



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org

20017

ap

**PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PARA
AMERICA LATINA Y EL CARIBE
PNUD/UNESCO/ONU
RLA/83/003**

Contrato No. 88/68

**Proyecto: Resistencia a virosis en papa. Desarrollo de
plantas de papa que presenten resistencia a los virus
PVX, PVY, PVS y PRLV mediante técnicas moleculares
y cultivo de plantas in vitro.**

Primer Año de Actividades

País: Cuba

Informe Técnico/Financiero Final



Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

Aptdo 6162, La Habana, Cuba. Teléf.: 201401-09 Telex: 512330 Fax: 53 7 210070

INFORME FINAL DEL PRIMER AÑO DE ACTIVIDADES REALIZADAS

POR EL *CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA (CUBA)*

DENTRO DEL PROYECTO "RESISTENCIA A VIRUS DE PAPA".

Informe final del 1er año de actividades realizadas por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Cuba) dentro del proyecto "Resistencia a virus de papa."

1.-Actividad: Identificación de 3 genotipos de papa resistentes al virus PVY mediante ELISA, hibridación molecular (actividad 1.4 del proyecto general)

En el artículo 1.4 del proyecto general donde debían participar Cuba y Argentina nuestro laboratorio realizó un tamizaje dentro de los centros productores de semilla a aquellas variedades comerciales que presentasen diferentes grados de resistencia a los virus PVX, PVY y PLRV, tomando como criterio su comportamiento en el campo. Este trabajo aporta al plan del proyecto en sí, pues podemos determinar sobre qué genotipos trabajar en los experimentos de inducción de resistencia por ingeniería genética y tener además material de comparación de los resultados que obtengan. No hemos tenido coordinación de los resultados obtenidos en los trabajos realizados en Argentina.

Tabla Nº 1

<u>Variedad</u>	<u>Grado de Resistencia</u>		
	<u>PLRV</u>	<u>PVY</u>	<u>PVX</u>
Kennebec	-	*	-
Nipigon	-	*	*
Trent	-	*	-
Atlantic	-	-	*
Caribe	+	!	-
Rideau	+	+	+

- * Altamente Resistente
- + Medianamente Resistente
- ! Altamente Susceptible
- Resistencia No Ensayada

En la segunda parte de este artículo se intercambiarán resultados obtenidos en ambos países con metodología desarrollada en Argentina a través de la estancia de un investigador de nuestro Centro en el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET), Argentina durante los últimos meses de 1989.

2.-Actividad: Obtención de genoteca del virus PVY (actividad 3.1 del proyecto general)

El Instituto de Biología Molecular (IBM) CIVC-INTA Castelar logró un clon cDNA que contiene la secuencia completa de la proteína de la cápsida del PVY y un segmento de la replicasa viral que se encuentra en el extremo 5' adyacente del gen de interés. La expresión en *E. coli* y en plantas de la proteína de la cápsida codificada por este clon fué el objetivo de la estancia de trabajo en nuestro laboratorio del investigador Fernando Bravo-Almonacid. Se diseñaron varias estrategias para, mediante el clonaje en un vector de expresión de *E. coli*, comprobar por inmunoidentificación el reconocimiento del producto del gen usando anticuerpos anti-PVY. Durante esa estancia se comenzó este trabajo, el cual se continúa en estos momentos por personal de nuestro laboratorio. Las estrategias consisten en cortar el clon cDNA en la región cerca del lugar de procesamiento y situarle un ATG que sirva como iniciador tanto a los mRNA de *E. coli* como de la planta y acoplarlo a una región promotora de la transcripción en un vector de expresión.

Para lograr ésto se trabaja en:

- i) Acoplamiento del promotor Pr del fago Lambda
- ii) Acoplamiento del promotor híbrido ptac de *E. coli*
- iii) Acoplamiento al promotor de la proteína 35 S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV)
- iv) Modificación del inicio para adición de ATG mediante la técnica de PCR.

Ninguno de estos trabajos está totalmente concluido, pero de hecho constituye un paso más adelantado del compromiso del proyecto para este año.

3. Actividad: Obtención de genoteca parcial cDNA del virus PLRV (artículo 3.1 del proyecto general)

Esta tarea ha mostrado una mayor complejidad debido a los bajos rendimientos de la purificación del virus y el hecho de que la transmisión del mismo sea únicamente a través de áfidos, lo que ha dificultado contar con un stock estable de plantas enfermas con el virus en cuestión y libres de otras enfermedades, que sirvan como fuente de obtención del virus.

Recientemente fue reportada la secuencia de la proteína de la cápsida de este virus, lo que nos ha permitido iniciar una estrategia de trabajo que pensamos nos permita adelantar el cronograma de acuerdo al objetivo final a obtener.

Se diseñaron y sintetizaron 2 oligonucleótidos complementarios a las regiones 3' y 5' de la región del genoma viral que codifica para la proteína de la cápsida. Con estos pensamos realizar un cDNA partiendo de RNA total de plantas infectadas con el virus

usando como primer el oligonucleótido complementario de la región 3' para después emplear ese cDNA para un PCR usando el otro oligo, de manera que se obtenga una banda específica del gen de la cápsida.

4.-Actividad: Secuencia de los clones representativos del genoma del virus PVY (actividad 3.2.1 del proyecto general)

Este aspecto está cumplimentado por el laboratorio del Instituto de Biología Molecular CIVC-INTA Castelar, ya que el clon con el cual estamos trabajando ambos grupos fue secuenciado por ellos y publicada la secuencia en la revista Nucleic Acids Research. De lo anterior se deduce que este aspecto está totalmente concluido, aunque la participación de nuestro laboratorio fue nula.

5.-Actividad: Secuencia parcial del genoma del virus PLRV.

Respecto a este punto nos encontramos retrasados y su comienzo está en función de la terminación del clonaje del PLRV explicado anteriormente. Esta secuencia si la tendremos que clonar, pues representaría un aislado propio y sería necesario comparar la homología con la reportada en la literatura. La comparación de la homología de las secuencias reportadas por la literatura demuestra que son muy semejantes los diferentes aislamientos secuenciados.

Esta actividad continuará en el 2º año del proyecto.

6.-Actividad: Búsqueda de clones que codifiquen para la proteína de la cápsida del PVY (artículo 3.2.3 del proyecto general)

Como explicamos anteriormente tenemos clones cDNA que representan la proteína de la cápsida (facilitados por IBM CIVC, INTA Castelar). Estos clones, por las características en que se procesa la proteína de la cápsida de este virus, no se expresan en E. coli ni en plantas, por lo que es necesario adicionarle el codón de iniciación ATG en fase y acoplárle una región promotora de plantas o E. coli para comprobar que se sintetiza una proteína que sea reconocida al menos por anticuerpos anti-PVY. En esta fase nos encontramos, y pensamos puedan tenerse las evidencias en el 2º año del proyecto, donde debe concluir de acuerdo a lo planificado para esta tarea.

Conclusiones del trabajo del 1º año.

Consideramos que la situación del trabajo del 1º año del proyecto es positiva de acuerdo a lo planificado para el proyecto. La colaboración entre nuestro laboratorio y el IBM-CIVC INTA Castelar ha sido muy provechosa y pensamos que en la etapa que sigue, en la cual uno de nuestros investigadores debe ir a ese laboratorio argentino, esta cooperación se estrechará aún más.

Creemos que la colaboración de nuestros de nuestros laboratorios es un ejemplo de cooperación científica y potenciación de esfuerzos en busca de resultados mayores en el menor tiempo posible, de manera que el éxito de los objetivos de este proyecto de acuerdo a los resultados del 1^{er} año pueden considerarse seguros.

**CENTRO DE
INGENIERIA GENETICA
Y BIOTECNOLOGIA (CIGB)**

Ciudad de la Habana
10 de mayo de 1990

DC-

Dr. Rodolfo Quintero
Director General del Programa
Regional de Biotecnología y
Coordinador Técnico del Subprograma ONUDI
México D.F., México

Estimado Quintero:

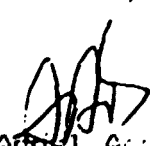
Asunto: Programa Regional de Biotecnología RIA/83/003
Contrato ONUDI No. 88/68

Me complace dirigirme a usted para adjuntarle las siguientes facturas que amparan la adquisición del equipo previsto en el contrato de la referencia para ser utilizado en el proyecto "Desarrollo de plantas de papa resistentes a virosis". Este contrato se refiere al primer año de ejecución del proyecto:

No. 9439	Suministrador TECUN	2,691	US DLS
No. INT-HAV 017-0	Suministrador PHARMACIA	4,149	EQ.US DLS
No. GE-9510	Suministrador GEMEX	6,160	EQ.US DLS
Total		13,000	EQ.US DLS

Aprovecho la oportunidad para saludarlo,

Atentamente,


Dr. Angel Aguilera, Director
Dirección de Colaboración y
Relaciones Internacionales

ANEXOS

TECUN

COD. CLIENTE

198

C.I.B.B.

FECHA

20112189

N° FACTURA

9439

COMERCIAL

17

Cuenta Bancaria: **TECUN**

Nro: 402-01-754 USD

ATTE: IRASES

CODIGO	DESCRIPCION	CANTIDAD	PRECIO	IMPORTE	PENI
1.01.096	MICROCOMPUTADORA ACER 1100-041 SX.1 MB RAM EXPANDABLE TO 8 MB HICAO.80386SX,8/16 MM2.1 FDD 1,2 HD,1 H/D 40 MB (28 MS),VGA ON BOARD COMPATIBLE EGA,CGA, HDA Y HERCULES,2 PUERTOS SERIE Y 1 PUERTO PARALELO,TECLADO 101 TECLAS,DOC.MSDOS 3.3, GN- BASIC 3.22	1.0	2222.0000	2222.00	
1.02.014	MONITOR 7013 14" COLOR P11030 VGA/MCGA 0.31MM DOT PITCH 115V	1.0	428.0000	428.00	
1.05.014	MOUSE ACER 6720	1.0	41.0000	41.00	



TOTAL FACTURA

2691.00

PAGADO

RECIBIDO

Forma de Pago:

SUB-MAYOR

ANEXO 220



Pharmacia

Pharmacia LKB Biotechnology International AB

FACTURA COMERCIAL. EQUIPOS ENTREGADOS

Our ref INT-HAV 017-0 Date 890927

Your ref SERVICEX
DPTO. 4

1 Peristaltic pump	2360-120	17.864.-SEK
1 Uvicord SD Monitor	2158-010	26.300.-SEK

SUB-TOTAL :	44.164.-SEK
- 10% Descuento:	4.416.-

TOTAL :	39.748.- SEK
---------	--------------

=====

Lic. Aldo Galano
PHARMACIA LKB BTG INT.

Postal address
Pharmacia LKB
Biotechnology International AB
Box 308

Visiting address
Tappvägen 24
Bromma

Telephone
Nat 08-799 8000
Int +46 8 799 8000

Telex
10161

Teleccpler
Nat 08 98 28 96
Int +46 8 98 28 96

ITEM	QUANTITY	UNIT	SPECIFICATIONS	UNIT PRICE	TOTAL
------	----------	------	----------------	------------	-------

Article	Unit Price(DM)	Total Price(DM)
Differential Refractometer for analytical use with digital display, microprocessor controlled auto-zero and variable time constant, equipped with connections for external thermostats when thermostating is necessary Order-No.7329800000		7.205,00 ✓
Flow cell, 45 degrees, 8 ul, without recess Order-No. 6207570020		396,00 ✓
Flow cell, 15 degrees, 12 ul, without recess Order-No.6207570040		440,00 ✓
Pack of gaskets for above flow cells Order-No. 6207521050		33,00 ✓

Price ex works: 8.074,00 ✓
 FOB Charges: 75,00
 Total FOB West-Berlin Airport: 8.149,00 ✓
 =====

 Gemex
 Lic. Nilo Espinosa

 Ferrimport
 Miguel sosa