



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

20484

12/10/83
SP
-4.00

PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PARA AMERICA
LATINA Y EL CARIBE DP/RLA/83/003

RESISTANCE TO VIROSIS IN POTATO: DEVELOPMENT OF
POTATO PLANTS BEARING RESISTANCE TO POTATO
VIRUS PVX, PVY, PVS AND PLRV BY COMBINED
MOLECULAR AND IN VITRO PLANT CULTURE
TECHNIQUES

INFORME TECNICO FINAL

CONTRATO No. 92/086
CINVESTAV-Irapuato
Irapuato, Guanajuato, México
Dr. Luis Herrera Estrella

**CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS-IPN
UNIDAD IRAPUATO
REPORTE DE LAS ACTIVIDADES REALIZADA POR EL
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA GENETICA DENTRO DEL
PROYECTO:**

**RESISTANCE TO VIROSIS IN POTATO:
DEVELOPMENT OF POTATO PLANTS BEARING RESISTANCE TO
POTATO VIRUS PVX, PVY, PVS AND PLRV BY COMBINED MOLECULAR
AND IN VITRO PLANT CULTURE TECHNIQUES.**

En este último periodo del proyecto se han desarrollado las siguientes actividades:

- A) Obtención de plantas transgénicas de papa con un vector que contiene el gene marcador NPT II y los genes de las proteínas de las cápsides de los virus PVX y PVY.
- B) Análisis de las plantas obtenidas para verificar la expresión de los genes virales.
- C) Selección de las líneas con mejor expresión de la proteína de la cápside de PVX y evaluación de resistencia.

A) Obtención de plantas transgénicas de papa.

Esta actividad involucró la propagación de la variedad de papa Alfa para la transformación, la infección con *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el plásmido con los genes virales (cncultivo) y su regeneración.

PROPAGACION: Para evitar en lo más posible tener variación somaclonal, las plantas son propagadas mediante meristemas, de las siguientes dos maneras:

- 1) Se corta el ápice (1-2 cm), al cual se le quitan las hojas y se resiembra.

- 2) Se resiembran los internodos cortados en segmentos de aproximadamente un centímetro de largo. Se espera a que las llemas se desarrollen, se cortan las plantas regeneradas y estas se vuelven a resembrar.

Las resiembras se hicieron, en medio MS-0.7% agar-2 % sacarosa, cada 15-25 días cuando las plantas ya hayan echado raíces.

COCULTIVO: Para infectar los explantes se ha usado una cepa de *A. tumefaciens* que contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa (NPT II) el cual confiere resistencia al antibiótico kanamicina y los genes de las proteínas de las cápsidas de PVX y PVY.

La bacteria se creció en medio YEB con antibióticos a 28 °C de temperatura hasta una densidad de 10^8 bacterial/ml (usualmente toda la noche).

El cocultivo se hizo con segmentos de tallo de plantas de plantas con aspecto vigoroso y saludable. Los segmentos fueron colocados en 10 ml de MS líquido y se le añadieron 30-70 μ l del cultivo de bacterias. El tiempo de cocultivo es de 48 hrs a 26°C.

REGENERACION: Al terminar el cocultivo los explantes fueron transferidos al medio de regeneración (MS + agar + glucosa + zeatina + antibióticos). Los explantes fueron transferidos a medio fresco cada semana.

ENRAIZAMIENTO: Cuando los brotes alcanzaron una talla de 1 o 2 centímetros se cortaron y se pusieron en medio de enraizamiento (MS + agar + sacarosa + clorofórmico). **NOTA:** Los brotes tardan aproximadamente 2 semanas en enraizar, pero hay que esperar hasta tener suficiente material para hacer las pruebas de comprobación sobre la transformación (ensayos de NPT II y análisis por hibridación molecular).

Se obtuvieron más de 100 líneas independientes que crecieron bien en presencia de kanamicina. A todas las líneas se les hizo el ensayo de re-enraizamiento el cual consiste en tomar un explante de la planta a ensayar y ponerlo en medio con antibiótico (kanamicina). Si la planta es transgénica y expresa adecuadamente el gen NPT II, el explante formará callo (y a

largo plazo brotes). Si la planta no es transgénica o no expresa el gen NPT II adecuadamente, el explante morirá sin producir caído.

B) Análisis de las plantas transgénicas

Las plantas obtenidas fueron analizadas, además de la prueba de enclavamiento, por ensayos tipo ELISA para detectar la proteína neomicina fosfotransferasa (del gen NPT II) y la proteína de la cápside del virus PVX.

El ensayo se realizó utilizando anticuerpos contra las dos proteínas (independientemente) que fueron conjugados con las enzimas peroxidasa (para el caso de NPT II) y fosfatasa alcalina (para el caso de PC- PVX). En el primer caso era importante no utilizar la enzima fosfatasa alcalina (la cual es más común en este tipo de ensayos) ya que el anticuerpo anti-NPT II conjugado con fosfatasa mostraba un fuerte fondo en el ensayo.

A continuación se presenta un breve resumen de eficiencia de los resultados de la transformación de la variedad Alfa

- En promedio el 50 % de los explantes produjo brotes.
- De el número total de brotes obtenidos, un promedio de 63% fueron positivos en el ensayo inmunológico (ELISA) para el producto del gen de NPT II. Esto significa una eficiencia final de aproximadamente 16 % que de acuerdo a los valores en la literatura es bastante buena.

C) Selección de las líneas y evaluación de resistencia.

Las líneas evaluadas por ELISA fueron organizadas en base a su expresión de la proteína de la cápside de PVX. No se realizó una prueba inmunológica similar para la proteína de la cápside de PVY ya que por ser una proteína procesada y por algunas características intrínsecas sugeridas por otros autores, su inmunogenicidad no es muy buena.

Se seleccionaron las 50 líneas con mejor expresión de la proteína de la cápside de PVX y se propagaron *in vitro* (alrededor de 50 replicas por línea). Las plantas fueron transplantadas en invernadero a vasos de poliestireno con suelo estéril. Durante los primeros días se mantuvo una

bolsa de plástico en cada vaso para impedir que las plantas se desecaran. Poco a poco las bolsas se fueron abriendo hasta que las plantas se adaptaron a las condiciones ambientales del invernadero (aproximadamente 2 semanas).

En base al número de plantas de cada línea y a su condición fisiológica, se seleccionaron 30 líneas para ser trasplantadas a campo. Dos tipos de control fueron incluidos en la prueba: A) plantas no transgénicas pero provenientes de cultivo de tejidos *in vitro*, y B) plantas no transgénicas provenientes de mini-tubérculos germinados en invernadero en condiciones similares a las que las plantas transgénicas fueron sometidas. En total se probaron 1200 plantas transgénicas (30 líneas X 4 replicas de 10 plantas cada una).

Las treinta líneas fueron trasplantadas en un campo delimitado dentro de las instalaciones del CINVESTAV y se contó con el permiso adecuado del Comité de Bioseguridad Biotecnológica de la Dirección de Sanidad Vegetal de la Secretaría de Recursos Hidráulicos. Este comité verifica lo concerniente a liberación al ambiente de materiales transgénicos.

A continuación una breve cronología del experimento incluyendo únicamente las etapas más importantes:

- | | |
|-----------|--|
| Febrero 9 | Transferencia de las líneas transgénicas de medio de cultivo a suelo (en invernadero). |
| Marzo 5 | Transplante a campo de las plantas transgénicas. |
| Marzo 10 | Substitución de las plantas que no se adaptaron (o se dañaron) durante el transplante. (8 plantas de diferentes líneas). |
| Marzo 20 | Aplicación de insecticida (Gusatión), recomendado para insectos masticadores |
| Abril 4 | Aplicación de fertilizante foliar (20-30-10) y de Tamarón 600 (se detectó la presencia de chicharritas y psíidos). |
| Abril 6 | Otra substitución de plantas que se secaron (12 plantas transgénicas de 12 líneas diferentes). Las plantas muertas (secas) se incorporaron al suelo para su destrucción natural. |

- Abril 7** Inoculación mecánica de todas las plantas (excluyendo los bordes) con una suspensión de virus PVX y PVY.
- Mayo 18-19** Toma de muestra de todas plantas del experimento (excluyendo bordes) para efectuar un análisis ELISA para evaluar el porcentaje de infección por PVX y PVY.
- Junio 15-16** Cosecha de los tubérculos de las líneas transgénicas.

Hubo una supervisión constante del campo para verificar el estado de las plantas, la presencia de insectos, y hacia el final del experimento, para la eliminación constante de todas las flores que iban apareciendo. En este último caso, se eliminaron también las flores de las plantas no transgénicas (de los bordes) como medida preventiva adicional.

Al término del experimento y después de cosechar todos los tubérculos, se reincorporó todo el material al suelo por medio de rastreos. El terreno donde se sembraron las plantas transgénicas está bien identificado y no se sembrará nada en el siguiente ciclo agrícola para observar la posible aparición de plantas voluntarias.

Es importante hacer notar lo siguiente. El suelo donde se realizó el experimento es bastante pesado y retiene bastante agua. Esto facilitó la infección por hongos y hacia el final del experimento muchas plantas empezaron a secarse por un complejo de hongos que incluyó *Fusarium*. En vista de lo anterior se decidió hacer los muestreos con anticipación y asimismo cosechar los tubérculos de las plantas transgénicas. Así, no se podrá evaluar el rendimiento de cada línea y únicamente se evaluará el grado de resistencia a las infecciones virales por PVX y PVY.

A continuación se muestra un calendario resumido de los resultados obtenidos con las líneas transgénicas que se comportaron mejor durante la prueba de campo. Estas líneas están siendo evaluadas más detenidamente a nivel de laboratorio inoculando con diferentes concentraciones de virus para determinar con más exactitud el grado de resistencia.

Num Línea	% Infección PVY	% Infección PVX	COMENTARIOS
6	1	20	Buen candidato para PVY
7	7.5	25	Vigorosa en el campo
27	6	4	Buen candidato
30	15	3	Buena apariencia de replica II, pero no tan buena de replica III
32	20	0	Replica III luce muy bien. La II mostró algo de amarillamiento
33	10	0	Buen candidato
34	0	3	Replica II pareció infectada pero ELISA dió resultados negativos
36	0	9	Muy interesante para PVY
37	10	10	Buen candidato
38	10	8	Muy vigorosa
39	10	0	Buen candidato
42	5	0	Buen candidato
44	20	0	Replica IV lució bien pero la II no tanto.
45	8	15	Replica II se vió muy bien
46	3	0	Buen candidato