



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

19499

Contract 88/C62

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

URUGUAY

INFORME DE AVANCES

Técnico administrativo

Proyecto: "Resistencia a virosis en papa"
DP/RLA/83/003

Participantes: División Citogenética. I. I. B. C. E.
Montevideo, URUGUAY.

Período: Diciembre 1988 - Noviembre 1989

Algunos de los items contenidos en este informe fueron incluidos en en el "Informe de avances" correspondiente al período 12/88 - 4/89.

Coordinación

Se realizaron reuniones con el Ing. Agr. Luis Viega y personal del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República, a los efectos de coordinar su participación en el presente proyecto y evaluar los avances logrados.

El laboratorio culminó la instalación de cámaras tipo fitotrón y demás facilidades y ha desarrollado técnicas de propagación y regeneración de tejidos vegetales.

A través de un convenio de colaboración hemos iniciado experimentos de transformación de tabaco con el sistema de *Agrobacterium tumefaciens*.

Se obtuvieron transformantes controles con resistencia a kanamicina que han regenerado. Las plantas fueron llevadas a tierra, y estamos realizando los experimentos tendientes a confirmar la transformación.

Personal del citado laboratorio realizó extracciones de ADN de plantas transformadas y no transformadas así como digestiones enzimáticas y transferencias tipo Southern.

Viaje de entrenamiento

De acuerdo a lo solicitado un miembro del laboratorio antes mencionado, la Ing. Agr. Teresa Barbat cumplió en el período comprendido entre el 15 y 25 de mayo, una estadia de entrenamiento en el Laboratorio de Genética de I.N.T.A. Castelar bajo la dirección del Dr. Esteban Hopp. (Se adjunta el informe presentado).

El objetivo de la estadia fue lograr entrenamiento en técnicas de obtención y cultivo de protoplastos de papa e infección con virus para selección y regeneración de resistentes.

El mantenimiento de estas líneas se incorporará al programa de detección de polimorfismos y mapeo de genes de resistencia a virus, así como a la iniciación de experimentos de transformación y regeneración de papa.

Análisis de una genoteca de cDNA de *S. commersonii* Dum

Anteriormente se construyó una genoteca de cDNA proveniente de mensajeros de hoja en el fago Lambda gt10.

Esta genoteca no se había analizado hasta el momento. El objetivo del periodo que cubre el informe fue la determinación del número y tamaño de insertos así como su utilidad en hibridaciones en blots para la búsqueda de polimorfismos en fragmentos de restricción.

Para ello, placas de lisis aisladas se transfirieron a SM por procedimientos standard.

Los clones individuales se amplificaron en medio líquido NZY probando varios micrométodos convencionales para obtener lisis adecuada.

La visualización de insertos solo fue posible después de:

- 1) digestión con Eco RI,
- 2) relleno de extremos con dATP marcado con ^{32}P ,
- 3) electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, y
- 4) autorradiografía.

Se analizaron en dos tandas 28 clones y se pudo determinar:

- 1) 12 clones contienen insertos visualizables en estas condiciones (aproximadamente el 46%).
- 2) su longitud varia entre 1800 y 300 pares de bases, con un promedio de unas 400 bases;
- 3) que en la muestra analizada el tamaño de los insertos es heterogéneo, indicando procedencia de distintos mensajeros o distintos fragmentos de ellos.

Caracterización de clones de cDNA en transferencias tipo Southern

Se realizó la evaluación de estos clones en blots conteniendo ADN de *S. commersonii* digerido con diferentes enzimas.

Después de marcar por el método de "multipriming", el ADN recombinante fágico se hibridizó sobre transferencias de ADN total digerido de *S. commersonii*, (dos aislados) y de *Solanum tuberosum* var. Red Pontiac.

Las enzimas utilizadas fueron: Hpa II, Hind III, Bgl II, Xba I y Bam HI.

En estas condiciones, y después de varios tiempos de exposición, incluyendo pantalla intensificadora, no se obtuvo buena calidad de la señal.

Se concluyó que aunque el tamaño de insertos de copia única es adecuado para la investigación de polimorfismos, ellos solo representan promediadamente el 0,01 % del ADN del vector, lo que hace difícil su utilización directa como sondas ya que requieren muy alta marcación específica y largos tiempos de exposición para la obtención de señal interpretable.

Esto vuelve a los clones provenientes de esta genoteca inconvenientes para su utilización en grandes cantidades en la búsqueda al azar de RFLPs.

El subclonamiento de los insertos de cDNA en plásmidos es en este sentido una solución laboriosa y cara.

Por estas razones se decidió construir directamente una genoteca genómica parcial en plásmidos que permitiera una utilización más directa de los recombinantes. Este tipo de genotecas proveen además secuencias únicas no génicas que pueden proporcionar sondas para polimorfismos en mayor cantidad que las provenientes de una genoteca de cDNA, como ha sido demostrado en otras especies.

Construcción de una genoteca parcial en pUC 13

El ADN es extraído a partir de hojas de *S. tuberosum* var. Atlantis mediante el método de CTAB.

* 10 ug de ADN de alto peso molecular se digirieron totalmente con Sau 3A, y 5 ug de pUC 13 se digirieron con Bam HI.

* 4 ug del ADN digerido de *S. tuberosum* y 2 ug del vector se ligaron con 3 unidades de ligasa T4 en un volumen de 100 ul y se incubaron toda la noche a 19°C.

La reacción de ligación se verificó en minigel con los controles adecuados.

Preparación de células competentes, transformación y plaqueo

En diversas reacciones, 200 ul de células competentes JM109 fueron transformadas con 6, 30, 60 y 120 ng de ADN de la mezcla de ligación según protocolos standard.

Las mezclas se plaquearon en placas de Petri conteniendo LB agar, ampicilina, IPTG y X-gal.

El título de la genoteca fue de 1.25×10^3 colonias blancas por ug de ADN de *S. tuberosum*.

96 colonias blancas fueron picadas de las placas y se mantienen ordenadas en LB amp y a -20 °C en glicerol. Estos clones fueron denominados pSt HM.

Hasta el momento se amplificaron 72 de estos clones por el método de minipreparado alcalino. De estos resultaron positivos los siguientes clones evaluados por su migración contra controles después de la linearización:

<u>pSt HM</u>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
					<u>15</u>	<u>16</u>	<u>17</u>			<u>20</u>
			<u>23</u>	<u>24</u>		<u>26</u>	<u>27</u>		<u>29</u>	
				<u>34</u>		<u>36</u>				
	<u>41</u>	<u>42</u>	<u>43</u>		<u>45</u>	<u>46</u>	<u>47</u>	<u>48</u>		
	<u>51</u>		<u>53</u>		<u>55</u>					
	<u>61</u>	<u>62</u>	<u>63</u>		<u>65</u>		<u>67</u>		<u>69</u>	<u>70</u>
	<u>71</u>	<u>72</u>								

(Subrayados los clones recombinantes)

A los efectos de determinar la presencia de secuencias repetidas nucleares y organelares se transfirieron los 96 clones a nitrocelulosa por el método de dot-blot, y se hibridizó contra ADN total marcado con ^{32}P , realizándose los lavados en condiciones de alta y mediana astringencia.

Mostraron marcación aumentada sobre el background de los controles los clones 37, 39, 47, 59, 60, 61, 62, 65, 67, 70, 71 y 72. Todos estos clones mostraron insertos entre 3000 y 250 pb en geles de agarosa.

Los clones 5, 7, 8, 15 y 20 se linearizaron con Hind III y se marcaron con alfa 32 dATP por el método de "multipriming" hibridizándose contra blots con digestiones de *S. commersonii* y *S. tuberosum* var. "Atlantis", var. "Chifton", var. "Kennebec" y var. "Norlan" digeridos con Xho I, Eco RI y Hind III.

En estas condiciones solo se identificó un polimorfismo co EcoRI entre Norlan y las otras variedades con la sonda 5.

Por otra parte, los dot blots utilizados con ^{32}P fueron lavados de la marca mediante hervido durante 5 minutos y re-hibridizados con ADN total marcado con biotina.

Dado que los clones positivos con una y otra técnica no fueron en todos los casos los mismos, estamos en este momento estudiando las posibles fuentes de estas diferencias.

Se continuará con esta aproximación hasta que las sondas preparadas puedan ser utilizadas contra ADN de genomas de plantas provenientes del programa.

Estas deberían corresponder a plantas resistentes y no resistentes a los virus en estudio, provenientes de protoplastos regenerados "in vitro" o por otros procedimientos.

Para una próxima etapa sugerimos la construcción de genotecas de cDNA diferenciales entre poblaciones de mensajeros de variedades sensibles y resistentes, a los efectos de detectar más rápidamente diferencias entre genes de resistencia específicos en variedades con alta homocigosis o cuasi isogénicas, obtenidas por otros grupos del programa.

Construcción de una genoteca genómica en Lambda EMBL 3

Se llevó a cabo una extracción de ADN de 5 g de hojas y tallos de *Solanum commersonii* y se pasó el homogeneizado por gradiente de Percoll, después de lavado, para evitar la contaminación cloroplástica.

La eficiencia de la reacción fue de 20 ug/g de tejido, siendo éste de alto peso molecular y digerible por enzimas de restricción.

Se realizaron digestiones parciales variando la concentración de la enzima *Sau 3A*, hasta seleccionar la adecuada para obtener fragmentos entre 20 y 9 kb. La digestión preparativa se corrió en agarosa de bajo punto de fusión al 0,5%, y el ADN se extrajo del gel.

La mezcla de ligación contuvo 0,4 ug de ADN de *S. commersonii* y 1 ug de "brazos" de Lambda EMBL 3 digerido con *Bam HI*, con buffer y 9 U de ligasa en un volumen de 10 ul.

Una vez chequeados en agarosa los productos de ligación, se empaquetaron 500 ng de la mezcla "in vitro" de acuerdo al protocolo de Gigapack (Stratagene).

La titulación de la genoteca dio como resultado la obtención de 5×10^4 pfu/ml, lo que representa, para un inserto promedio de 15 kb, unos 0.75×10^6 pb clonados de un genoma de aproximadamente 1 pg de ADN, lo que a su vez equivaldría, en condiciones ideales, al 75% del genoma de *S. commersonii*.

El análisis del ADN proveniente de fagos de esta genoteca con la enzima de restricción *Sal I* confirmó la presencia de insertos en el 80% de los 16 clones analizados al azar.

Proponemos completar la genoteca utilizando también como vector el fago EMBL 3.

Búsqueda de minisatélites hipervariables en el genoma de la papa

Los minisatélites hipervariables fueron primero detectados como racimos de secuencias dispersas repetidas en el genoma de los vertebrados.

En diferentes individuos cada locus contiene diferente número de repetidos de la unidad básica, por lo tanto, una enzima de restricción (cuyo sitio de reconocimiento no se encuentre dentro de la secuencia repetida) liberará fragmentos de diverso tamaño conteniendo este tipo de secuencias originarias del mismo locus cromosómico.

Cuando el ADN digerido con estas enzimas es separado en geles de agarosa, transferido y expuesto a una sonda hipervariable marcada, cada individuo mostrará un patrón de bandas diferente, tanto en peso molecular como en intensidad.

Este tipo de bandas es tan específico de cada individuo que es llamado "huella digital" del ADN.

Su utilidad en medicina legal es obvia, y se ha sugerido su aplicación potencial como fuente de sondas para RFLP's, desde el momento que permite buscar polimorfismos de decenas de sitios del genoma al mismo tiempo.

En setiembre de 1988, Palla; demostró (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (95), 6831-6835) que el genoma de arroz contiene regiones hipervariables del tipo descrito para vertebrados que pueden ser detectadas con sondas hipervariables humanas.

La distribución e intensidad de estas bandas resultó ser específica de cada cultivar, y se sugirió la posibilidad de su utilización como marcadores para genes codificantes para características importantes en selección.

Teniendo en cuenta estos resultados, iniciamos la búsqueda de estas secuencias en el genoma de la papa.

Digerimos ADN total con las enzimas de restricción Dra I y Hae III en presencia de espermidina 4mM y separamos los fragmentos obtenidos en geles de agarosa 0.8% de 20 cm de longitud.

La electroforesis duro hasta que los fragmentos menores de 1.5 kb de longitud escaparon del gel, lo cual tomó aproximadamente 36 horas a 2 V/cm. Posteriormente los geles fueron depurinizados en HCl 0.25 M y bloteados a membranas Z-probe mediante transferencia alcalina.

Las membranas fueron entonces lavadas 3 veces en agua destilada, y prehibridizadas 6 horas a 65 °C en 1 X SSC conteniendo 1% (p/v) de leche en polvo. Posteriormente se hibridizaron contra la sonda hipervariable humana 33.6 (gentilmente cedida por el Dr. A. Jeffreys) marcada por el método de multipriming con ³²P dGTP en 1 ml de solución fresca cada 10 cm² de filtro.

Las membranas fueron entonces lavadas 3 veces (1 hora cada lavado) a 65 °C en 1 X y 0.5 X SSC conteniendo 0.1% SDS; y se expusieron 7 días a -70 °C usando pantalla intensificadora.

Se observaron bandas positivas claras en la zona entre 1.5 y 4 kb en las digestiones de *S. tuberosum* var. *Atlantis* con la enzima Hae III.

En estos momentos estamos tratando de estandarizar los procedimientos a fin de detectar la existencia de este tipo de secuencias en otras variedades de papa, estudiar el grado de polimorfismo existente, resolver cuales enzimas de restricción son mas útiles y en qué rango de peso molecular se observa la mayor cantidad de bandas.

Aún cuando estos resultados no son conclusivos, pensamos que este tipo de aproximación podría ser muy útil para el programa a fin de testar el grado de isogenicidad de líneas de papa, y posible ligamiento de genes de resistencia con las bandas hipervariables que se detecten.