

Resistencia de la yuca (*manihot esculenta crantz*) a la mosca blanca (*aleurotrachelus socialis*), mediante la tecnología del ADN recombinante*

Resistance of the Yuca (Manihot Esculenta Crantz) to the White Fly (Aleurotrachelus Socialis) by Means of the Technology of the ADN

Raúl A. Cuervo
Jorge A. Durán

Resumen

El genotipo susceptible de yuca denominado MCOL 2246 fue sometido al proceso de transgénesis mediante la infección con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, adquirida a la American Type Culture Collection (ATCC). La cepa bacteriana se transformó utilizando el protocolo de cloruro de calcio de Mandel and Higa (1970), y se le insertó un plásmido recombinante Ti que

poseía dos secuencias de resistencia a antibióticos como marcadores, un origen de replicación y el gen cry1Ab, responsable de conferir resistencia a la yuca.

Las bacterias recombinantes fueron puestas en contacto con heridas infligidas al tejido meristemático de las plantas de yuca, las cuales expresaban el gen de interés (cry 1Ab), con lo que se lograron índices de resistencia a la mosca en las plantas de yuca transformadas.

• Fecha de recepción del artículo: 01-08-2010 • Fecha de aceptación: 10-10-2010.

RAÚL A. CUERVO. Biólogo-Genético de la Universidad del Valle. Magister en Ciencias Biológicas y Doctorando en Ciencias Biológicas de la misma Universidad. Profesorado asociado de la Universidad de San Buenaventura, Cali y miembro del Grupo Biotecnología. E-mail: racuervo@usbcali.edu.co. **JORGE A. DURÁN.** Químico de la Universidad de Antioquia y Magister en Educación de la Universidad de San Buenaventura, seccional Cali y miembro del Grupo Biotecnología. E-mail: jaduran@usbcali.edu.co.

* Este artículo hace parte de la investigación *Obtención de plantas transgénicas de yuca resistentes a la mosca blanca*, elaborada con el apoyo financiero de la Universidad de San Buenaventura, seccional Cali, 2007-2010. Una investigación en la cual participaron los estudiantes: Juan A. Payan y Julia Salazar, ingenieros agroindustriales, Universidad de San Buenaventura, seccional Cali y miembros del grupo biotecnología de la misma universidad.

El diseño estadístico empleado se basó en una ANOVA con un estadístico de Fischer, que incluye 3 tratamientos (T1: control yuca susceptible MCOL 2246; T2: yuca transgénica; T3: yuca tolerante a la mosca blanca MECU-72). El tratamiento 3 (T3) procedía del Centro Internacional de Agricultura Tropical, donde se contaba con este material proveniente de cruces entre cultivares resistentes. Se utilizó la postanova de Tukey para la determinación de los tratamientos con diferencias significativas.

Palabras clave: transformación genética, organismos genéticamente modificados, plantas transgénicas.

Abstract

The genotype capable of yucca named MCOL 2246 was submitted to the process of transgenesis by means of the infection by the bacterium Agrobacterium tumefaciens, acquired to the American Type Culture Collection (ATCC). The bacterial strain transformed using the protocol of Chloride of Calcium of Mandel and Fig (1970), to which a "plásmido recombinante" was inserted You who was possessing two sequences of resistance to antibiotics as scoreboards, an origin of replication and the gene cry1Ab, responsibly of awarding resistance to the yuca.

The bacteria recombinantes were put in touch with wounds realized to the fabric meristemático of the plants of yucca, which were expressing the gene of interest (cry 1Ab) achieving indexes of resistance to the fly in the plants of yucca transformed.

The statistical design employee based on an ANOVA with a statistician of Fischer, where they find 3 treatments (T1: Control capable Yucca MCOL 2246, T2: Yucca Transgénica, T3: tolerant Yucca to the white fly MECU-72). The treatment 3 (T3) was coming from the International Center of Tropical Agriculture where one was possessing this material from crossings you will cultivate resistant. Tukey's postanova was in use for the determination of the treatments with significant differences.

Keywords: genetic transformation, genetic modified organism, transgenic plants.

Introducción

La yuca (*Manihot esculenta Crantz*) se cultiva en más de noventa países y les permite subsistir a más de quinientos millones de personas en el mundo en desarrollo. Esta raíz rústica no sólo es un alimento básico para muchas familias agrícolas de escasos recursos, sino también materia prima para elaborar concentrados comerciales para animales, fibra para los fabricantes de papel y de textiles y almidón para la industria de alimentos y la farmacéutica. La producción mundial de yuca se sitúa alrededor de 260 millones de toneladas por año. El 50% de las hectáreas dedicadas al cultivo de la yuca se encuentran en África, un 30% en Asia y el 20% restante en América Latina (www.ciat.cgiar.org)

Existe una gran variedad de artrópodos, plagas que atacan el cultivo de yuca en América. Entre las plagas mayores, es decir, las que han coevolucionado con el cultivo y que causan pérdidas en su rendimiento, están los ácaros, las moscas blancas, los trips, el gusano cachón, el piojo harinoso, las chinches de encaje, la chinche subterránea o de la viruela de la yuca y los barrenadores del tallo. Otras plagas, como las escamas, el saltahoja, la chisa blanca, el gusano trozador, la hormiga cortadora de hojas, la mosca de la fruta, la mosca del cogollo y los comejenes pueden ocasionar daños esporádicos o localizados al cultivo y se consideran plagas menores o generalistas que atacan el cultivo en forma oportunista, especialmente en períodos de sequía (Bellotti *et al.* 2002).

La mosca blanca (*A. socialis*) es un insecto diminuto, con grandes alas blancas, que ha vivido con los cultivos alimenticios durante siglos. Entre los cultivos más afectados por esta plaga están la yuca, la batata, el fríjol, el tomate, el ají, la papa, la berenjena, el calabacín y el melón, aunque se calcula en más de cincuenta las cultivables a las que ataca esta plaga.

Una de las especies que causa mayores daños en el cultivo de la yuca en la parte norte de Sudamérica es *Aleurotrachelus socialis* y entre los síntomas del daño que causa se encuentran los siguientes: encrespamiento de las hojas apicales, amarillamiento y necrosis de las hojas basales y el retardo en el desarrollo de la planta. Los

adultos de mosca blanca son con frecuencia observados sobre el envés de las hojas apicales, donde se alimentan de los fluidos de la planta y ovipositan. La miel excretada es un sustrato para el desarrollo de un hongo llamado “fumagina”, el cual interfiere con la fotosíntesis del vegetal. La combinación del daño causado por la alimentación directa de la savia y la baja tasa de fotosíntesis reduce el rendimiento de las raíces en un 4% a 79%, según la duración del ataque (Bellotti, 2002). Actualmente, la mayor fuente de resistencia en yuca es el genotipo MECU-72 (Bellotti y Arias, 2001). Cuando *A. socialis* se alimenta sobre MECU-72 hay una reducción en la oviposición, el periodo de desarrollo es más largo, el tamaño es reducido y la mortalidad es más alta que cuando se alimenta sobre el genotipo susceptible.

El control de esta mosca sobre los cultivos ha sido sin duda uno de los retos más difíciles que han enfrentado los cultivadores, siendo la herramienta genética un gran aporte para el desarrollo de estrategias que permitan controlar esta plaga. En la actualidad se han desarrollado varios genotipos resistentes a la mosca blanca, mediante el cruzamiento de variedades con alguna resistencia a este tipo de plaga.

Las técnicas de ingeniería genética, también conocidas como tecnologías del ADN (Ácido Dextrorribonucleico) recombinante, han revolucionado las ciencias biológicas al lograr la captación de ADN de una fuente conocida y su incorporación a un vector para mover y amplificar esta pieza de ADN para su análisis (Arias, 2001). Esta tecnología consiste en el aislamiento y caracterización de uno o varios genes de interés y su introducción en un organismo que se busca modificar. Según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) la tecnología del ADN recombinante es el conjunto de técnicas para inducir cambios en el ADN, que incluyen la identificación y clonación de genes, el estudio de la expresión de los genes clonados y la producción a gran escala de productos génicos. (FAO, 2004). Esta técnica permitiría eventualmente aumentar la eficiencia de resistencia de las plantas modificadas por este método con respecto a las plantas obtenidas por medio de cruzamiento; sin embargo, no se conocen reportes que indiquen el uso de tecnologías de punta

como la tecnología del ADN recombinante para el desarrollo de plantas transgénicas de yuca con un alto nivel de resistencia a la mosca blanca.

Durante la ejecución de este proyecto se estudió la incidencia del ataque de mosca blanca sobre plantas de yuca transformadas genéticamente mediante la tecnología del ADN recombinante, en comparación con plantas no transformadas y una variedad resistente obtenida por cruzamiento genético (MECU-72).

Materiales y métodos

Organismos biológicos

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1) fue obtenida de la American Type Culture Collection y crecida y mantenida en el laboratorio de Investigación de la Universidad de San Buenaventura, seccional Cali.

Las variedades de yuca resistente a la mosca blanca (MECU-72) y susceptible (MCOL 2246) fueron obtenidas del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

La mosca blanca (*A. socialis*) se obtuvo en la Universidad Nacional, sede Palmira.

Cultivo y transformación de la bacteria *A. tumefaciens*

El cultivo y crecimiento de la cepa bacteriana se efectuaron en cajas de petri utilizando el medio agar nutritivo, el cual posee la siguiente composición:

Tabla 1

Composición del Agar nutritivo para el crecimiento de *A. tumefaciens*.

Agar Nutritivo (%)	
Peptona	13
Extracto de carne	8
Cloruro de sodio (sal)	22
Glucosa	16
Agar	41

Fuente: J.S Payan & J.M. Salazar, 2008

Esta cepa se creció a 37 °C durante 24 horas, tiempo en el cual se observó las características morfológicas de la bacteria por medio de tres tinciones diferenciales (tinción de gram, tinción de esporas y tinción de cápsula), las cuales permitieron ratificar su pureza.

Para la transformación de la bacteria *A. tumefaciens* se tomó una colonia previamente crecida en agar nutritivo, se sembró en caldo nutritivo y se incubó a 37 °C con agitación constante.

Se realizó una curva de crecimiento microbiológico que permitió determinar el tiempo que toma la población bacteriana en llegar a su fase de crecimiento exponencial y alcanzar un número aproximado de 5×10^8 células (bacterias), cantidad necesaria para poder aumentar las probabilidades de éxito en la transformación bacteriana.

La transformación bacteriana siguió el protocolo reportado por Mendel & Higa (1970), para lo cual se diluyó 1ml del cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*, crecido *overnight* en 100ml de caldo nutritivo en un beaker de 500ml. Se Incubó a 37 °C con una agitación de 200 rpm hasta que se alcanzó una densidad poblacional de 5×10^8 células por mililitro.

Se colocaron 5 ml del cultivo en tubos y se centrifugaron a 4000g durante 5 minutos y 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 2 ml de buffer de transformación. Todo el proceso se realizó en presencia de hielo. Posteriormente se colocaron las células en hielo durante 5 minutos.

Tabla 2
Contenido del buffer de transformación

100 mM RbCl (cloruro de rubidio)
45 mM MnCl ₂ (cloruro de manganeso)
10 mM CaCl ₂ (cloruro de calcio)
5 mM MgCl ₂ (cloruro de magnesio)
0.5 mM LiCl (cloruro de litio)
35 mM CH ₃ -COOK (acetato de potasio; pH 6.2)
15% sacarosa (Schwartz-Mann; Ultrapuro)

Fuente: J.S Payán & J.M. Salazar, 2008.

Las bacterias se sometieron a dos choques térmicos consecutivos. En el primer caso se congelaron las células bacterianas rápidamente, colocando el tubo en un baño de hielo seco/etanol a -55°C durante 20 segundos. Posteriormente se descongelaron, colocando el tubo en agua a

temperatura ambiente. Una vez descongeladas se transfirió el tubo a un baño de hielo durante cinco minutos.

En estas condiciones se agregaron siete microlitros de dimetil-sulfoxido (DMSO), y se agitaron. Los tubos se colocaron en hielo durante diez minutos.

De esta forma se obtuvieron células competentes, las cuales eran mantenidas en hielo. Posteriormente fue agregado el plásmido recombinante (25 ng de ADN en cinco microlitros del buffer de ligación o TE (pH 7.4), y se mantuvieron las células en hielo durante 20 minutos, al cabo de los cuales se colocaron a temperatura ambiente.

Posteriormente, las células bacterianas fueron sometidas a un segundo choque térmico mediante la inversión de los tubos en un baño de hielo seco/etanol durante 45 segundos. Posteriormente se descongelaron los tubos en agua a temperatura ambiente. Los tubos descongelados fueron sumergidos en un baño de hielo durante dos minutos. Inmediatamente después las células fueron estresadas mediante la inmersión del tubo en agua a 42 °C por 1 minuto.

Cumplida esta serie de pasos, algunas bacterias de *A. tumefaciens* eran recombinantes.

Crecimiento y selección de bacterias de *A. tumefaciens* recombinantes

Se tomaron bacterias obtenidas del procedimiento anterior y se sembraron en agar nutritivo con ampicilina y tetraciclina. Las colonias bacterianas que crecieron sobre el agar estaban formadas por bacterias recombinantes que poseían los genes de resistencia a estos antibióticos ubicados en el plásmido Ti. Se utilizaron bacterias sin transformar como control, las cuales fueron sembradas en el mismo medio rico en antibióticos.

Para el almacenamiento de las bacterias de *A. tumefaciens* recombinantes por un periodo corto se recriaron en caldo nutritivo durante 48 horas, y posteriormente se les agregó 1% de glicerol estéril.

Transformación de la planta de yuca con el plásmido recombinante

Las bacterias recombinantes con el gen de interés en su interior (*cry1Ab*) se colocaron en contacto con tejido meristemático vegetal expuesto de la planta de yuca genotipo MCOL 2246, previo corte de aproximadamente un centímetro, lo cual permitió la infección de las plantas. Estas muestras vegetales fueron plantadas en material de crecimiento rico en nutrientes y posteriormente fue evaluada la resistencia de las plántulas a la mosca blanca.

La evaluación sobre la resistencia de las plantas transformadas por la tecnología del ADN recombinante siguió un diseño estadístico que permitió comparar el ataque de la plaga a estas plantas y compararlas con el ataque de la plaga a las plantas no transformadas y las transformadas por cruzamiento genético.

Diseño experimental

El diseño estadístico para aceptar o rechazar la hipótesis nula se basó en una Anova la cual utilizó el estadístico de Fischer.

Las hipótesis experimentales fueron:

Ho: No hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Ha: Al menos uno de los tratamientos presenta diferencias significativas.

Se emplearon tres tratamientos correspondientes a:

T1: Yuca genotipo MCOL 2246 sin transformar.

T2: Yuca genotipo MCOL 2246 transformada por tecnología del DNA recombinante.

T3: Yuca genotipo MECU-72 resistente a mosca blanca obtenida por entrecruzamiento.

Se plantearon tres repeticiones de cada uno de los tratamientos y cada tratamiento constaba de 10 materiales de muestra.

En caso de rechazar la Ho (hipótesis nula) y aceptar la Ha (hipótesis alterna) se realiza una prueba de postanova (Prueba de Tukey) para determinar niveles de significancia entre los diferentes tratamientos.

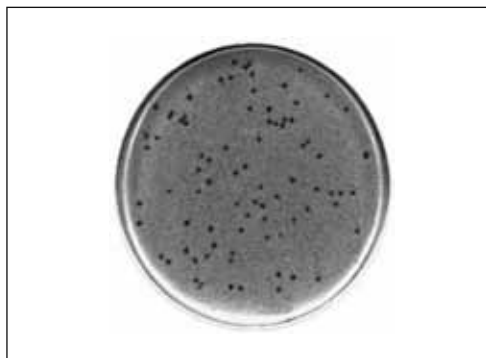
Resultados y discusión

Cultivo y crecimiento de la cepa bacteriana (*A. tumefaciens*)

La cepa bacteriana de *A. tumefaciens* fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC), y crecida en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de San Buenaventura en caldo nutritivo y posteriormente recrecida en agar nutritivo, con las condiciones ideales de incubación (37 °C y 24 horas). La bacteria presentó buen crecimiento en las condiciones mencionadas anteriormente, y alcanzó a desarrollar características que concuerdan con la bibliografía para las colonias formadas por *A. tumefaciens* (Figura 1).

Figura 1

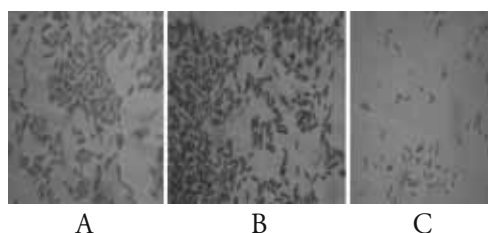
Cultivo axénico de la bacteria *A. tumefaciens*, donde se pueden visualizar colonias aisladas de la bacteria



A partir de las colonias formadas se realizó la coloración de gram, coloración de esporas y coloración de cápsula, que mostraron una bacteria tipo bacilo, gram negativa, sin cápsula y sin esporas, concordantes con la literatura para este tipo bacteriano (Figura 2).

Figura 2

Tinciones diferenciales de *A. tumefaciens* donde se observa: A) Bacteria tipo bacilo gram negativa; B) Bacteria tipo bacilo sin cápsula; C) Bacteria tipo bacilo sin espora.



A partir de los resultados anteriormente mencionados se puede afirmar que la bacteria *A. tumefaciens* crece bien en un medio líquido como caldo nutritivo y en un medio sólido como agar nutritivo, cuando está en incubadora a 37 °C y durante 48 horas. Esta bacteria, gram negativa, sin presencia de cápsula o esporas, no necesita de medios muy sofisticados para el crecimiento, lo cual permite que sea un excelente microorganismo para la obtención de células competentes, con costos relativamente bajos.

Curva de crecimiento *A. tumefaciens*

Después de realizada la caracterización colonial de *A. tumefaciens* se procedió a realizar la curva de crecimiento con el objetivo de identificar el tiempo que toma la población en alcanzar 5×10^8 células/cc, número indicado para poder comenzar con la transformación bacteriana por el método de cloruro de Calcio (Mandel and Higa, 1970).

La estandarización de la curva proporcionó los datos consignados en la Tabla 3. A partir de estos datos se realizó la curva de crecimiento (Figura 3), que permitió conocer el comportamiento del crecimiento bacteriano de *A. tumefaciens* en un medio nutritivo (caldo nutritivo).

Tabla 3

En esta tabla se muestra el crecimiento poblacional de *A. tumefaciens* en las primeras seis horas, a partir de lo cual la población entra en la fase estacionaria

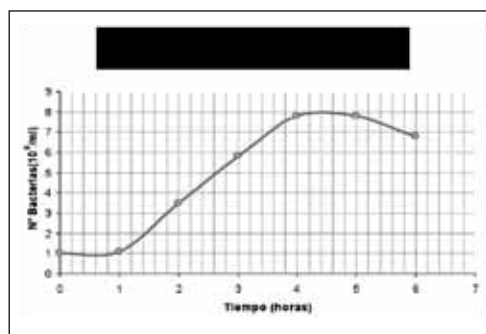
Tiempo (horas)	Nº bacterias (10 ⁸ /ml)
0	1
1	1,1
2	3,5
3	5,8
4	7,8
5	7,8
6	6,8
Tiempo (horas)	Nº bacterias (10 ⁸ /ml)
0	1
1	1,1
2	3,5
3	5,8
4	7,8
5	7,8
6	6,8

Fuente: J.S Payán & J.M. Salazar, 2008

A partir de los datos de la Tabla 3 anteriormente mostrada se procedió a elaborar la curva de crecimiento correspondiente, la cual mostró que se obtenía el número ideal de células para la transformación alrededor de la tercera hora después de la inoculación, con los parámetros de 100 ml de caldo nutritivo, 10% de inóculo y 37 °C de crecimiento continuo en incubadora.

Figura 3

Curva de crecimiento de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, a 37 °C y presión ambiental



Aunque se obtuvo el crecimiento poblacional requerido para realizar la transformación bacteriana, se nota de la gráfica que la fase de latencia es muy amplia y la fase de crecimiento exponencial (la cual era la importante) no comienza sino después de una hora. El tiempo de la fase de latencia puede reducirse si a los parámetros de crecimiento anteriormente mencionados se les agrega agitación constante, lo cual homogeniza el medio (nutrientes) y aumenta la fisión binaria propio de este tipo de bacteria.

Transformación (Bacteria *A. tumefaciens*)

Para la transformación de la cepa de *A. tumefaciens* se procedió a realizar el protocolo de Mandel and Higa (1970), el cual permite introducir ADN foráneo por medio del tratamiento de las células con cloruro de calcio, obteniendo de esta forma células recombinantes de *Agrobacterium tumefaciens* (células competentes) las cuales poseían el plasmido Ti con un gen marcador de ampicilina y el gen de interés.

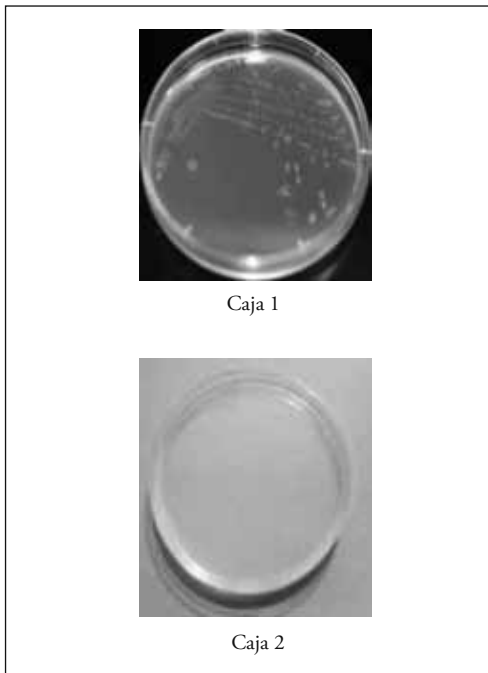
Las bacterias recombinantes (*A. tumefaciens* transformada) fueron seleccionadas a partir de la siembra en un medio nutritivo (agar nutritivo) rico en ampicilina y tetraciclina, antibióticos

que permiten que crezcan solo las bacterias que poseen el plasmido Ti con los genes marcadores en su interior (gen de resistencia a ampicilina y gen de resistencia a tetraciclina).

Tal como se puede observar en las fotos mostradas a continuación, las bacterias que no poseían los genes marcadores no podían crecer puesto que no pueden sintetizar el peptidoglucano necesario para la elaboración de la pared celular, debido a la presencia de ampicilina y tetraciclina, mientras que las bacterias que fueron transformadas y poseían los genes marcadores crecían sin ningún problema.

Figura 4

Caja 1: Crecimiento recombinantes de *A. tumefaciens* en agar nutritivo rico en ampicilina y tetraciclina. Caja 2: No hay crecimiento de *A. tumefaciens*, lo cual indica que el proceso de transformación no se llevo a cabo

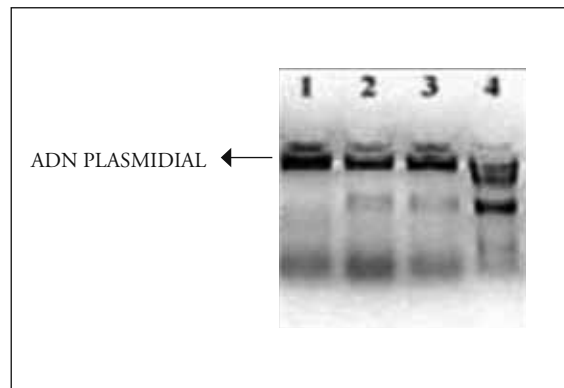


- Gen de interés (Cry 1Ab)

Además de la selección en medios ricos en antibióticos, se procedió a realizar un gel de agarosa con ADN procedente de estas bacterias seleccionadas, las cuales mostraron que poseían el plásmido recombinante (Figura 5).

Figura 5

En los pozos numero 1, 2 y 3 se encuentran 10 µl de ADN bacteriano recombinante, donde se puede observar una banda correspondiente a ADN plasmidial. En el pozo 4 se encuentra 10 µl del marcador de peso molecular



Transformación de la planta de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) con el plásmido recombinante

Para la transformación de la planta de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) con el plásmido recombinante se procedió a realizar una exposición del tejido vegetal interno mediante una incisión en el tallo. Posteriormente se colocó un gel que contenía bacterias recombinantes, las cuales infectaron la planta y transmitieron el vector de transformación a la planta.

Este procedimiento se realizó en plántulas de 1,5 cm de altura que fueron colocadas en invernadero bajo control experimental. A estas plantas se les realizó una extracción proteica y una posterior purificación por HPLC que permitió el aislamiento de la proteína de interés, la cual se encontraba bajo la codificación del gen Cry 1AB.

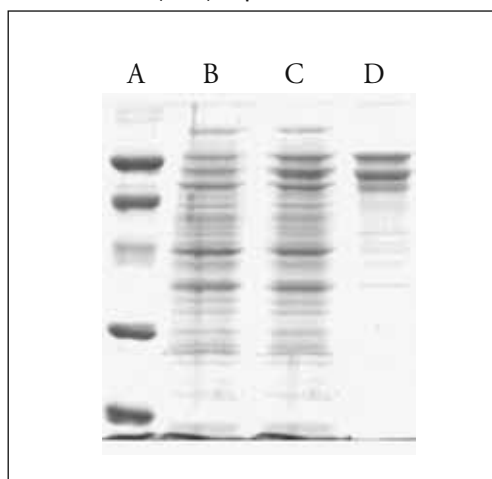
En la siguiente figura se puede observar el gel de poliacrilamida realizado a la purificación del extracto vegetal, y en ella se demuestra que las plantas expresaban la proteína de interés.

Estas bacterias recombinantes que poseían el gen marcador también poseían el gen de interés Cry 1 AB, el cual tiene la información para que una planta (en este caso la yuca) pueda producir una proteína capaz de causar resistencia en la mosca blanca (*A. socialis*), puesto que el plásmido Ti contenía:

- Gen marcador (Resistencia a ampicilina y vancomicina).
- Origen de replicación autónomo proveniente de *E. coli*.

Figura 6

Gel de poliacrilamida donde se observa la proteína de interés expresada por la planta a partir del gen Cry1AB. A) Marcador molecular, B-C) Extracto vegetal crudo, D) proteína de interés (61 KD) después de HPLC



Diseño experimental

Se tuvieron cien muestras de cada tratamiento y tres repeticiones de cada uno de los tratamientos. En la Tabla, a continuación, se muestran los resultados cuando los tratamientos se expusieron a la mosca blanca en invernadero:

Tabla 4

Datos experimentales recogidos en invernadero de la exposición de los tres tratamientos a la mosca blanca

	T1	T2	T3
	55	20	52
	72	24	51
	89	32	15
	94	9	21
	91	21	20
	92	17	12
TOTAL	493	123	171
MEDIA	82,17	20,50	28,50

Fuente: J.S. Payán & J.M Salazar, 2009.

De los datos anteriormente mostrados se construyó una anova para determinar si hay diferencias entre los tratamientos. Para este procedimiento se utiliza el estadístico de Fischer (Tabla 5).

De la Anova se puede determinar que el F calculado es mayor que el F tabla, criterio este para rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alterna. De esta manera se hace necesario realizar

Tabla 5

ANOVA realizada a partir de los datos de la tabla anterior donde se muestra el estadístico de Fischer

E.V.	S. C		F (FISCHER)
Entre grupos	Entre grupos	6746,89	F calculado
	13.493,78		32,29
Dentro de grupos	Dentro grupos	208,92	F de tabla
	3.133,83		3,68
Total	Total		Comparación
	16.627,61		F de Tabla

Fuente: J.S. Payán & J.M Salazar, 2009.

una postanova de Tukey para determinar cuáles tratamientos representan diferencias entre ellos.

A partir de los datos obtenidos en la postanova de Tukey se puede determinar que hay diferencias significativas entre los tratamientos 1, 2 y 3. Las mayores diferencias se encuentran en los tratamientos 2 y 1 y en los tratamientos 3 y 1. Sin embargo, aunque se presentan diferencias significativas entre los tratamientos 2 y 3, éstas no son tan altas. En cierto sentido, esto es lo esperado, puesto que las mayores diferencias se presentan entre las plantas de yuca modificadas y el control (planta de yuca no modificada), pero la diferencia en eficiencia disminuye entre las plantas de yuca modificadas (Tratamiento 2 y 3).

Hay diferencias significativas entre las plantas de yucas transgénicas resistentes a la mosca blanca obtenidas por entrecruzamiento (tratamiento 2) y las plantas de yucas transgénicas experimentales resistentes a la mosca blanca, obtenidas por la tecnología del ADN recombinante (Tratamiento 3), pues en el primer caso se obtiene una efectividad del 71,5 % comparado con la efectividad del segundo caso que es del 79,5 %. Estos datos son obtenidos a partir de la Anova y se determinan como porcentaje de plantas de yuca que no son atacadas por la mosca blanca. Si bien se puede afirmar que la tecnología del ADN recombinante es propicia para la producción de plantas transgénicas de yuca resistente a la mosca blanca, también se debe decir que la efectividad lograda utilizando esta tecnología, aunque no es despreciable (79,5 %), no representa una diferencia tan grande que permita asegurar la ventaja indiscutible de la técnica.

En esta relativa poca diferencia de efectividad puede tener injerencia el plásmido recombinante Ti que fue utilizado como vector e introducido en la bacteria competente, el cual poseía un promotor de *E. coli* y dos marcadores, uno de resistencia a ampicilina y otro marcador de resistencia a vancomicina, con un ORI de *E. coli*. Aunque este era un plásmido convencional, normalmente usado en este tipo de trabajos, se puede mejorar colocando un promotor más eficiente, el cual permitiría lograr una mayor cantidad de elementos transgénicos que se vincularían al genoma vegetal y traerían como resultado final mayor eficiencia en la transformación.

Conclusiones

1. La tecnología del ADN recombinante es una excelente herramienta para la obtención de plantas transgénicas con algún tipo de resistencia.
2. Los vectores juegan un papel importante al momento de introducir el gen experimental en la bacteria recombinante; por esto se debe buscar un vector con un promotor fuerte que permita obtener una alta eficiencia en la producción de las proteínas heterólogas.
3. A partir de este trabajo se desarrolla una tecnología de punta para la transformación vegetal, que puede ser utilizada en cualquier tipo de planta, lo cual convierte esta técnica en una herramienta fundamental para el ingeniero agroindustrial interesado en aumentar la producción vegetal por medio de la disminución de plagas.
4. Aunque los datos experimentales y estadísticos permiten afirmar que se presenta una efectividad del 79,5 % en la resistencia de mosca blanca en yuca transgénica, se deben realizar mayores trabajos de campo a diferentes condiciones experimentales (altura, temperatura, humedad), para poder confirmar esta efectividad.
5. Si bien se utilizó una técnica de transformación conocida como técnica de transformación por cloruro de calcio, la cual es muy usada en investigación, se sugiere para posteriores trabajos utilizar la técnica de electroporación o balística, con el objetivo de obtener mayores bacterias competentes.
6. Se deben realizar estudios adicionales que permitan identificar si las plantas de yuca reportadas en este trabajo y modificadas genéticamente presentan alguna resistencia a la fumagina o por el contrario son más susceptible al ataque del hongo.

Bibliografía

- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; and STRUHL, K (1989). *Short Protocols in Molecular Biology*. Nex York: Wiley.
- BELLOTTI, A.C. & B. ARIAS, (2001). *Crop Protection*. No 20:813-823.
- BELLOTTI, A.C. (2002). *Thresh and A.C*. New York: Eds. R.J Hillocks. CAB International.
- BENÍTEZ, C. N (2002). *Manual de laboratorio de microbiología*. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Cali: Universidad del Valle.
- CIAT, (1995). *Cassava program annual report*.
- GLAZER, A. N & H. NIKAIDO (1998). *Microbial Biotechnology. Fundamentals of Applied Microbiology*. New York: Freeman and company editorials.
- HAMES, B. D., RICKWOOD, D. (1990). *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. London: IRL Press.
- MANDEL, M & A.HIGA (1970). *Calcium dependent bacteriophage DNA infection*. J. Mol. Biol. 53:154. New York.
- MANIATIS, T. (1980). *Recombinant DNA*. In *Cell Biology*. New York: (ed. D. M. Prescott). Academic Press.
- PAYÁN, S., SALAZAR, J. (2008). Tesis de Grado: *Resistencia de la Yuca a la Mosca Blanca por transgénesis*. Universidad de San Buenaventura, seccional Cali. Director Raul Cuervo.