/ha. y 500 kg/ha. de NPK 10-30-10 al fondo de la matera dos días antes de hacer el transplante.

Los minitubérculos obtenidos de esta primera fase fueron sembrados con las mismas condiciones de fertilización señalada anteriormente. Los tubérculos obtenidos de esta cosecha fueron utilizados para la primera inoculación.

4.4. Evaluación de resistencia

4.4.1. Primera inoculación

Los tubérculos obtenidos de las plantas desarrolladas a partir de los mini tubérculos, se utilizaron para realizar la primera inoculación. Estos fueron sembrados individualmente en materas con aproximadamente 3.5 Kg de suelo fertilizado como se describió en la sección 4.3.

Luego de 30 días cuando las plantas alcanzaban entre 20 a 25 cm de altura, con ayuda de un hoja de afeitar nueva a 8 o 10 plantas de cada uno de los clones AT y clon1 (patrones), se les realizó una incisión oblicua de 0.5 a 1 cm de profundidad hacia abajo en el tallo, luego se tomó un brote joven (púa) de *Solanum tuberosum* cv. Maris Piper, donde había sido aislado el virus inicialmente (Franco, 1998) y se insertó en la incisión fijándolo con parafilm, posteriormente se cubrió con una bolsa plástica transparente previamente humedecida para mantener una humedad relativa superior al 90% evitando la deshidratación tanto del patrón como de la púa (Chuquillanqui & Jayasinghe, 1992).

El cv. Maris Piper fue donado por el Dr. Hugh Barker del Scottish Crop Research Institute, Dundee, UK; es un cultivar susceptible al PLRV que presenta títulos virales altos y ha sido utilizado como portador y transmisor del virus en varios ensayos realizados por él, garantizando que el virus inoculado fuera solamente PLRV.

El injerto se evaluó durante 5 días consecutivos, asegurándose que la bolsa permaneciera humedecida; después de este tiempo se retiró la bolsa (figura 1) y se determinó la transmisión del virus con la prueba de ELISA en tallo y hojas superiores a los 60 y 90 días. Esta metodología ha sido utilizada satisfactoriamente para transmisión del virus en estudios similares realizados por Barker & Harrison (1985), Barker & Derrick (1997) y Franco (1998)

Los tubérculos obtenidos en la primera inoculación, fueron recolectados en bolsas perforadas de papel kraft, y almacenados durante 60 días en cuarto frío a 4°C, para retrasar la brotación mientras las plantas del cv. Maris Piper se desarrollaban con el fin de utilizarlas como púa y realizar la segunda inoculación.



Figura 1. Inoculación viral por injerto, utilizando el cv. Maris Piper como portador del virus.

4.4.2. Segunda inoculación

Los tubérculos de las plantas que presentaron mayor título viral en la primera inoculación, fueron utilizados para la evaluación de resistencia. Una vez que las plantas presentaron una longitud de 20 a 25 cm se realizó de nuevo el injerto a 15 plantas de cada uno de los clones estudiados, utilizando el cv. Maris Piper como portador del virus, tal como se describió en el numeral anterior.

Con el fin de obtener inoculaciones con títulos virales similares, las plantas del cv. Maris Piper utilizadas como púa fueron evaluadas por ELISA antes de realizar el injerto y se

Se determinaron los títulos virales con la prueba de ELISA tanto en tallo como en hojas superiores a los 30, 60 y 90 días después de inocular.

4.4.3. Análisis estadístico

Para determinar diferencias entre los tratamientos (clones) evaluados en la prueba de resistencia realizada con la segunda inoculación, se utilizó un diseño completamente al azar, con 10 repeticiones.

4.4.4. Prueba de ELISA

Los títulos virales en tallo y hojas fueron determinados por la técnica de DAS-ELISA utilizando el KIT comercial de AGDIA. El tejido lavado 2 veces con agua destilada estéril fue macerando con buffer de extracción (Sulfito sodio 1,3 g, polivinilpirrolidona (PVP) MW 24-40,000 20g, azida de sodio 0,2 g, albúmina de huevo 2,0g, disuelto en 1L de PBS-T 1X, pH 7,4) en una proporción de 0,5 g:2,5 ml. Después de centrifugar el homogenizado a 4000g por 5 minutos, se recupero el sobrenadante y se colocaron 100 μ l del extracto en cada pozo de cada uno de las plantas de los clones evaluados y se incubaron toda la noche a 4°C, cubriendo la placa con papel de aluminio.

Al siguiente día se lavaron los pozos de la microplaca 4 veces con 400 μ l PBS-T (Cloruro de sodio 8,0 g , fosfato de sodio dibásico (anhydro) 1,15 g, fosfato de potasio monobásico 0,2 g, cloruro de potasio 0,2 g, Tween 20 0,5 g, pH 7,4) y enseguida se adicionaron 200 μ l del anticuerpo conjugado en cada pozo (solución stock de gamma globulina específica de PLRV acoplada a fosfatasa alcalina, obtenida de AGDIA, USA). Se incubó a 37°C por 4 horas en cámara húmeda.

Luego de lavarlo con PBS-T como se indicó anteriormente, se agregó 200ml de solución sustrato de PNP (Buffer PNP (cloruro de magnesio 0,1 g, azida de sodio 0,2 g, dietanolamina 97,0 ml pH 9,8) 1mg/ml de p-nitrofenil fosfato). Se incubó el sustrato durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. La reacción se detuvo adicionando 50 μ l de hidróxido de sodio 3M. La lectura de la OD₄₀₅ se llevó a cabo en un lector de ELISA (BIO-RAD modelo 550).

Las muestras se consideraron positivas cuando los valores de OD₄₀₅ fueron tres veces el valor de media del control negativo (Torrance, 1999).

4.5. Extracción de DNA genómico

Se pesaron 100 mg de hojas jóvenes de plantas libres de virus de cada uno de los clones en estudio. En un mortero pre-enfriado con nitrógeno líquido se maceraron las hojas hasta obtener un polvo fino; este fue transferido a tubos Eppendorf de 1,5ml y se adicionaron 700µl de bufer CTAB 2X (CTAB 2%, NaCl 1,4M, EDTA 20 mM, Tris HCl 100 mM pH8.0, PVP 2%) y 4µl de β-mercaptoetanol, se mezcló por inversión y se incubaron las muestras a 65°C por 45 minutos, agitando suavemente cada 10 minutos.

Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se agregaron 700µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) en cada tubo, se mezclaron los tubos por inversión y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 50µl de buffer CTAB al 10% en NaCl 0,7M por tubo agitándolos suavemente hasta obtener una mezcla uniforme.

Posteriormente se adicionaron 700µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) en cada tubo, se mezclaron los tubos por inversión y se centrifugaron a 14.000 rpm (Microcentrífuga JOVAN BR4i) durante 5 minutos, este paso se repitió de dos a tres veces hasta obtener un sobrenadante sin interface, lo que indicó que se había eliminado las proteínas.

Al sobrenadante recuperado se le agregó un volumen de isopropanol frío (500-600 μ l) a cada tubo y se mezcló por inversión suavemente, los tubos se dejaron toda la noche a -20°C .

El siguiente día las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante cuidadosamente y el precipitado se dejó secar, invirtiendo los tubos abiertos por 30 minutos.

Se lavó el precipitado de DNA con 1ml de etanol al 70% por tres minutos, luego se centrifugaron las muestras a 14.000 rpm durante 30 minutos. Se eliminó el etanol al 70% y se agregó 1 ml de etanol al 90%, se centrifugaron las muestras y se eliminó el etanol. Finalmente se dejó secar el DNA dejando los tubos invertidos abiertos toda la noche.

Al siguiente día se resuspendió el DNA en agua destilada desionizada estéril y se agregaron 2 ml de RNAsa 10 mg/ml (libre de DNAsa) se homogenizaron las muestras y se incubaron a 37°C por 3 horas. La reacción se detuvo colocando los tubos a 4°C (Doyle & Doyle, 1990).

4.6. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Los geles fueron preparados con agarosa grado electroforesis (GIBCO BRL) en buffer TBE 0,5X (Tris -borato 0,045 M, EDTA 0,001M) en concentraciones desde 0,7% hasta 1% dependiendo el tamaño del DNA analizado. La agarosa fue disuelta por calentamiento con el buffer TBE. Las muestras de DNA fueron mezcladas con buffer de carga 6X (azul de bromofenol 0,25% W/V, xilen cianol 0,25% W/V y glicerol 30% en agua destilada

desionizada) y colocadas en el gel. Para estimar el tamaño de la banda de interés se utilizó el marcador de peso molecular de 1KB (Promega cat. G5711).

El gel se tiñó por 5 minutos en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ y la separación de las bandas de DNA fueron observadas por exposición del gel a radiación UV (Sambrook et al, 1989), el resultado fue capturado en un digitalizador de imagen (BIO-RAD) utilizando el programa Quantity One 1999.

4.7. Purificación de DNA

Las muestras de DNA genómico fueron mezcladas con buffer de carga y colocadas en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en TBE 0,5 X. Después de realizar la corrida en la cámara de electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio y las bandas de DNA total fueron localizadas y removidas con un bisturí, visualizándolas en un transluminador de ultravioleta Hoefer Mighty Bright.

Los trozos de gel donde se ubicaron las bandas fueron colocados en tubos Eppendorf y se les adicionó 5 volúmenes de buffer (Tris-HCl 20mM pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0), los tubos se taparon y se incubaron por 5 minutos a 65°C.

Los tubos se enfriaron a temperatura ambiente y se les agregó 1 volumen de phenol, equilibrado con Tris-HCl 0,1M pH 8,0. Se mezcló con vortex por 20 segundos y se recuperó la fase acuosa por centrifugación a 4000g por 10 minutos. Se realizó la re-extracción de la fase acuosa con 1 volumen de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1. (Sambrook et al, 1989).

La fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo y se adicionó 1 volumen de isopropanol y se mezcló por inversión suavemente, los tubos se dejaron toda la noche a -20°C.

El siguiente día las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante cuidadosamente y el precipitado se dejó secar, invirtiendo los tubos abiertos por 30 minutos.

Se lavó el precipitado de DNA con 1ml de etanol al 70% por tres minutos, luego se centrifugaron las muestras a 14.000 rpm. durante 30 minutos. Se eliminó el etanol al 70% y se agregó 1 ml de etanol al 90%, se centrifugaron las muestras y se eliminó el etanol. Finalmente se dejó secar el DNA dejando los tubos invertidos abiertos toda la noche.

Al siguiente día se resuspendió el DNA en agua destilada desionizada estéril y se almacenó a 4°C para ser utilizado en las digestiones, hibridaciones y ensayos de PCR. (Doyle & Doyle, 1990).

4.8. Cuantificación de DNA

La cuantificación de DNA genómico, se realizó en un gel de agarosa al 0,7% en TBE 0,5X, teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Se comparó la intensidad de la banda del DNA del fago λ (100 ng/µl) con las bandas del DNA total de los clones en estudio (Sambrook, 1989).

4.9. Pruebas moleculares

4.9.1. Amplificación del gen de la cápside por PCR

La amplificación de un fragmento del gen de la cápside del PLRV por PCR sirvió como evidencia de la transformación realizada por Franco (1998). Con base en el protocolo del kit para PCR de Boehringer Mannheim, en un tubo Eppendorf de 200 μ l, se colocaron 2,5 μ l de buffer PCR con $MgCl_2$ 10X, 2,5 μ l de dNTP's 10X, 4.5 unidades de DNA polimerasa 0,5 μ l de DNA total (50 ng) y 1 μ l de cada uno de los "primers" CPf y CPr (20 pmol), el volumen final de reacción que fue de 25 μ l se completó con agua HPLC estéril.

Los "primers" utilizados en la PCR fueron reportados por Franco (1998) y sintetizados por GIBCO BRL. Las secuencias son las siguientes:

CPf (forward): 5' TAGCATGCCAGTGGTTAGTGGTC 3'

CPr (reverse): 5' GCCTCGAGTCTACCTATTTGG 3'

La reacción fue llevada a cabo en un termociclador Perkin Elmer 2400 usando el siguiente programa: (i) 1 ciclo de 95°C por 5 minutos, (ii) 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; y (iii) 72°C por 5 minutos.

Los productos de PCR, se analizaron en un gel de agarosa al 0,7% en buffer TBE 0,5X, en una cámara de electroforesis GIBCO BRL Horizon^R 11-14, corridos a 50 voltios por 3 horas. Posteriormente se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 μ g/ml durante 5 minutos; las bandas de DNA fueron observadas por exposición del gel a

radiación UV (Sambrook et al, 1989), el resultado fue capturado en un digitalizador de imagen (BIO-RAD) utilizando el programa Quantity One 1999.

Para estimar el tamaño de la banda de interés se utilizó el marcador de peso molecular de 1KB (Promega). Como control positivo se usó el plásmido pSCR103 que contiene la secuencia del gen de la cápside del PLRV (figura 2), donado por el Dr. Hugh Barker del Scottish Crop Research Institute, Dundee, U.K.

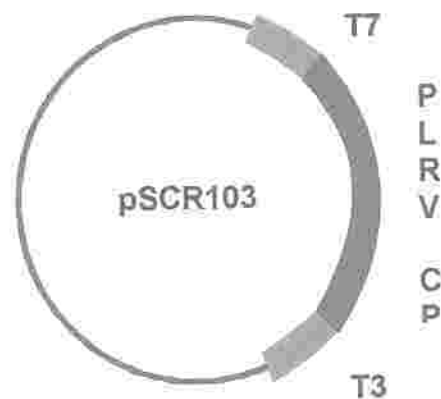


Figura 2. Plásmido pSCR103 portador del gen de la cápside del virus del enrollamiento de la hoja de papa, insertado entre los promotores T7 y T3.

La prueba de amplificación por PCR se acepta como evidencia molecular en la transformación genética y se utiliza como alternativa a la prueba de hibridación de DNA "Southern blotting" (BioFeedback, 1991).

4.9.2. Síntesis de la sonda marcada con digoxigenina

Con el fin de confirmar el número y presencia del inserto en las líneas AT transformadas, se sintetizó una sonda marcada con Digoxigenina. Para la síntesis se utilizó como

templete el plásmido pSCR103 (Barker et al, 1992), que contiene la secuencia del gen de la proteína de la cápside del PLRV (figura 2).

Utilizando el Kit de PCR de Boehringer Mannheim (Cat. No. 1636 090), en un tubo Eppendorf de 200 μ l se colocaron 5 μ l de PCR buffer con $MgCl_2$ 10X, 2 μ l de dNTP's 10X, 3 μ l de dNTP's DIG MIX 10X, 4 μ l de primer T3 y 4 μ l de primer T7 (20 pmol), 100 ng de plásmido y 1 μ l de enzima Mix Expand High Fidelity (2.6 unidades). El volumen final de la reacción fue 50 μ l que se completaron con agua calidad HPLC estéril.

Los "pimers" utilizados en la PCR fueron reportados por Barker (1992) y sintetizados por GIBCO BRL. Las secuencias son las siguientes:

T7 (forward): 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

T3 (reverse): 5' TAACCCTCACTAAAGGGA 3'

La reacción fue llevada a cabo en un termociclador Perkin Elmer 2400 usando el siguiente programa: (i) 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, (ii) 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 50°C por 50 segundos, 72°C por 1 minuto; y (iii) 1 ciclo a 95°C por 30 segundos, 50°C por 50 segundos y 72°C por 5 minutos.

Los productos de PCR, se analizaron en un gel de agarosa al 0,7% en buffer TBE 0,5X, en una cámara de electroforesis Gibco BRL Horizon[®] 11-14, corridos a 50 voltios por 3 horas. Posteriormente se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 μ g/ml durante 5 minutos; las bandas de DNA fueron observadas por exposición del gel a

radiación UV (Sambrook et al, 1989), el resultado fue capturado en un digitalizador de imagen (BIO-RAD) utilizando el programa Quantity One 1999.

Para estimar el tamaño de la banda de interés se utilizó el marcador de peso molecular de 1KB (Promega). Como control positivo se usó el plásmido pSCR103 que contiene la secuencia del gen de la cápside del PLRV (figura 2).

4.9.3. Digestión de DNA genómico

Para la digestión del DNA genómico de cada uno de los clones, se tuvo en cuenta que las enzimas utilizadas realizaran un corte en la región interna y otro en la región externa del inserto. Esta fue realizada siguiendo el protocolo de Promega para *Hind* III (cat. R6041) y *Bam*H I (cat. R6021). El volumen final de la reacción de cada enzima para cada clon independientemente fue de 25 μ l, el cual incluyó: buffer 10X específico para cada enzima, BSA acetilada a una concentración final de 0,1 mg/ml, enzima de restricción 1U/ μ g DNA y 8 μ g de DNA total de cada uno de los clones estudiados.

La reacción fue llevada a cabo en un tubo Eppendorf de 200 μ l, a 37°C en baño seco (Fisher Scientific) durante toda la noche. Al día siguiente 5 ml de cada una de las digestiones fueron corridas en un gel de agarosa al 0,7% en TBE, a 50 voltios en una cámara de electroforesis horizontal, para determinar si la digestión había sido completa.

Las digestiones realizadas fueron utilizadas para realizar el "Southern blotting" con el fin de determinar el número de insertos en cada clon transformado.

4.9.4. "Southern Blotting"

Los DNAs genómicos digeridos con las enzimas *Hind* III y *Bam*H I, fueron corridos en un gel de agarosa al 0,7% en TBE, en una cámara de electroforesis horizontal (Horizon 11-14 GIBCO BRL) durante 5 horas con una fuente de poder (GIBCO BRL Model 4001) a 50 voltios.

Cuando el azul de bromofenol del frente de corrido estaba próximo a salir del gel, el corrido electroforético fue detenido. El gel fue suspendido en solución de predenaturación (0.2 N de ácido clorhídrico) agitándolo suavemente durante 10 minutos, luego el gel fue lavado en agua destilada desionizada y sumergido en solución denaturante (0,5 N de hidróxido de sodio, 1,5 M de cloruro de sodio) durante 15 minutos en agitación constante. El gel fue lavado en agua destilada desionizada y sumergido en solución de neutralización (1 M Tris [pH 7,4], 1,5 M de cloruro de sodio) 15 minutos dos veces.

El DNA fue transferido por capilaridad a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond-positive, Boehringer Mannheim). El gel fue colocado sobre dos capas de papel Whatman 3MM que sirvió de fuente capilar, sumergido en buffer SSC 20X (3 M de cloruro de sodio, 300 mM de citrato de sodio), dos piezas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño del gel fueron colocadas sobre él. Posteriormente, cerca de 5 cm de papel absorbente fueron colocadas sobre el papel Whatman 3 MM que cubría el gel y al final de todo el montaje se colocó una pesa de aproximadamente 1 Kg de peso. Este montaje colocado sobre un puente acrílico sumergido en recipiente de vidrio que contenía buffer SSC 20X se dejó durante toda la noche.

El día siguiente las capas de papel absorbente junto con las de whatman fueron retiradas y el gel fue teñido con solución de bromuro de etidio para observar si todo el DNA había sido transferido a la membrana de nylon.

El DNA fue fijado a la membrana, sometiéndola a 120°C durante 30 minutos en una incubadora. Finalmente, la membrana se lavó con agua destilada y se secó a temperatura ambiente entre dos hojas de papel whatman (Sambrook et al, 1989).

4.9.5. "Dot Blotting"

Los DNAs genómicos de los clones estudiados, se denaturaron por calentamiento en agua a 92°C durante 10 minutos, posteriormente los tubos fueron colocados rápidamente en un baño de hielo durante 5 minutos. Alícuotas de 2-3 µl de cada una de las muestras fueron colocadas en una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond-positive, Boehringer Mannheim).

El DNA fue fijado a la membrana, sometiéndola a 120°C durante 30 minutos en una incubadora. Finalmente, la membrana se lavó con agua destilada y se secó a temperatura ambiente entre dos hojas de papel whatman.

4.9.6. Hibridación

Tanto las membranas de "Southern Blotting" como las de "Dot Blotting", fueron hibridadas independientemente bajo las mismas condiciones utilizando el Kit Dig Luminescent Detection de Boehringer Mannheim (cat. 1363 514)

Las membranas fueron prehibridadas en un hibridador (TECHNE hybridiser HB-2D) con buffer estándar (5X SSC, 0,1% (W/V) de N-laurilsarcosina, 0,02% (W/V) de SDS, 1% de reactivo de bloqueo), durante 2 horas a 60°C. Se adicionaron 3µl de sonda marcada con digoxigenina denaturada a 92°C durante 10 minutos, por ml de solución de hibridación. Las membranas fueron hibridadas durante 18-20 horas. Finalmente la solución de hibridación fue recuperada y almacenada a -20°C para posteriores hibridaciones.

La membrana se lavó dos veces a temperatura ambiente por 5 minutos, con 2X de SSC y SDS al 1%. Luego se realizaron dos lavados por 15 minutos con 0,1X de SSC y 0,1% de SDS a la temperatura de hibridación, ambos lavados se realizaron en el hibridador.

Para la detección se lavaron las membranas durante 5 minutos en buffer de lavado (0,1 M de ácido maléico, 0,15 M de NaCl pH 7,5 y 0,3% (v/v) de Tween 20) a temperatura ambiente; se incubaron 30 minutos en solución de bloqueo 1X (10% (w/v) del reactivo de bloqueo en buffer de ácido maléico). Se diluyó el conjugado anti-DIG-AP a 75 mU/ml (1:10000) en buffer de bloqueo (1X) y se incubaron las membranas por 45 minutos; luego se retiró el conjugado y se lavaron las membranas 2 veces por 15 minutos con buffer de lavado.

Las membranas se equilibraron 5 minutos en buffer de detección (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5), y se incubaron 5-7 minutos con NBT (75mg/ml de nitro blue tetrazolium salt Boehringer Mannheim cat. 1383213 en dimetilformamida al 70% (v/v)) y BCIP (50mg/ml de 5-bromo-4 cloro-3 indolyl phosphate, toluidinium salt, Boehringer Mannheim cat. 1383221 en 100% de diemetilformamida). Las bandas se detectaron por la aparición de una coloración azul intensa en las membranas.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Caracterización molecular de clones transgénicos

5.1.1. Amplificación del gen de la cápside del PLRV con PCR

La amplificación por PCR de un fragmento de aproximadamente 500 pb que va desde el nucleótido 3791 a 4327, utilizando los primer CPf y CPr descritos en la 4.9.1., que anillan en la región interna del gen de la cápside (figura 3), según la secuencia del genoma viral de PLRV (Mayo et al, 1989), evidenció la presencia física del inserto en el DNA genómico extraído de los clones transformados AT49, AT63 y AT100 (figura 4). Con el propósito de verificar la especificidad de la reacción se utilizó como control positivo de la prueba, la amplificación del fragmento utilizando el plásmido pSCR103 donde fue clonado el gen de la cápside (Barker et al, 1992) (figura 2).

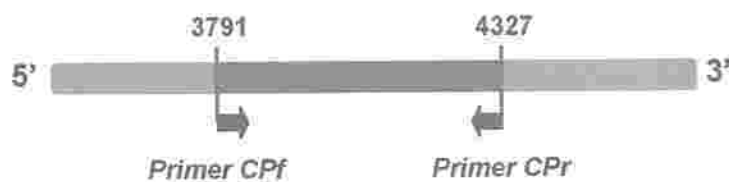


Figura 3. Esquema de amplificación en la región interna del gen de la cápside del PLRV por PCR.

Los clones AT14 y AT81 (obtenidos por organogénesis de hoja en los procesos de transformación) en los cuales no hubo inserción del transgen y el clon1, fueron utilizados como control negativo de la reacción, por ser derivados del clon1 al igual que los clones transformados y no presentar ninguna amplificación en la PCR (figura 4).

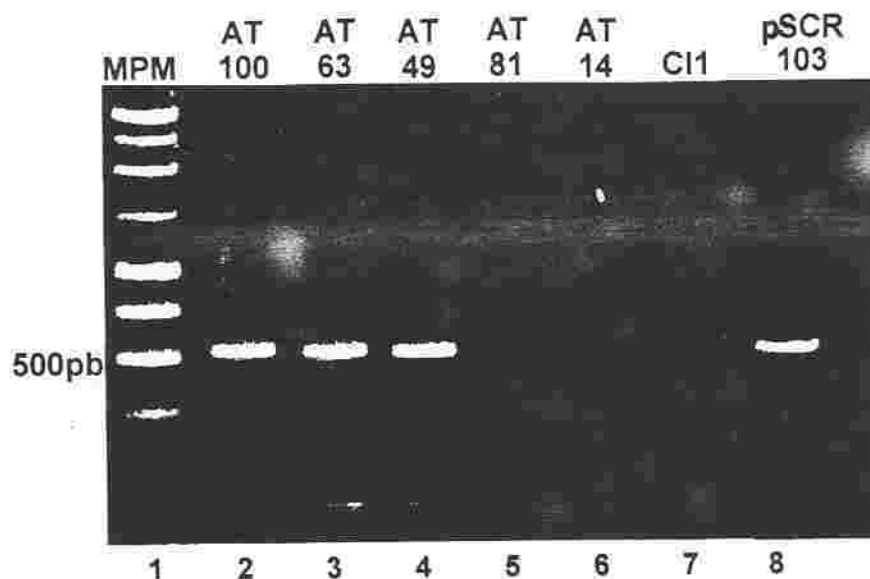


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% del fragmento de la cápside del PLRV amplificado por PCR; utilizando DNA genómico de los clones evaluados. En los carriles 2, 3 y 4 se observa la amplificación del fragmento del gen de interés en los clones transformados y en el carril 8 el control positivo. Por el contrario en los carriles 5, 6 y 7 no se observa amplificación por tratarse de los clones no transformados.

Con la prueba de PCR se comprobó la transformación realizada con la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* por Franco (1998).

Los resultados obtenidos indican que las condiciones con las que se realizó la reacción de PCR fueron específicas, dado que se obtuvo la amplificación de la secuencia esperada en los clones transformados y el plásmido. La comprobación de las condiciones de la PCR para la amplificación de la región interna del gen de la cápside del PLRV, permitió realizar parte de la evaluación molecular y confirmar la presencia del inserto en el genoma, tanto

en las dos fases de micropropagación *in vitro* como en los tres ciclos de cultivo realizados en condiciones de invernadero.

La estabilidad que presentó el inserto en las generaciones clonales, se comprobó a través de esta técnica, en forma similar a lo evaluado en *Solanum tuberosum* por Conner (1996),

5.1.2. Construcción de la sonda

De la amplificación con PCR del gen de la cápside del PLRV presente en el plásmido pSCR103, se obtuvo un fragmento marcado con digoxigenina de aproximadamente 1000pb (figura 5), correspondiente al tamaño esperado utilizando los primers T3 y T7 descritos en la 4.9.2. Este fragmento se utilizó como sonda para las hibridaciones "Dot blotting" y "Southern blotting" con el fin de determinar la presencia del transgen y el número de inserciones.

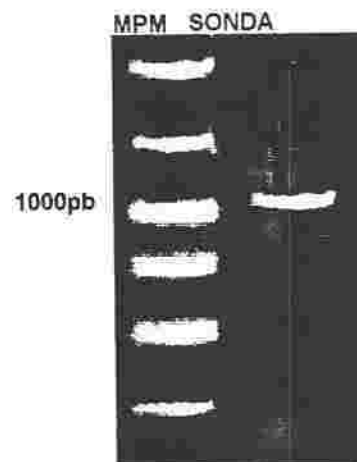


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la amplificación con PCR del gen que codifica para la cápside del PLRV.

El haber realizado una síntesis completa del gen de la cápside del PLRV permitió la hibridación de los fragmentos obtenidos en las digestiones de DNA total de los clones transformados con *Bam* HI.

5.1.3. Hibridación de DNA total "Dot Blotting"

Buscando establecer la cantidad de DNA necesario para determinar el número de insertos y las condiciones de hibridización, con el DNA genómico extraído de hojas jóvenes de plantas libres de virus de los clones en estudio, fue realizada la detección del gen de la cápside del PLRV por "Dot blotting".

La realización del "Dot blotting", se llevó a cabo en una membrana de nylon cargada positivamente, donde se colocaron 1,5 µg de DNA total de todos los clones en estudio (figura 6); como control positivo de la prueba se colocaron 100, 250 y 500ng del plásmido pSCR103 y producto amplificado del gen de la cápside por PCR, como control negativo se utilizó DNA de clon1.

Los ensayos de "Dot blotting" sirvieron para determinar que la mínima cantidad detectable del gen de interés, revelando con NBT y BCIP era alrededor de 100 ng; aunque el fabricante del Kit (Boehringer Mannheim) señala que se pueden detectar copias únicas en concentración entre 10-50 ng, en estos ensayos no se detectó hibridación a una concentración de 50 ng de plásmido. La temperatura a la cual se observó una hibridación específica y en el revelado no hubo "background" fue 60°C. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se realizó el "Southern Blotting" para establecer el número de insertos en los clones transformados.

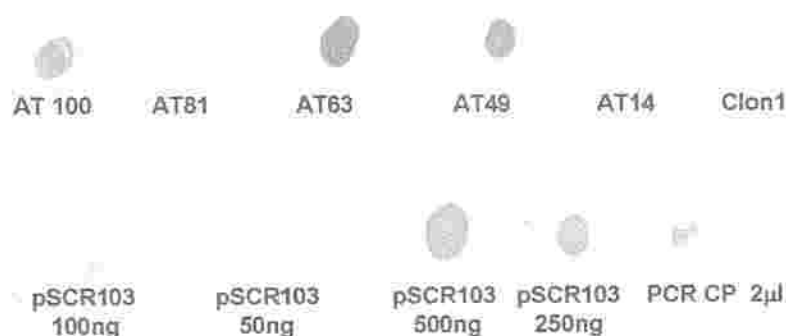


Figura 6. Dot blotting de DNA genómico de los clones AT y clon1, hibridado con sonda marcada con Digoxigenina. Como controles se utilizó diferentes concentraciones del plásmido pSCR103 y amplificado del gen de la cápside por PCR.

Esta técnica junto a la reacción de PCR realizada, fue otra forma de corroborar la presencia física del gen de la cápside en el DNA genómico de las plantas transformadas.

5.1.4. Determinación del número de insertos con "Southern Blotting"

La separación electroforética en gel de agarosa al 0.7% de 8 µg el DNA genómico digeridos independientemente, con las enzimas *Hind* III y *Bam* HI e inmovilizado en una membrana de nylon cargada positivamente, sirvió para determinar el número de inserciones del gen de la cápside del PLRV en los clones transformados. La primera enzima cortó el fragmento insertado en la región donde se encuentra ubicado el promotor CaMV 35, permitiendo que el gen de la cápside quede completo, la segunda enzima cortó el gen de la cápside internamente generando dos fragmentos (Figura 7). De igual

forma, ambas enzimas cortaron el DNA genómico de los clones generando fragmentos de diferentes tamaños.

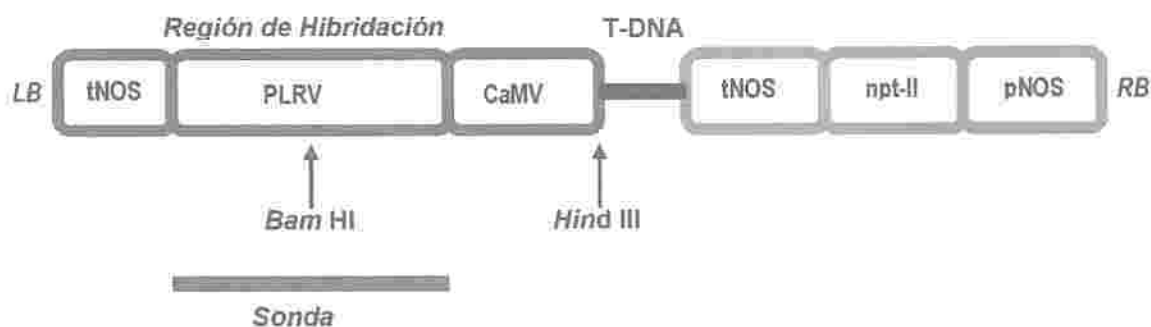


Figura 7. Fragmento de T-DNA indicando los sitios de corte de las enzimas de restricción y la región de hibridización con la sonda marcada con Digoxigenina.

Esta estrategia permitió establecer que si se detectaba una banda en las digestiones con *Hind* III, se debían presentar dos bandas en las digestiones con *Bam* HI una vez realizada la hibridación y el revelado con NBT y BCIP, por generar dos fragmentos hibridables a partir de un inserto del transgen, dado que corta internamente el gen de la cápside, indicando que el clon en cuestión presenta una copia del inserto.

Teniendo en cuenta lo anterior, el resultado obtenido en la hibridación muestra que los clones AT 63 y AT 100 presentan 2 insertos del gen, mientras que el clon AT 49 solamente presenta un inserto (figura 8). En contraste, los clones AT 14, AT 81 y clon1 que no fueron transformados no presentan ningún tipo de banda luego de realizar la hibridación y el revelado (figura 8), al igual que se observó en el "Dot Blotting".

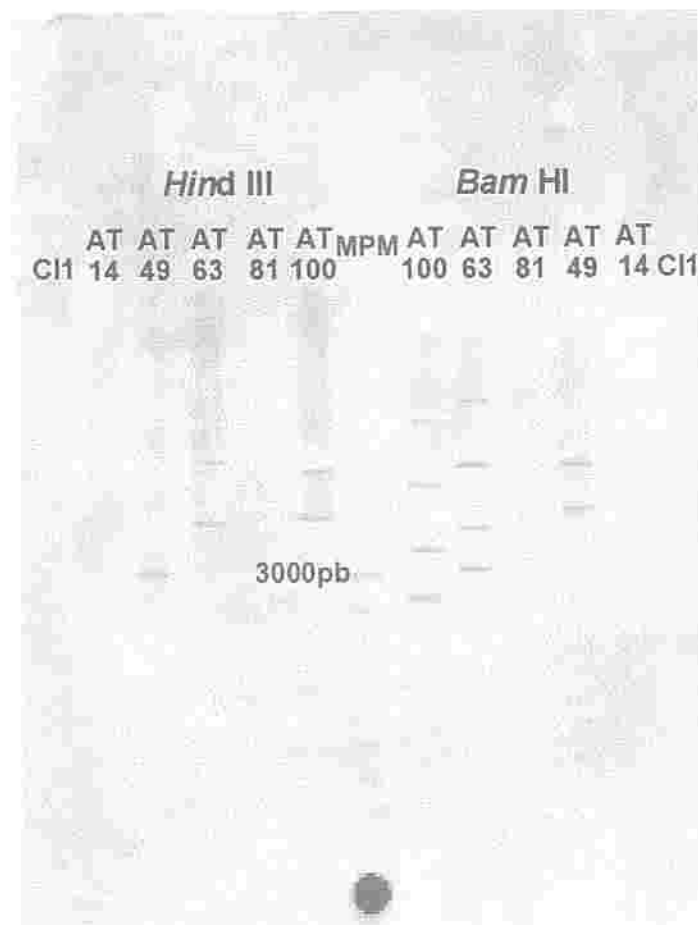


Figura 8. Southern Blotting de DNA genómico digerido con las enzimas *Hind* III y *Bam* HI, hibridado con sonda del gen de la cápside del PLRV marcada con digoxigenina.

El diseño empleado en la digestión del DNA genómico permitió mantener una relación de 1:2 en el número de bandas detectadas en la hibridización; de igual forma hubiera permitido encontrar secuencias insertadas seguidas o en "tamdem", en dado caso, al haberse hallado una banda en la digestión con *Hind* III y tres bandas en la digestión con *Bam* HI, se hubiera podido establecer la posibilidad de dos fragmentos del transgen en posición consecutiva. En los clones estudiados no se detectaron secuencias en "tamdem".

5.2. Evaluación de Resistencia

5.2.1. Evaluación de la infección primaria

El test de ELISA realizado en tallos y hojas superiores luego de 60 días de inoculado, mostró una OD. entre 0.156-0.253 leído a A_{405} nm tanto en los clones AT y clon1, mientras que el control para el test fue de 0.034. La prueba se repitió a los 90 días de inoculado, los valores obtenidos de O.D. fueron entre 0.290-0.350 leídos a A_{405} nm, mientras que el control negativo presentó una O.D. de 0.038. No todas las plantas

En ambas evaluaciones los valores obtenidos se consideran positivos por alcanzar tres veces la media del control negativo aunque la O.D. fueran bajas (Torrance, 1999), por lo tanto se asume que hubo transmisión del virus.

Durante el ensayo los clones AT y clon1 no mostraron síntomas de la enfermedad, que está caracterizada principalmente por clorosis y enrollamiento en hojas jóvenes; generalmente esta respuesta se origina porque la distribución de virus no es uniforme en la infección primaria (Salazar, 1995).

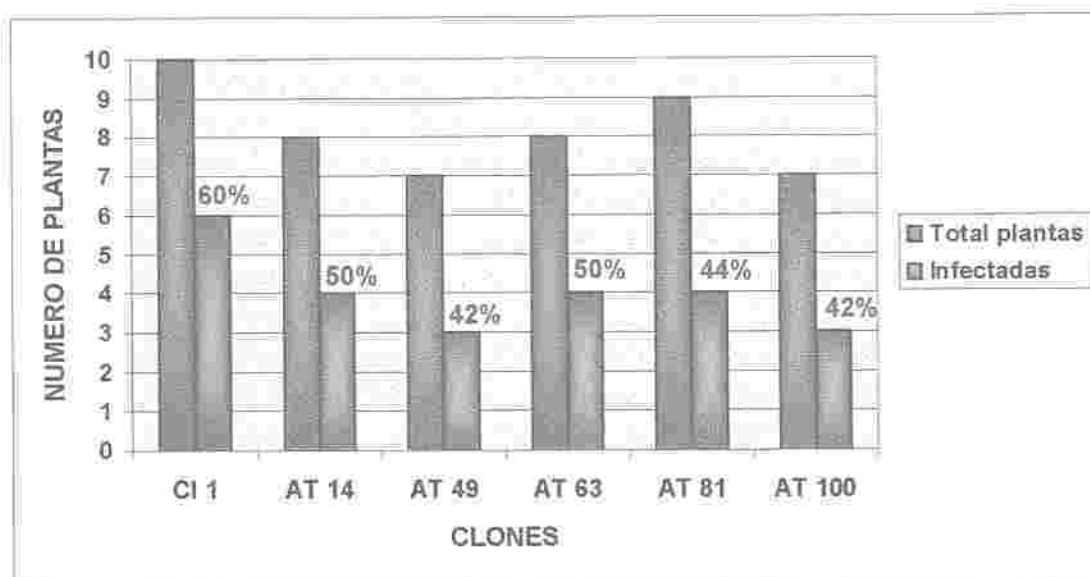


Figura 9. Porcentaje de plantas infectadas en la primera inoculación después de 90 días de haber realizado el injerto.

Por esta razón, fue necesario realizar una segunda infección con plantas obtenidas de tubérculos de las plantas que presentaron mayor título viral, tal como señala E. Mihovilovich en estudios similares realizados en el Centro Internacional de la papa (CIP) (comunicación personal 1999).

5.2.2. Infección secundaria

5.2.2.1. Determinación de título viral en tallos

La determinación del título viral con la técnica de ELISA a los 30, 60 y 90 días después de realizar la inoculación por injerto con el c.v. Maris piper, en cada una de las plantas seleccionadas, permitió evaluar que la acumulación de virus fue fluctuante en los diferentes clones, durante el ensayo. Presentando diferencias altamente significativas entre los clones transformados y no transformados y estos a su vez con el clon1 (anexos 4.1. y 4.2.). De la misma forma se presentan diferencias altamente significativas entre los muestreos realizados, señalando cambios en la acumulación de virus en el tiempo (anexo 4.3.).

Durante el desarrollo de la investigación, el incremento de virus en tallo se presentó en mayor proporción en el clon 1 y los clones AT 14 y 81, siendo el control estadísticamente superior; por el contrario, en los clones AT 49, 63 y 100 la acumulación de virus disminuye significativamente hasta en un 300% comparado con el clon1 (figura 10).

En esta fase se observaron tres grupos conformados por clon1, los clones AT 14 y 81 y los clones transformados AT49, 63 y 100. Estos presentaron diferencias estadísticamente significativas en el muestreo realizado a los 30 días de haber hecho el injerto (anexos 1.1 y 1.2), y se mantuvieron hasta el segundo test practicado a los 60 días (Anexos 2.1; 2.2.).

Al realizar la evaluación a los 90 días los tres grupos anteriores se dividen en cuatro, por la diferencia significativa que se presentó entre los clones 14 y 81 (Anexos 3.1; 3.2.).

Esto indicaría que aunque los clones AT 14 y 81 no hayan sido transformados, se pudo haber presentado alguna variación somaclonal en el momento de la regeneración *in vitro* (van der Wilk, 1997).

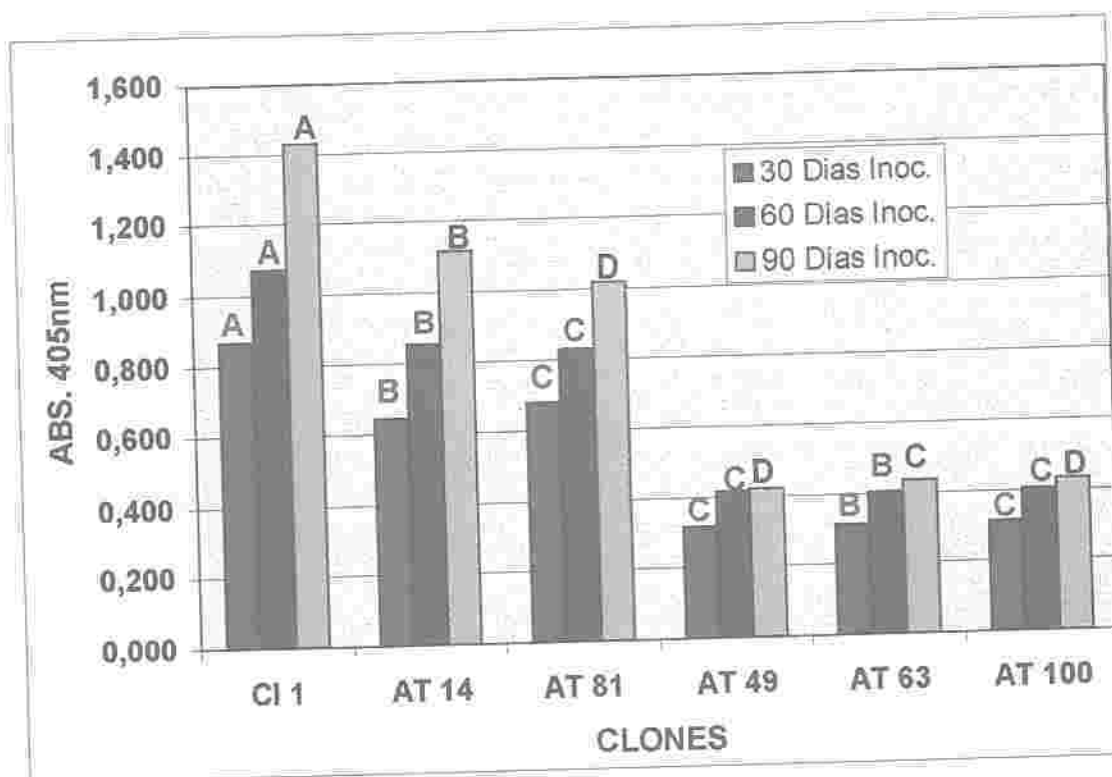
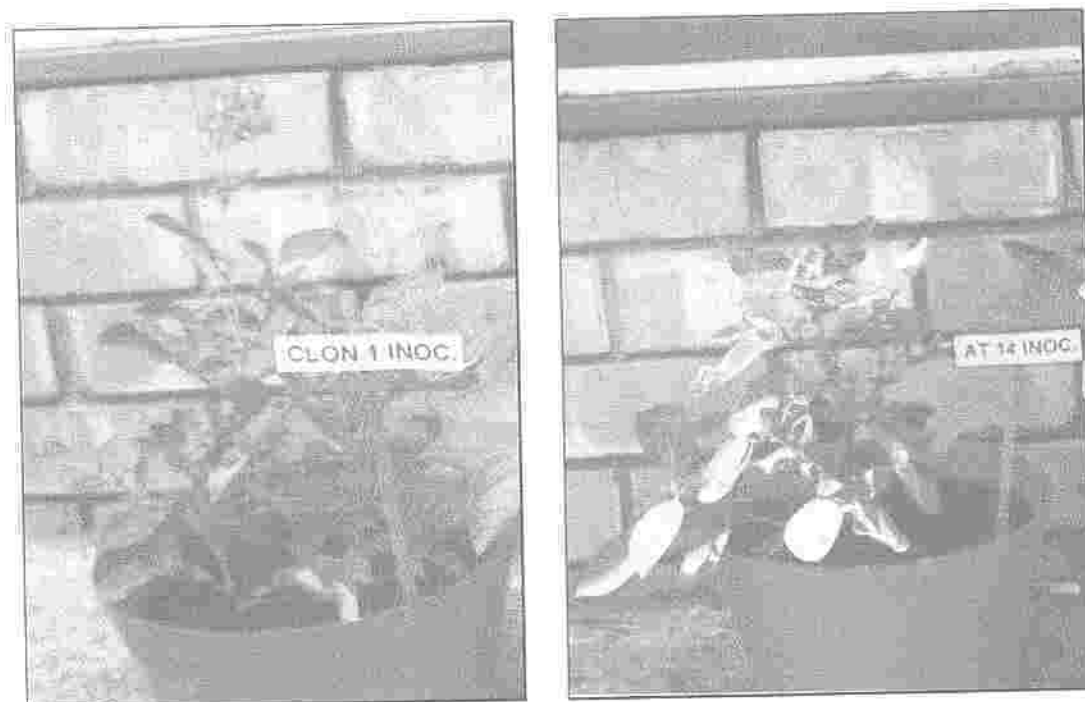


Figura 10. Título Viral Promedio en tallo de 10 plantas/clon inoculadas con PLRV. Letras diferentes significan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos.

En el desarrollo del tallo, las plantas de clon1 presentaron una reducción notable en su altura, al igual los clones AT 14 y 81 en menor proporción (figura 11), comparados con los clones AT 49, 63 y 100 (figura 12). Esto indica que la acumulación de virus en los tallos presenta una relación directa con su desarrollo.



Clon1

Clon AT14



Clon AT81

Figura 11. Desarrollo de plantas de clones no transformados, después de 90 días de inoculación con el virus del PLRV.



Clon AT49



Clon AT63



Clon AT100

Figura 12. Desarrollo de plantas de los clones transformados, después de 90 días de inoculación con el virus del PLRV

5.2.2.2. Determinación de título viral en hojas

Los resultados de las pruebas de ELISA en hojas en los diferentes clones, establecieron diferencias altamente significativas en la acumulación de virus, entre los clones no transformados y los clones transformados (anexos 4.4. y 4.5.). De igual forma se presentaron diferencias altamente significativas entre los muestreos realizados (anexo 4.6), señalando que la acumulación de virus en las hojas fue incrementando durante el desarrollo de las plantas.

Los test de ELISA desarrollados a los 30, 60 y 90 días después del injerto, evidencian que la acumulación del virus en hojas del clon1 es siempre significativamente mayor que en los clones no transformados AT 14 y 81, en contraste a lo anterior, se observa que los clones transformados AT 49, 63, 100 presentan títulos virales significativamente inferiores (figura 13).

Las pruebas de ELISA practicadas a los 30 y 60 después de realizar el injerto, determinaron tres grupos con diferencias estadísticamente significativas conformados por el testigo, los clones AT 14 y 81 y los clones transformados AT 49, 63, 100 (anexos 1.3, 1.4, 2.3 y 2.4). Al realizar la evaluación a los 90 días de infección, estos tres grupos se separaron en cinco, formados por la diferencia que se presentó entre los clones AT 14 y 81, y los clones 63 y 100. Al igual que en la evaluación de título viral de tallo es posible plantear que este resultado refuerza la hipótesis de que los clones AT 14 y 81 hubieran presentado variación somaclonal. En el caso de la diferencia presentada entre los clones AT 63 y 100, es posible señalar que se deba a la forma de expresión de los insertos presentes en cada uno de los clones.

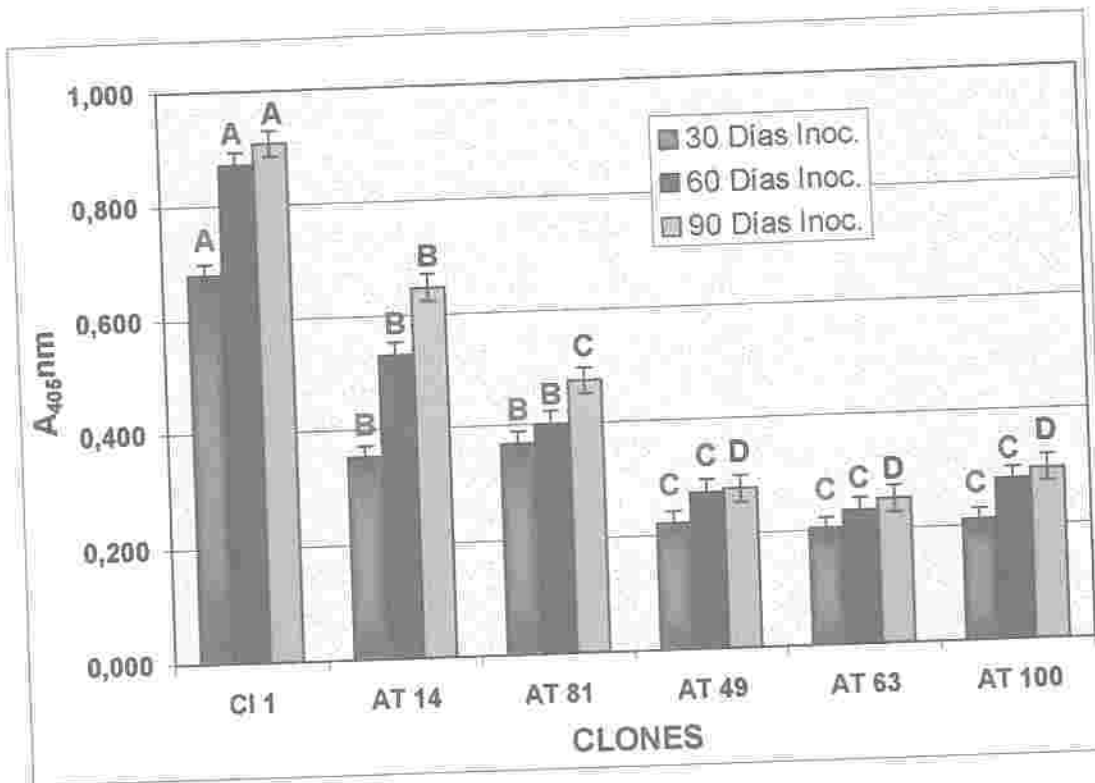


Figura 13. Título viral promedio en hoja de 10 plantas/clon inoculadas con PLRV. Letras diferentes significan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre clones.

A diferencia de lo visto en el ensayo de infección primaria, en éste se observó enrollamiento severo en hojas de las plantas del clon 1 y leve en los clones AT 14 y 81 (figura 14), siendo un síntoma característico de la enfermedad causada por el virus PLRV. Por el contrario, los clones AT 49, 63 y 100 no presentaron estos síntomas. La expresión de la enfermedad está directamente relacionada con la acumulación de virus (Salazar, 1995) como se pudo comprobar en esta investigación.



Clon1



Clon AT14



Clon AT81

Figura 14. Enrollamiento en hojas causado por acumulación del virus PLRV, en los clones no transformados, evaluados a los 90 días de inoculación.

Si bien, en todos los materiales estudiados se presentó acumulación de virus en tallos y hojas, los clones transgénicos AT49, 63 y 100 mostraron una reducción estadísticamente significativa en el título viral en todos los muestreos realizados, comparada con los clones no transformados AT14, 81 y clon1.

En relación con la acumulación de virus en tallos y hojas, el efecto del número de insertos en los clones AT63 y AT100 en comparación con AT49, no presenta diferencias estadísticamente significativas (anexos 4.1, 4.2, 4.4 y 4.5). La resistencia a la replicación de PLRV en líneas transgénicas transformadas con el gen de la cápside del PLRV está relacionada con la cantidad de RNAm del gen de la cápside y no con el número de inserciones del gen en los diferentes clones (van der Wilk, 1991; Mayo, 1993; Tacke, 1996).

Los resultados obtenidos confirman la hipótesis, que los clones transformados presentan resistencia a la acumulación de virus. Resultados similares en inducción de resistencia a PLRV en plantas transformadas con el gen de la cápside fueron encontrados por Kawchuk (1990), Barker (1993), Tacke (1996).

Existen evidencias que la expresión del gen de la cápside bajo el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (como es el caso de los clones transgénicos evaluados en el presente trabajo), provee altos niveles de expresión en las células de plantas transgénicas (Dudits, 1992), como también que tiene una alta actividad en floema incrementando la resistencia a la replicación del virus (Jefferson, 1987).

Aunque no es perfectamente claro el mecanismo de resistencia generado por la expresión del gen de la cápside viral, se cree que puede inhibir la encapsidación impidiendo la replicación del virus (Wu, 1990; Thomson, 1994). Por otro lado, al realizar pruebas de ELISA en plantas libres de virus de los clones transformados, no fue posible detectar la proteína de la cápside, aunque la sensibilidad de la prueba permite detectar concentraciones alrededor de 3.2ng virus/ g de tejido. Estos resultados son similares con observaciones hechas por otros autores, quienes al realizar el test no pudieron detectar la proteína (Kawchuk, 1990; van der Wilk, 1991; Presting, 1995; Franco, 1999). En otros trabajos realizados, se determinó que al hacer la purificación de la proteína se pudo detectar utilizando anticuerpos monoclonales (Bahner 1990).

En relación con lo anterior, se considera entonces que la habilidad de la proteína de la cápside del transgen de inhibir la acumulación y dispersión del virus en el tejido del floema, es más probablemente representado por función del RNA de la cápside que de la proteína en sí (BarKer et al, 1993).

Finalmente, estudios realizados por Barker & Derrick (1997) demostraron que el RNAm del transgen de la proteína de la cápside, inhibe la expresión del gen que codifica una proteína de 17K del virus, requerida para entrar a los plasmodesmos de las células del floema, inhibiendo de esta forma la dispersión en plantas que poseen el transgen.

5.3. Producción de tubérculo

La figura 15, muestra la producción en gramos de los tubérculos obtenidos en cada uno de los clones. El análisis de varianza (anexo 5.1.) indica que hay diferencias altamente significativas entre los clones.

Se presentaron tres grupos claramente definidos con diferencias altamente significativas (anexo 5.2.), un primer grupo comprendido por el testigo clon 1, un segundo grupo formado por los clones no transformados AT 14 y 81 y un tercer grupo por los clones transformados AT 49, 63 y 100.

Lo anterior indica que la transformación genética realizada con el gen de la cápside del PLRV, evita la disminución en la formación de tubérculos por impedir la acumulación viral.

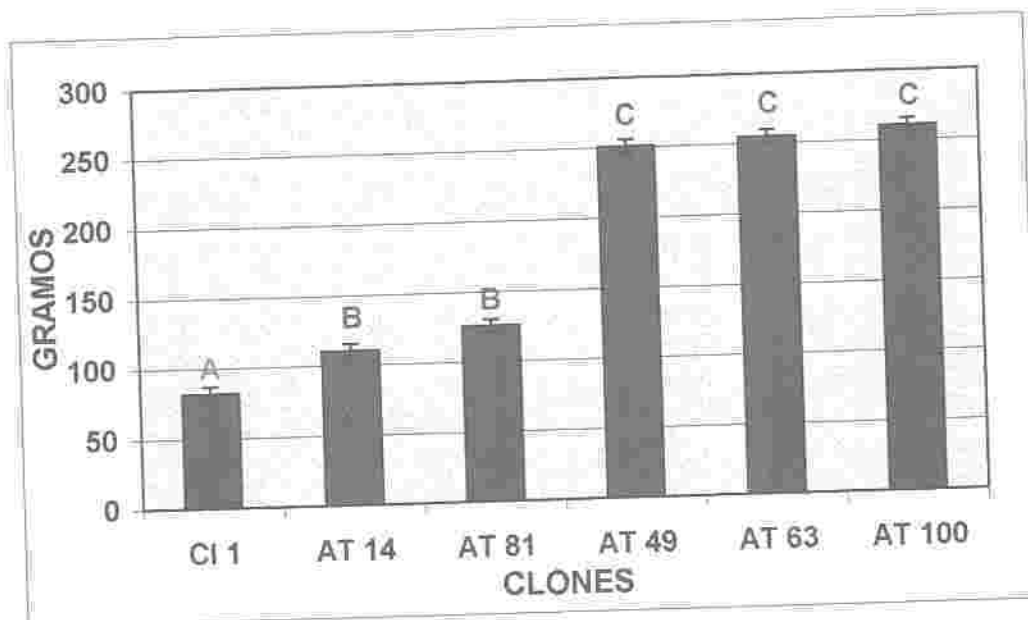


Figura 15. Producción Promedio de Tubérculos de 10 plantas/clon. Letras diferentes significan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre clones.

5.4. Relación entre título viral y producción de tubérculo

Es evidente que la producción de tubérculos se vio directamente afectada por la acumulación de virus en las plantas. En primera instancia la regresión entre producción de tubérculo respecto al título viral en tallo (figura 16), señala que existe una relación inversamente proporcional altamente significativa con un coeficiente de determinación del 92.33% (anexo 7).

De igual forma, la regresión entre producción de tubérculo respecto al título viral de las hojas, muestra una relación inversamente proporcional estadísticamente significativa (figura 17), con un coeficiente de determinación del 69.58% (anexo 8).

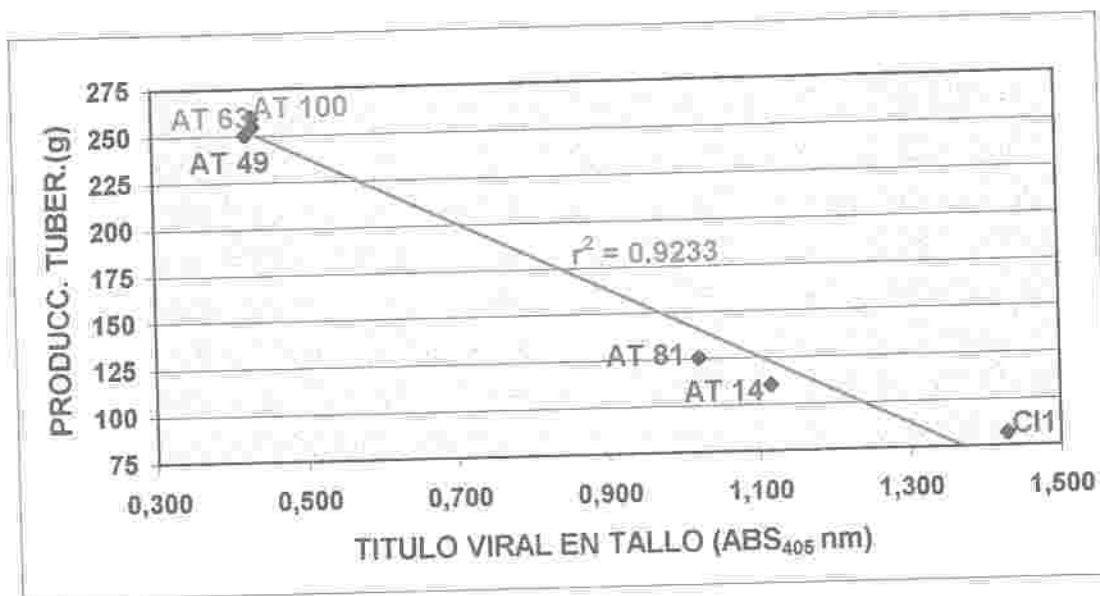


Figura 16. Regresión lineal de peso tubérculo respecto al título viral en tallos de 10 plantas evaluadas por cada clon.

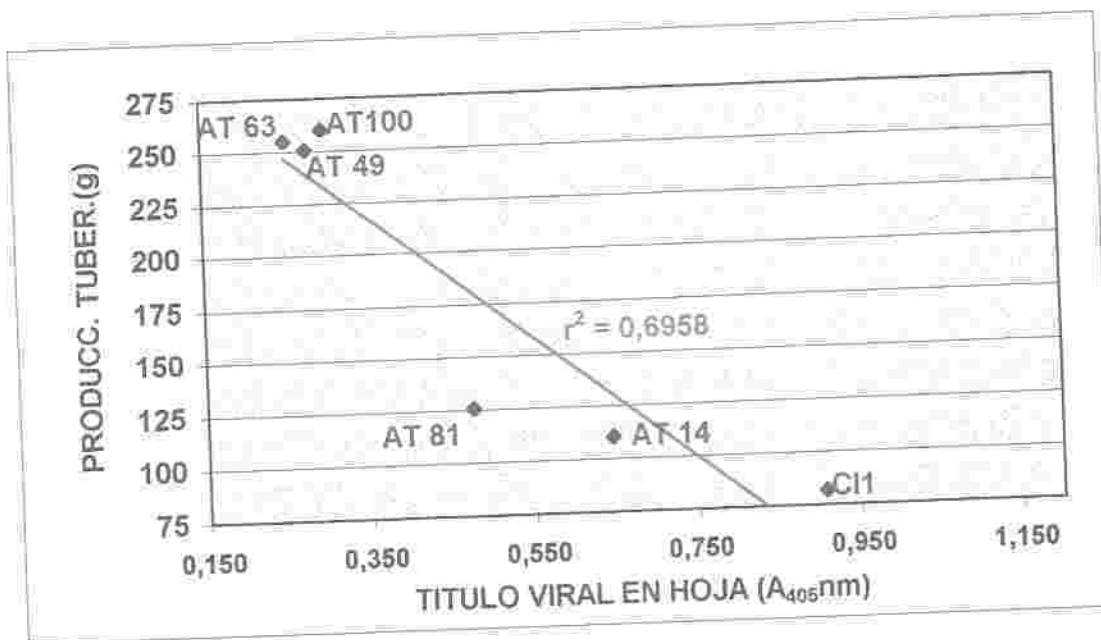


Figura 17. Regresión lineal de producción de tubérculo respecto al título viral en hojas de 10 plantas evaluadas por cada clon.

La correlación de las variables título viral en tallos y hojas con producción de tubérculo, muestra una relación inversa estadísticamente significativa (anexo 8), es decir, que la producción se ve afectada por acumulación de virus en tallo y hojas. Por el contrario, la correlación de título viral entre tallos y hojas (figura 18), presentó una relación directamente proporcional estadísticamente significativa (Anexo 8); señalando de esta forma, que el incremento de título viral en las hojas fue influenciado por el incremento del título viral en tallos; esto se explica porque el virus realiza su replicación en células del floema y se moviliza con los componentes de la savia (Barker, 1997); contrario a esto, en las plantas transformadas la reducción en el título viral, puede atribuirse a la expresión del gen de la cápside que reduce la replicación del virus (Mayo, 1993; & Watherhouse, 1997).

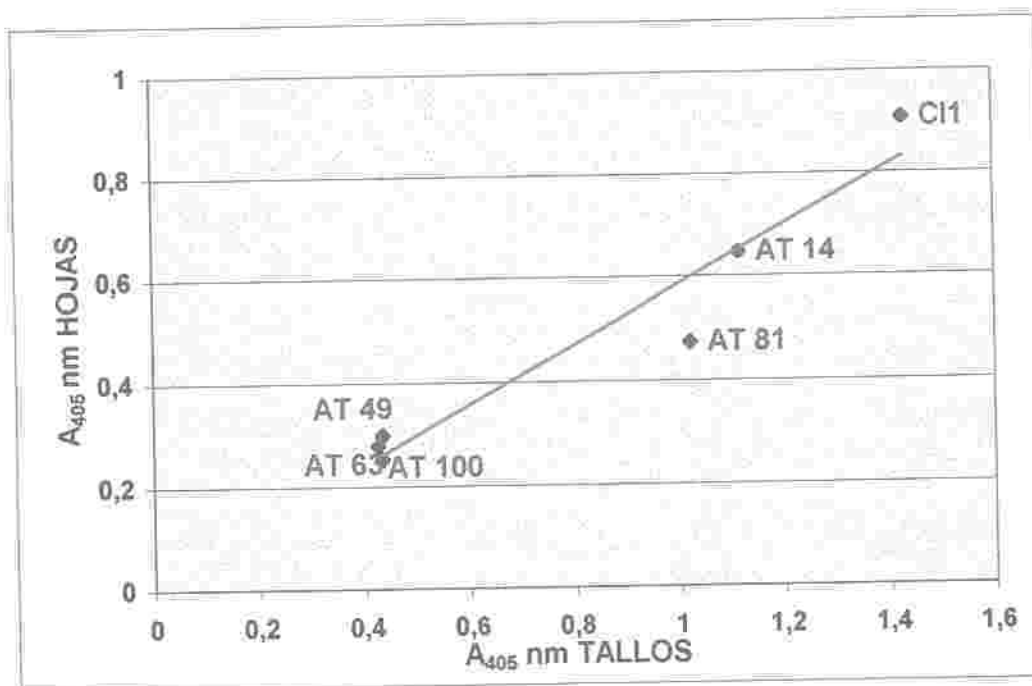


Figura 18. Relación entre acumulación viral en tallos y hojas.

En esta investigación los resultados obtenidos muestran que la resistencia a la acumulación de virus en tallo y hojas, presentan una relación inversamente proporcional con la producción de tubérculos.

Lo anterior señala la relación existente entre las hojas como órganos productores de fotoasimilados o fuente y los tubérculos como órganos de almacenamiento o demanda. La comunicación entre fuentes y demandas tiene lugar por el floema; de tal manera que es posible hablar del modelo fuente-vía-demanda propuesto por Wilson (1972, 1981) y la relación que se presentó entre el título viral y la producción de tubérculos.

El potencial de la fuente está dado por su tamaño y actividad, al igual que el potencial de la demanda. En este caso el potencial de la fuente pudo verse afectado por la

acumulación de virus en las hojas impidiendo una buena actividad fotosintética. Se ha demostrado que el marco de lectura abierta 0 (ORF0) del PLRV, genera una proteína (p28) que se cree tiene como función el reconocimiento del hospedero; además de esto, en plantas transgénicas que acumulan niveles de RNA del ORF0 del virus detectado por Northern blot, se observó la disminución de RNAm que codifica para rubisco. Una explicación alternativa a lo anterior, es que la p28 induce bloqueo del transporte a través del floema, resultando acumulación de metabolitos en las células y subsecuentemente supresión de la fotosíntesis (van der Wilk et al, 1997). Esto sugiere que la expresión de la proteína p28 interviene en la fotosíntesis inhibiendo la expresión de rubisco, por ende, genera una disminución en la actividad fotosintética de la fuente.

Además del efecto que puede generar el virus sobre la fotosíntesis, las alteraciones morfológicas como el enrollamiento observado en las hojas de los clones no transformados principalmente clon1, afectan el tamaño de la fuente reduciendo el área foliar, determinando una disminución en la producción de fotoasimilados (Salisbury; 1994; Taiz, 1998)

El potencial de la demanda que en parte está dado por su actividad metabólica, siempre y cuando la fuente le proporcione fotoasimilados, se puede ver limitado por la comunicación que genera el floema entre estos dos. Se ha observado que el virus utiliza el floema, como vía de dispersión y ruta de transporte en la planta, vía plasmodesmos (Mushegian, 1993; Lucas, 1994). En el caso de los clones no transformados que presentaron menor producción de tubérculos, la disminución se pudo ver influenciada por la acumulación de virus en el floema, que puede causar daños necróticos en la estructura de descarga asociados con la infección, además de las alteraciones morfológicas de

dicho tejido (Golinowski, 1987; Wilson, 1992; Barker, 1997), impidiendo el vertimiento de los fotoasimilados en los tubérculos.

6. CONCLUSIONES

- La detección del transgen mediante las técnicas de PRC y "Dot Blotting" confirmó la presencia física del gen de la cápside del PLRV en el genoma de los clones transformados AT 49, 63 y 100.
- Se determinó dos insertos del gen de la cápside del PLRV en el genoma de los clones AT63 y 100 y un inserto en el genoma del clon AT49 por "Southern Blotting".
- La amplificación de la región interna del gen de la cápside del PLRV por PCR determinó la estabilidad del transgen durante las tres fases de propagación clonal, en los clones transformados.
- Se determinó la resistencia a la acumulación del virus del enrollamiento de la hoja en los clones transformados AT49, 63 y 100, atribuyéndose a la expresión del transgen, mientras que los clones no transformados AT14 y 81 y clon1 presentaron una respuesta de susceptibilidad a la infección, observada por el enrollamiento en las hojas principalmente.
- No se observaron diferencias significativas entre número de inserciones del transgen presentes en los genomas de cada uno de los clones transformados, en relación con la resistencia a la acumulación viral en tallos y hojas.

- Se observó una relación directamente proporcional entre título viral de tallos y título viral de hojas e inversamente proporcional entre los títulos virales y la producción de tubérculos.
- La producción de tubérculos y el desarrollo de las plantas se vio afectado de forma directa por la acumulación del virus en tallo y hojas en los clones no transformados AT 14 y 81 y clon1, en comparación con los clones transformados AT 49, 63 y 100.

7. BIBLIOGRAFIA

- Acosta, O., Barker, H. & Mayo, M.A. 1995. Prospects for improving virus resistance of potato crops in Colombia by transgenic technology. *Fitopatología Colombiana*. 18: 66 - 77.
- Angenent, G., Van den Ouweland, J., Bol, J. 1990. Susceptibility to virus infection of transgenic tobacco plants expressing structural and nonstructural genes of tobacco rattle virus. *Virology* 175: 191-198.
- Arguello, G. 1996. Producción y utilización de Papa "Criolla" Yema de Huevo (*Solanum phureja*). *Papas colombianas*. 90-93 p.
- Artunduaga, J. R. 1989. Saneamiento de semilla de papa criolla *Solanum phureja* Juz. et Buk. Programa de tuberosas ICA, Tibaitata. ICA reporte interno. p20.
- Austin, S. & Helgeson, J.P. Transfer of resistance to potato leafroll virus from *Solanum bevidens* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion. *Plant Sci. Lett.* 39: 75-81
- Baerecke, M.L. 1958. Blattrollresistenzzüchtung. En: Kappert, H. & Rudolf, W. *Handbuch der Pflanzenzüchtung*, 2 Auf., Bd. III, 97-106, Berlin & Hamburg . Verlag P. Parey.
- Baerecke, M.L. 1961. Erfahrungen mit einjährigen kartoffelabbauversuchen unter starken Blattrollinfektions-bedingungen. *Z. Pflanzenzüchtg.* 45: 225-253.

Barker, H. 1997. Extreme resistance to potato virus V in clones of *Solanum tuberosum* that are also resistant to potato viruses Y and A: evidence for a locus conferring broad-spectrum potyvirus resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 1258-1262.

Barker, H. & Derrick, P. 1997. Short and long distance spread of potato leafroll luteovirus: effect of host genes and transgenes conferring resistance to virus accumulation in potato. *Journal of General Virology*. 78: 243-251.

Barker, H., Reavy, B., Webster, K.D. Jolly, C.A., Kumar, A. & Mayo, M.A. 1993. Relationship between transcrip production and virus resistance in transgenic tobacco expressing the potato leafroll virus coat protein gene. *Plant Cell Reports*. 13: 54-58.

Barker, H. & Harrison, B.D. 1985. Restricted multiplication of potato leafroll virus in resistant potato genotypes. *Annals of Applied Biology*. 107: 205-212.

Biofeedback. 1991. A Simple And Rapid Method for Screening Transgenic Plants Using the PCR. *BioTechniques*. 11: 428-432.

Barker, H., Reavy, B., Kumar, A., Webster, K.D. & Mayo, M.A. 1992. Restricted virus multiplication in potatoes transformed with the coat protein gene of potato leafroll luteovirus: similarities with a type of host gene-mediated resistance. *Ann. appl. Biol.* 120: 55 - 64.

- Barker, H. & Derrick, P. 1997. Short and long distance spread of potato leafroll luteovirus: effects of host genes and transgenes conferring resistance to virus accumulation in potato. *Journal of General Virology*. 78: 243-251.
- Bevan, M. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plants transformation. *Nucleic Acids Research* 12: 8711-8721.
- Bokx, J.A. 1972. The effect of breaking dormancy of potato tubers by rindite or gibberellic acid on detection of potato virus A by "A-6" tests leaves. *Potato Res.* 13: 101-113.
- Brown, C. & Jayasinghe, U. 1984. Breeding virus-resistan potato cvs for developing contries. CIP-Circular 12: 1-4.
- Buxton, J., Crawley, M.J., & Hails, R.S. 1993. Ecology of transggnic oilseed rape in natural habitats. *Nature*. 363: 620-623.
- Candalier-Harvey, P., Hull, R. 1993. Cucumber mosaic virus genome is encapsidated in alfalfa mosaic virus coat protein expressed in transgenic tobacco plants. *Transgenic Research* 2: 277-285.
- Carrasco, C.A. & Pineda, R. 1993. Papa criolla " Yema de Huevo": una multivariedad nativa. *Revista papa*. 7: 14-19.
- Carrasco, C. A. 1994. Descripción de clones de papa criolla "yema de huevo" *Solanum phureja* colectados en diferentes campos de cultivo. *Revista papa*. 10: 6-10.

- Chaparro, A. 1995. Producción de Plantas Transgénicas en Tabaco (*Nicotiana tabacum*) Resistentes al herbicida Fosfotricina, Mediante Transformación con *Agrobacterium tumefaciens*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Santafé de Bogotá, Colombia.
- Cockerham, G. 1970. Genetical studies on resistance of haploids from two *Solanum tuberosum* cultivars. *Am. Pot. J.* 49: 117-120
- Conner, A.J., & Dale, P.J. 1996. Reconsideration of pollen dispersal data from field trials of transgenic potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 92: 505-508.
- Cubillos A.G. 1988. Biotecnologías e ingeniería genética y su aplicación en papa. En: Memorias del taller sobre avances en el mejoramiento de la papa en los países del cono sur de Latinoamérica. Argentina. 223 -234.
- Chuquillanqui, C. & Jayasinghe, U. 1992. Manual de Virología. Edit. Centro Internacional de la papa. Perú.
- Davidson, T. M. 1973. Assessing resistance to leafroll in potato seedlings. *Pot. Res.* 16: 99-108.
- Del Valle, E.A. 1994. Papa amarilla Yema de huevo ó papa "criolla" Colombiana. Revista papa. FEDEPAPA. No. 10:3. Bogotá, Colombia.

Dougherty, G. W., Proebsting, M. W., Rosales, L.S., & Lindbo, J. A. 1993. Induction Of Highly Specific Antiviral State In Transgenic Plants: Implications For Regulation Of Gene Expression And Virus Resistance. *Plant Cell* 5, 1749-1759.

Dudits, D., Zakharyev V. M., Shulga, O.A., Preiszner, J., Balazs, E., Skryabin, K. G., & Feher A. 1992. Expression Of PVX Coat Protein Gene Under The Control Of Extensin-Gene Promoter Confers Virus Resistance On Transgenic Potato Plants. *Plant Cell Reports* 11: 48-52.

Doyle & Doyle. 1990. Isolation of DNA from small amounts of plant tissues. *BRL Focus* 12: 13-15.

Sánchez, C. 1996. La Semilla como Clave del Manejo de Enfermedades Sistémicas en Papa. *Papas colombianas*. 174-181 p.

Estrada, N. 2000. Enfermedades causadas por virus. En: *La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa*. CID. Bolivia.

Franco L.; & Peñaranda V. J. 1995. Obtención de Plantas Transgénicas de *Solanum Phureja* var. Yema de Huevo (Papa Criolla) Transformadas con el gen de la Proteína de la Capside del Virus del Enrollamiento de la Hoja de Papa (PLRV). Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá, D.C.

Franco, L. 1998. Transformation of Solanaceous Species with Coat Protein Gene and Full-length cDNA of Potato Leafroll Virus.. University of Dundee.

Franco, L., & Barker, H. 1999. Characterisation of resistance to potato leafroll virus accumulation in *Solanum phureja*. Euphytica. 108 (2): 137-144.

Gibson, R.W., Dawson, G.W., Rice, A.D. & Stribley, M.F. 1984. The effect of aphid alarm pheromone derivatives and related compounds on non-and semipersistent plant virus transmission by *Myzus persicae*. Ann. Appl. Biol. 104: 203-209.

Graham M. W., Craig S. AGasser, C.S. & Fraley R.T. 1989. Genetically engineering of plants or crop improvement. Science 244: 1293 -1298.

Ghislain, M. Trognitz, B. Herrera, C., Hurtado, A. & Porta, L. 1996. DNA markers for introgression of Late Blight resistance in potato. En: Providing better access to CIP research. Reporte 1995-1996.

Glick, B.R., & Pasternak, J.J. 1994. Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA. AMS Press.

Gollinowski, W., Tomenius, K. & Oxelfelt, P. 1987. Ultrastructural studies on potato phloem cells infected with potato leafroll virus-comparison of two potato varieties. Acta Agriculturae Scandinavica. 37: 3-19.

Hamann, W. & Möller, K. 1979. Stand der Resistenz züchtung gegen Kartoffelviren. Arch. Züchtungsforsch. 9: 73-78.

Hamilton, R.I. 1980. Defences triggered by previous invaders-viruses. En: Plant Disease, An Advanced Treatise, Ed. J.G. Horsfall, E.R. Cowling. Academic, New York. Vol 5 pp 279-303.

Harrison, B.D., Mayo M.A., Baulcombe, D.C. 1987. Virus Resistance in Transgenic Plants that Express Cucumber Mosaic Virus Satellite RNA. Nature 328: 799-802

Hawkes, J. G. 1988. The evolution of cultivated potatoes and their tuber-bearing wild relatives. Kulturpflanze. 36: 189-298.

Hawkes, J. G. 1990. The potato: evolution, diversity and genetic resources. Belhaven Press, London. p 1-10.

Hawkes, J.G. 1947. Some observations on South American potatoes. Ann. Appl. Biol. 34: 622-631.

Hememway, C. , Fang, R-X. , Kaniewski, W. , Chua, N-H., Tumer, N. 1988. Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. EMBO journal 7(5): 1273-1280.

Huttinga, H., Van der Wilk, F., & Huisman, M.J. 1991. Expresión of the potato leafroll luteovirus coat protein gene in transgenic potato plants inhibits viral infection. *Plant Molecular Biology*. 17: 431-439.

Jefferson, R. A.; Kavanagh, T. A. & Bevan M. W. 1987. GUS fusions: b-glucoronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.

Jones, M., & Lindsey, K. 1997. Biotecnología en Plantas. En: *Biología Molecular y Biotecnología*. Cap.7. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza, España.

Jones, R.A. 1979. Resistance to potato leafroll virus in *Solanum brevidens*. *Pot. Res.* 22: 149-152.

Kawchuk, L., Martin, R. & McPherson, J. 1990. Resistance in transgenic potato expressing the potato leafroll virus coat protein gene. *Mol Plant Microbe Interact.* 3: 301-307.

Kawchuk, L., Martin, R. & McPherson, J. 1991. Sense and antisense RNA-Mediated Resistance to Potato Leafroll Virus in Russet Burbank Potato Plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4: 247-253.

Kawchuk, L., Martin, R., Lynch, D., Kozub, G. & Farries, J. 1997. Field resistance to the potato leafroll luteovirus in transgenic and somaclone potato plants reduces tuber disease symptoms. *Canadian Journal of Plant Pathology.* 19: 260-266.

Kostiw, M. 1981. Blattläuse als Vektoren für Kartoffelviren. Kartoffelbau. 32: 161-162.

Ling, K., Namba, S., Gonsalves, C., Slighton, J., Gonsalves, D., 1991. Protection against detrimental effects of potyvirus infection in transgenic tobacco plants expressing the papaya ringspot virus coat protein gene. Bio/technology 9: 752-758.

Linn, F., Heidmann, I., Saedler, H., & Meyer, P. 1990. Epigenetic changes in the expression of maize A1 gene in *Petunia hybrida*: Role of numbers of integrate gene copies and state of methylation. Mol. Gen. Genet. 222: 239-336.

Liu, C. & Deuches, D.S. 1993. Production of haploids of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) and their identification with electrophoretic analysis. Euphytica 70, 113-126.

Lucas, W.J. & Gilbertson, R.L. 1994. Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissue. Annual Review of Phytopathology. 32: 387-411

Mariño S. H. & Mesa, J. Influencia de épocas y distancias de siembra de la arveja en el rendimiento del arreglo de papa criolla (*Solanum phureja*) y arveja (*Pisum sativum*). Tesis Universidad Nacional. Agronomía. 1982.

Mayo, M. A., Kumar, A., Jolly, C. A., Webster, K. D., Reabvy, B., & Barker, H. 1993. Relationship between transcript production and virus resistance in transgenic tobacco expressing the potato leafroll virus coat protein gene. Plant Cell Reports 13: 54-58.

Mayo, M.A., Robinson, J.D., Jolly, C.A. & Hyman, L. 1989. Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus RNA. *Journal of General Virology*, 70: 1037-1051.

Mehlenbacher, R. & Plaisted, R. 1984. En: *La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa*. Edit. CIP:2000.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2000. *Anuario estadístico*.

Mills, W.R. 1965. Inheritance of immunity to potato virus X. *Am. Pot. J.* 42: 294-295.

Moreira, A. & Jones, C. 1980. Properties of a resistance-bearing strain of potato virus X. *Ann. Appl. Biol.* 95: 93-103.

Mushegian, A. R. & Koonin, E.V. 1993. Cell to cell movement of plant viruses: insights from amino acid sequence comparisons of movement proteins and from analysis with cellular transport systems. *Archives of Virology*. 133: 239-257.

Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Nejidat, A., Beachy, R. 1990. Transgenic tobacco plants expressing a coat protein gene of tobacomosaic virus are resistant to some other tobamoviruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 3(4): 247-251.

Pang, S.Z., Slightom, J., & Gonsalves, D. 1993. Different Mechanisms Protect Transgenic Tobacco Against Tomato Spotted Wilt and Impatiens Necrotic Spottedviruses. *Bio/Technology*. 11, 8 :819-828

Pineda, R. 1996. Perspectivas para el desarrollo agroindustrial del cultivo de la papa en Colombia. *Revista Papas Colombianas*. 70-77p.

Powell-Abel, P., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N. & Rogers, S.G. 1986. Delay of disease development in transgenic plant that express the tobacco mosaic virus coat protein. *Science* 232, 738-743.

Presting, G., Smith, O. & Brow, C. 1995. Resistance to potato leafroll virus in potato plants transformed with the coat protein gene or with vector control constructs. *Phytopathology*. 85: 436-441.

Rhodes Botany Factfiles. 1998. # 5 The source-sink connection. <http://botany.ru.ac.za/Factfile/source-1.htm>, 7pp.

Rhodes Botany Factfiles. 1998. # 7 Cell-cell communication in plants. <http://botany.ru.ac.za/Factfile/celltran.htm>, 9pp.

Roca, W., Calderon, A. & Jaynes, J. 1993. Ingeniería Genética y Cultivo de Tejidos. En: *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Cap.33 Editado por Roca, W.M y Mroginsky, L.A. Edit. CIAT. Cali, Colombia.

- Rodríguez, A. 1996. Consideraciones al Manejo de Plagas y Enfermedades de la Papa en Colombia. *Papas Colombianas*. 122-126 p.
- Ross, H. 1986. Potato breeding-problems and perspective. En: *Fortschritteder Pflanzenzüchtung*. 13: 1-132. Berlin-Hamburg. Verlag Paul Parey.
- Ross, H. 1983. Major and minor genes in breeding virus-resistant varieties. *Proc. Int. Congr. Research for the Potato in Year 200*. Int. Pot. Center, Lima-Perú 165-166p.
- Ross, H. 1978. Methods for Breeding virus resistant potatoes. *Rep. Plann. Conf. Control Potato Virus Diseases*. International Potato Center, Lima-Perú 93-114p.
- Rezain, M., Skene, K., & Ellis, J. 1988. Anti-Sense RNAs Of Cucumber Mosaic Virus In Transgenic Plants Assessed For Control Of The Virus. *Plant Molecular Biology* 11 : 463-471.
- Rubino, L., Lupo, R. & Russo, M. 1993. Resistance To Cymbidium ringspot Tombusvirus Infection In Transgenic *Nicotiana benthamiana* Plants Expressing A Full-Length Viral replicase Gene. *Molecular Plant Microbe Interactions* 6 (6) : 729-734
- Salazar, L. F., Jayasinghe, U., & Chuquillanqui, C. 1989. Modified Expression Of Virus Resistance In Potato In Mixed Virus Infections. *American Potato Journal*. 66: 137-144
- Salazar, L. F. 1995. *Los Virus de la Papa y su Control*. Cap.1 Editado por Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú.

Salazar, L. F. 1993. Manual de Técnicas en Virología de Plantas . Cap.3.2.3 Editado por Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Scheid, M., Paszkowski, J. & Potrykus, I. 1991. Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Gen. Genet. 228: 104-112.

Stitt, M. & Sonnewald, U. 1995. Regulation of metabolism in transgenic plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 46: 341-368

Steel, R. & Torrie, J. 1996. Bioestadística: principios y procedimientos. McGraw-Hill.

Tacke, E., Salamini, F. & Rohde, W. 1996. Genetic engineering of potato for broad-spectrum protection against virus infection. Nature Biotechnology. 14: 1597-1601

Thomas, P., Kaniewski, W. & Lawson, E. 1997. Reduced field spread of potato leafroll virus in potatoes transformed with the potato leafroll virus coat protein gene. Plant disease. 81: 1447-1453.

Thomson, J.A., Rybicki, E. & Hackland, A.F. 1994. Coat protein-mediated resistance in transgenic plants. Archives of Virology. 139: 1-22.

Tremaine, J. H.; Mackenzie, D. J. 1990. Transgenic *Nicotiana Debneyii* Expressing Viral Coat Protein are Resistant to Potato Virus S Infection. *Journal Of General Virology* 71: 2167-2170.

Torrance, L., Mayo, M.A., Harper, K., & Coth, R. (1999). Fusion Proteins of Single-Chain Variable Fragments Derived from Phage Display Libraries are Effective Reagents for Routine Diagnosis of Potato Leafroll Virus Infection in Potato. *Virology*, 89: 11, 1015-1020.

van Belaje. 1993 Strategies of phloem loading. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 44: 253-281.

van den Elzen, P., Huisman, H., Willink, P.P-L., Jongedik, E., & Hoekema, A. 1989. Engineering Virus Resistance In Agricultural Crops. *Plant Molecular Biology* 13 :337-346.

van Dun, C. Overduin, B. Van Vloten-Doting, L., Bol, J. 1988. Transgenic tobacco expressing tobacco streak virus or mutated alfalfa mosaic virus coat protein does not cross-protect against alfalfa mosaic virus infection. *Virology* 164: 383-389.

van Dun, C., Bol, J. 1988. Transgenic tobacco plants accumulating tobacco rattle virus coat protein resist infection with tobacco rattle virus and pea early browning virus. *Virology* 167:649-652.

van der Wilk, F., Huttinga, H. Houterman, P., Molthoff, J., Hans, F., & Van den Heule, J. 1997. Expression of Potato Leafroll Virus ORFO Induces Viral-Disease-like Symptoms in Transgenic Potato Plants. *American Phytopathological Society*. 10: 153-159.

van der Wilk, F., Willking, D.P., Huisman, M.J., Huttinga, H., & Goldbach, R. 1991. Expression of the potato leafroll luteovirus coat protein gene in transgenic potato plants inhibits viral infection. *Plant Mol. Biol.* 17: 431-439.

Von Werrstein, D. 1989. Perspectives For The Genetic Engineering Of Plants For Agriculture, Horticulture And Industry. *Plant Mol. Biol.* 13: 313 - 317.

Waterhouse, P; Craig, S. & Graham, M. 1997. Expression patterns of vascular-specific promoters RolC and Sh in transgenic potatoes and their use in engineering PLRV-resistant plants. *Plant Molecular Biology.* 33: 729-735.

Webster, K. D., & Barker, H. 1994. *Molecular Biological Techniques. (A handbook of methods used in virology department)* Scottish Crop Research Institute,

Weidemann, H.L. & Casper, R. 1982 Immunhistologische Untersuchung über das Vorkommen von Kartoffelblattrollviro in Knolle und Spross der Kartoffelpflanze. *Pot. Res.* 25: 99-106.

Wiersema, H. T. 1961. Methods and means used in breeding potatoes with extreme resistance to virus X and Y. *Proc. 4th Conf. Pot. Vir. Dis., Braunschweig, 1960.* 30-36p.

Wilson, W. 1972. Control of crop process. En: *Crop processes in controlled environments.* Ed. AR Rees et al. Academic press, New York, pp 7-30.

Wilson, W. 1981. Analysis of growth, photosynthesis and light interception for single plants and stands. *Annals of Botany*, 48: 507-512.

Wu, X., Beachy, R., Wilson, T. & Shaw. 1990. Inhibition of uncoating of tobacco mosaic virus particles in protoplasts from transgenic plants that express the viral coat protein gene. *Virology*, 179: 893-895.

ANEXOS

ANEXO 1. VARIABLE: TITULO VIRAL A₄₀₅ TALLOS Y HOJAS A LOS 30 DIAS DE INOCULACION

1.1. ANALISIS DE VARIANZA PARA TITULO VIRAL DE TALLOS

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR>F
Clon	5	2.88646248	0.57729250	259.45**	0.0001
Error	54	0.12015170	0.00222503		
Total	59	3.00661418			

R-Square	C. V.	Root MSE	AbsT Mean
0.960038	9.022904	0.047170	0.522783

1.2 PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY PARA TITULO VIRAL DE TALLOS

GRUPOS DE TUKEY	MEDIA	N	CLON
A	0.86900	10	Clon 1
B	0.67830	10	AT 81
B	0.64480	10	AT 14
C	0.31840	10	AT49
C	0.31320	10	AT 100
C	0.31300	10	AT 63

1.3. ANALISIS DE VARIANZA PARA TITULO VIRAL DE HOJAS

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR>F
Clon	5	1.64191615	0.32838323	348.56**	0.0001
Error	54	0.05087350	0.00094210		
Total	59	1.69278965			

R-Square	C.V.	Root MSE	Absh Mean
0.969947	9.044844	0.030694	0.339350

1.4. PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY PARA TITULO VIRAL DE HOJAS

GRUPOS DE TUKEY	MEDIA	N	CLON
A	0.67730	10	Clon 1
B	0.36960	10	AT 81
B	0.35340	10	AT 14
C	0.22150	10	AT49
C	0.21080	10	AT 100
C	0.20350	10	AT 63

ANEXO 2. VARIABLE: TITULO VIRAL A₄₀₅ TALLOS Y HOJAS A LOS 60 DIAS DE INOCULACION

2.1. ANALISIS DE VARIANZA PARA TITULO VIRAL DE TALLOS

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR>F
Clon	5	4.29977053	0.85995411	390.41**	<0.0001
Error	54	0.11894640	0.00220271		
Total	59	4.41871693			

R-Square	C. V.	Root MSE	AbsT Mean
0.973081	7.066811	0.046933	0.664133

2.2. PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY PARA TITULO VIRAL DE TALLOS

GRUPOS DE TUKEY	MEDIA	N	CLON
A	1.07890	10	Clon 1
B	0.85210	10	AT 14
B	0.82770	10	AT 81
C	0.41770	10	AT 49
C	0.40440	10	AT 100
C	0.40400	10	AT 63

2.3. ANALISIS DE VARIANZA PARA TITULO VIRAL DE HOJAS

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR>F
Clon	5	2.90535215	0.58107043	494.06**	<0.0001
Error	54	0.06350950	0.00117610		
Total	59	2.96886165			

R-Square	C.V.	Root MSE	AbsH Mean
0.978608	7.941262	0.034294	0.431850

2.3. PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY PARA TITULO VIRAL DE HOJAS

GRUPOS DE TUKEY	MEDIA	N	CLON
A	0.87090	10	Clon 1
B	0.53070	10	AT 14
B	0.40160	10	AT 81
C	0.28020	10	AT 100
C	0.27280	10	AT 49
C	0.23490	10	AT 63

ANEXO 3. VARIABLE: TITULO VIRAL A₄₀₅ TALLOS Y HOJAS A LOS 90 DIAS DE INOCULACION

3.1. ANALISIS DE VARIANZA PARA TITULO VIRAL DE TALLOS

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR>F
Clon	5	9.53094268	1.90618854	845.78	<0.0001
Error	54	0.15939550	0.00295177		
Total	59	9.69033818			

R-Square	C.V.	Root MSE	AbsT Mean
0.983551	6.708396	0.054330	0.809883

3.2. PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY PARA TITULO VIRAL DE TALLO

GRUPOS DE TUKEY	MEDIA	N	CLON
A	1.42900	10	Clon 1
B	1.11640	10	AT 14
C	1.02140	10	AT 81
D	0.43430	10	AT 63
D	0.43370	10	AT 100
D	0.42450	10	AT 49

3.3. ANALISIS DE VARIANZA PARA TITULO VIRAL DE HOJAS

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR>F
Clon	5	3.36247395	0.67249479	836.67**	<0.0001
Error	54	0.04340370	0.00080377		
Total	59	3.40587765			

R-Square	C.V.	Root MSE	Absh Mean
0.987256	5.951690	0.028351	0.476350

3.4. PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY PARA TITULO VIRAL DE HOJA

GRUPOS DE TUKEY	MEDIA	N	CLON
A	0.90770	10	Clon 1
B	0.64650	10	AT 14
C	0.47520	10	AT 81
D	0.29850	10	AT 100
E D	0.27830	10	AT 49
E	0.25190	10	AT 63

ANEXO 4. VARIABLE: TITULO VIRAL A_{405} EN EL TIEMPO "TALLOS Y HOJAS"

4.1. ANALISIS DE VARIANZA PARA TITULO VIRAL DE TALLOS EN EL TIEMPO (TEST)

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR>F
Clon	5	15.65085187	3.13017037	750.86**	<0.0001
Planta(Clon)	54	0.22511467	0.00416879	2.56**	<0.0001
Test	2	2.47298590	1.23649295	758.33**	<0.0001
Planta*Test	18	0.02663054	0.00147947	0.91 ^{ns}	
Clon*Test	10	1.06632383	0.10663238	65.40**	<0.0001
Error	90	0.14674839	0.00163054		
Total	179	19.58865520			

R-Square	C. V.	Root MSE	AbsT Mean
0.992509	6.066694	0.040380	0.665600

4.2. PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY PARA TITULO VIRAL DE TALLOS EN EL TIEMPO

GRUPOS DE TUKEY	MEDIA	N	CLON
A	1.12563	30	Clon 1
B	0.87110	30	AT 14
B	0.84247	30	AT 81
C	0.38687	30	AT 49
C	0.38377	30	AT 63
C	0.38377	30	AT 100

4.3. PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY PARA TEST DE TITULO VIRAL DE TALLO

GRUPOS DE TUKEY	MEDIA	N	TEST
A	0.809883	60	3
B	0.664133	60	2
C	0.522783	60	1

4.4. ANALISIS DE VARIANZA PARA TITULO VIRAL DE HOJAS EN EL TIEMPO (TEST)

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR>F
Clon	5	7.62047738	1.52409546	859.22**	<0.0001
Planta(Clón)	54	0.09578557	0.00177381	3.17**	<.0001
Test	2	0.58611000	0.29305500	523.78**	<0.0001
Planta*Test	18	0.01164644	0.00064702	1.16	
Clon*Test	10	0.28926487	0.02892649	51.70**	<0.0001
Error	90	0.05035469	0.00055950		
Total	179	8.65363895			

R-Square	C. V.	Root MSE	AbsT Mean
0.994181	5.688032	0.023654	0.415850

4.5. PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY PARA TITULO VIRAL DE HOJAS EN EL TIEMPO

GRUPOS DE TUKEY	MEDIA	N	CLON
A	0.81863	30	Clon 1
B	0.51020	30	AT 14
C	0.41547	30	AT 81
D	0.26317	30	AT 100
E D	0.25753	30	AT 49
E	0.23010	30	AT 63

4.6. PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY PARA TEST DE HOJA

GRUPOS DE TUKEY	MEDIA	N	TEST
A	0.476350	60	3
B	0.431850	60	2
C	0.339350	60	1

ANEXO 5. VARIABLE: PESO DE TUBERCULOS

5.1. ANALISIS DE VARIANZA DE PESO DE TUBERCULOS

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR>F
Clon	5	344430.3335	68886.0667	302.16**	< 0.0001
Error	54	12310.9430	227.9804		
Total	59	356741.2765			

R-Square	C.V.	Root MSE	Peso T Mean
0.965491	8.366731	15.09902	180.4650

5.2. PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY PARA PESO DE TUBERCULO

GRUPOS DE TUKEY	MEDIA	N	CLON
A	260.060	10	AT 100
A	254.720	10	AT 63
A	250.510	10	AT 49
B	125.430	10	AT 81
B	110.210	10	AT 14
C	81.860	10	Clon 1

ANEXO 6. PRUEBA DE CORRELACION ENTRE TITULO VIRAL DE TALLO, HOJA Y PRODUCCION DE TUBERCULO

Variable	N	Mean	Sum	Std Dev	Minimum	Maximum
Abs Tallo	180	0.66560	0.33081	119.80800	0.26500	1.54600
Abs Hoja	180	0.41585	0.21987	74.85300	0.16500	0.93800
Peso Tubérculo.	60	180.46500	77.75900	10828	60.20000	280.40000

Pearson Correlation Coefficients

Prob > |r| under H0: Rho=0

Number of Observations

	Abs. Tallo	Abs. Hoja	Peso Tubérculo
Abs. Tallo	1.00000	0.91769	-0.96087
		<0.0001	<0.0001
	n:180	n:180	n:60
Abs. Hoja	0.91769	1.00000	-0.83414
	<0.0001		<0.0001
	n:180	n:180	n:180
Peso Tubérculo	-0.96087	-0.83414	1.00000
	<0.0001	<0.0001	
	n:60	n:60	n:60

ANEXO 7. ANALISIS DE VARIANZA DE REGRESION LINEAL ENTRE PESO TUBERCULO Y TITULO VIRAL EN TALLO

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR>F
Modelo	1	329368.30864	329368.30864	697.892**	0.0001
Error	58	27372.96786	471.94772		
Total	59	356741.27650			

R-square	C.V.	Root MSE	Deep Mean
0.9233	12.03799	21.72436	180.46500

ANEXO 8. ANALISIS DE VARIANZA DE REGRESION LINEAL ENTRE PESO TUBERCULO Y TITULO VIRAL EN HOJA

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR>F
Modelo	1	248217.13660	248217.13660	132.658**	0.0001
Error	58	108524.13990	1871.10586		
Total	59	356741.27650			

R-square	C.V.	Root MSE	Dep Mean
0.6958	23.96935	43.25628	180.46500