



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

19126

é p

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

Contrato No. 88/67

**Proyecto: Resistance to virosis in potato development
of potato plants bearing resistance to potato virus
PVX, PVY, PVS and PRLV by combined molecular and
in vitro plant culture techniques**

Primer Año de Actividades

País: Colombia

Segundo Informe Técnico



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPENDENCIA

UNIDAD DE BIQUIMICA

Lab. 411

OFICIO No.

Bogotá, Mayo 3 de 1990

Doctor
RODOLFO QUIJERO
Coordinador UNIDO
Ciudad de Mexico
Mexico

Apreciado Dr. Quintero:

Le estoy escribiendo con el proposito de continuar la comunicaci3n establecida entre Ud. y el Dr. Jos3 Peñaranda V. en relaci3n con el 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" Lo anterior lo hago en atenci3n a que el Dr. Peñaranda se encuentra en una pasantía internacional en el Instituto Pasteur de Paris y aunque Ud. ha requerido de él una mayor precisi3n en el informe de actividades del proyecto. Como coinvestigador del Dr. Peñaranda en los proyectos de virus de papa espero satisfacer su requerimiento.

Revisando el documento titulado: Términos de referencia para la participaci3n de la secci3n de bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, las actividades a ser ejecutadas son:

- a) Purificaci3n del virus del enrollamiento de la hoja de papa (ILW).
- b) Producci3n de anticuerpos policlonales contra el ILW.
- c) Purificaci3n del genoma del ILW.
- d) Infecci3n de protoplastos in vitro con ILW.
- e) Entrenamiento de un miembro del grupo.

De las anteriores actividades, se han cumplido completamente las correspondientes a la purificaci3n del PLRV (a) y al entrenamiento de un miembro del grupo (e), y solo parcialmente la infecci3n de protoplastos in vitro con PLRV (c).

1- Durante el cumplimiento de la actividad de purificación del PLRV se usó básicamente el método de purificación de Takamami y Kubo (J. Gen. Virology 44, 153-159, 1979). Hojas frescas o previamente congeladas de Physalis floridana o de papa infectadas con PLRV fueron utilizadas como fuente del virus. Las plantas de papa infectadas con PLRV fueron recolectadas en el campo de acuerdo a su sintomatología y sus reacciones con antisueros preparados contra PVX y PLRV en un test de ELISA. El kit de ELISA para detección de PVX fue preparado en nuestro Laboratorio, mientras que el anticuerpo y el conjugado contra PLRV fueron obtenidos del Scottish Crop Research Institute. Las plantas de Physalis floridana fueron infectadas mediante transmisión con áfidos y la presencia del virus detectada con anticuerpos dirigidos contra PLRV obtenidos por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) por donación del Centro Internacional de la Papa (CIP). Las hojas infectadas fueron maceradas en una relación de 500 g en un litro de buffer de citrato de sodio 0.1 M, pH 6.0 que contenía 0.5% de 2-mercaptoetanol y 2 % de Celluclast (Celulasa), seguido de incubación y agitación suave durante 3 horas a 25°C. Después de esta incubación, el extracto fue ajustado a pH 7.0 añadiendo 0.2 M de Na₂PO₄ y luego emulsificado con 0.67 Vol. de una mezcla de cloroformo / butanol (1:1 v/v). Esta emulsión fue centrifugada a 5000 RPM por 15 min. en el rotor SS34 de una centrifugadora SORVALL. La fase acuosa fue precipitada mediante la adición de polietilenglicol (PEG) al 8% y NaCl 0.2M. Después de agitación por 1 hora a 4°C se incubó a temperatura ambiente (25°C) durante 2h para luego ser centrifugado a 12.000 g por 15 min en la centrifuga SORVALL. El precipitado fue resuspendido en 100 ml de 0.02 M de buffer de fosfato de sodio, pH 7.5, que contenía 1% de Triton x-100 y luego centrifugado a 10.000g durante 15 min. El sobrenadante fue centrifugado a través de un colchón de sacarosa (5 ml) de 20% en un rotor 50.2 Ti a 50.000 RPM a 15°C. El precipitado fue resuspendido en buffer fosfato y centrifugado a 10.000g por 15 min. El sobrenadante fue sometido nuevamente a otro ciclo de alta y baja centrifugación como se indicó antes y la suspensión viral final (2 ml en buffer de fosfato) fue centrifugada en un gradiente de sacarosa de 10-40% en 6.0M de fosfato de sodio, pH 7.6, durante 2h a 40.000 RPM en el rotor SW 65 a 15°C. El gradiente fue fraccionado con colector Fraccionia y analizado a 260 nm. Las fracciones que incluían el virus fueron reunidas, diluidas 3 veces con buffer de fosfato y centrifugados a 100.000g durante 2.5 h. El sedimento viral fue resuspendido en 1 ml de buffer de fosfato y almacenado a -25°C.

2- Infección de protoplastos de tabaco con PLRV. plantas de Nicotiana glauca va. Xanthi fueron crecidas en cabinas controladas en las condiciones descritas por Kubo et al. (J. Gen. Virology 28, 255-257, 1975). Las plantas fueron cultivadas entre 15 a 20°C por 35 días en un invernadero y luego fueron transferidas a una cabina a 25°C durante 12 horas y con una iluminación de 10.000 lux, con un periodo alter-

nante de 12 horas de oscuridad a 20°C. En esta cabina permanecieron por 35-45 días antes de ser usados.

Los protoplastos del mesofilo fueron aislados mediante el procedimiento enzimático de 2 pasos descrito por Kubo et al (1975). La epidermis inferior fue removida con pinzas y los trozos (4cm² aprox.) de 2 hojas fueron infiltrados con 25 segundos con 30 ml de solución de maceración (0.25% w/v macerocyte R-10, 0.5% w/v dextran sulfato de potasio, 0.7M de Manitol pH 5.8 ajustado con 0.05M de HCl). La mezcla fue agitada a 25 °C reciprocamente a 120 excursiones por minuto. Después de 3 min. la solución fue descartada y se agregaron 30 ml de medio de maceración fresco. La agitación fue continuada por 7 min. más. Después de remover la solución y lavar con 0.7M de manitol, los trozos de hoja fueron incubados en 40 ml de solución de maceración fresca y agitados durante 40-50 min. Las células liberadas fueron filtradas a través de dos capas de gaza y centrifugadas 1 min. a 600 RPM (Centrifuga de mesa MSE). Las células aisladas fueron resuspendidas en 50 ml de solución de celulasa (celulasa Onozuka 1% w/v, manitol 0.7M, pH 5.4, ajustado llevando primero a pH 8.0 con KOH 0.05M y luego a pH 5.4 con HCl 0.05M). La mezcla fue agitada suavemente (30 excursiones por min) por 40-50 min a 35°C y los protoplastos liberados fueron filtrados a través de dos capas de gaza y lavados tres veces por centrifugación a 600 RPM por min y resuspensión en 0.7M de Manitol.

Los protoplastos fueron inoculados con PLRV usando el método indirecto descrito por Baker and Harrison (J.Gen. Virology 35, 125-133, 1977). Diez ml de solución de manitol que contenía 2 ug/ml de virus, 2ug/ml de poli-L-ornitina (PIO) y 0.05M de fosfato de potasio, pH 6.0, fueron incubados por 10 min a temperatura ambiente. Muestras de 10⁶ protoplastos fueron centrifugadas, resuspendidas en 10 ml de manitol e inmediatamente mezclados con la mezcla de virus y PIO. La suspensión de conservó a temperatura ambiente por 10 min y luego fue centrifugada a 600 RPM por 1 min. El precipitado de protoplastos inoculados fueron lavados tres veces en 0.7M de manitol que contenía 0.1M de CaCl₂. Los protoplastos inoculados fueron resuspendidos en el medio de cultivo descrito por Aoki y Takebe (Virology, 39, 439-448, 1969): 0.2 mM KH₂PO₄, 1mM KNO₃, 1 mM MgSO₄, 10 mM CaCl₂, 1 mM KI, 0.01 mM CuSO₄ y 400 ug/ml de Carbenicillin, pH 5.4, ajustado con 0.05 M HCl, y esterilizado por filtración a través de membranas de Millipore (0.45 um). Los protoplastos inoculados fueron incubados en una cabina controlada a 20°C con iluminación constante a aproximadamente 3700 lux.

La viabilidad de los protoplastos fue establecida por su capacidad de captar e hidrolizar diacetato de fluoresceína para liberar fluoresceína. (Widholr, Stain Technology 47, 189-194, 1972). Una solución madre de 5mg/ml de diacetato de fluoresceína en acetona fue diluida 50 veces en manitol 0.7M y se mezcló con un volumen igual de suspensión de protoplastos en medio de cultivo. Después 5-10 min la proporción de pro-

toplastos que contenía fluorescencia fué determinada en un microscopio equipado con una lámpara de U.V.

La evaluación de la producción de virus en los protoplastos fue llevado a cabo mediante el test de DAS-ELISA, usando anticuerpos contra PLRV conjugados con fosfatasa alcalina. A diferentes tiempos después de la inoculación se tomaron muestras de protoplastos, los cuales fueron centrifugados y luego homogenizados en PBS/Tween. Los homogenizados fueron analizados tal como lo describe Clarck and Adams (J. Gen. Virology 34, 475, 1977).

Comentarios sobre los resultados obtenidos:

Durante los primeros experimentos de purificación del PLRV se encontraron dificultades en la obtención de cantidades suficientes de virus debido a la carencia de la celulasa (Ver Primera Versión del Informe). Con el uso de la celulasa, la cantidad de virus purificado obtenido se incrementó a 0.3 - 0.5 mg/kg, tanto en papa como en Physalis floridana. Además fue posible observar en el microscopio electrónico las partículas virales icosaedricas usando tinción negativa con ácido fosfotungstico ajustado a pH 6.5 con KOH. El espectro presentado fué típico de nucleoproteína, encontrándose una relación de $A_{260}/A_{280} = 1.80$. La partícula viral disociada con SDS y analizada en SDS-PAGE con el método discontinuo de Laemmli Nature, 227, 680, 685, 1970) presentó una banda mayor alrededor de 27-28 KDa y ocasionalmente una banda menor alrededor de 16 KDa, cuando se usaron como marcadores de peso molecular Albúmina de suero bovino (66 KDa), Ovoalbúmina (45 KDa), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (36 KDa), Anhidrasa carbónica (29 KDa), tripsinógeno tratado con PMSF (24 KDa), inhibidor de tripsina (20 KDa), y lactoalbúmina (14,2 KDa). El peso molecular de la proteína mayor (28 KDa) estructural determinada en este aislamiento está íntimamente relacionada con el peso molecular reportado para la cubierta proteica de PLRV (Rowhani and Smith, Virology 98, 45, 1979). Aunque el porcentaje de protoplastos infectados con PLRV no fué determinado por carecer en el momento de anticuerpos marcadores con FITC. La curva de crecimiento determinada como el método de ELISA indicó un

incremento del antígeno viral con el tiempo después de la inoculación. A tiempo 0 horas p.i. se obtuvo 52 ng/10⁶ protoplastos; a 24 horas p.i. 12.3 ng/10⁶ protoplastos; 25 ng/10⁶ protoplastos; 48 horas p.i., 510 ng/10⁶ protoplastos. Sin embargo, análisis de los extractos de protoplastos en SDS-PAGE no reveló proteínas específicas asociadas a la infección viral. Un análisis bidimensional (IEF/SDS-PAGE) de estos mismos extractos realizados en las condiciones descritas por Acosta and Mayo (Intervirology, 1989, in press) tampoco mostró proteínas específicas asociadas a la infección después de la tinción con nitrato de plata y comparación con las proteínas de protoplastos inoculados solamente con PLO ("mock protoplasts"), por el contrario se observó una aparente disminución de polipeptidos con coordenadas de 45-50- kDa/ 5-55 pI. El objetivo siguiente es el de inoculación de protoplastos de hoja de papa con el PLRV.

La purificación del genoma del PLRV no se ha podido realizar por la limitación con la cantidad de virus purificado en el momento, principalmente debido a que la nueva siembra de papa en el campo tuvo lugar hace dos meses. Además inoculadas de P. floridana mediante áfidos solo fueron realizadas hace dos semanas. Con la disponibilidad del método de purificación del virus se espera cumplir con este objetivo rápidamente. El objetivo de preparación del anticuerpo correspondiente también ha sido impedido por la poca cantidad de virus disponible. Los conejos inoculados necesitan inyecciones adicionales de antígeno para llevar los títulos. El título obtenido hasta el momento en un conejo es de 32, determinado con la técnica de doble difusión en agar.

El objetivo de acompañamiento de una persona del grupo fue cumplido en el viaje del Dr. Pedraza a Cuba, donde tuvo la oportunidad de asistir al Congreso Internacional (III SEMINARIO CUBANO E INTERNACIONAL SOBRE INGENIERÍA - II SEMINARIO CUBANO E INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGÍA - I CONGRESO IBEROAMERICANO SOBRE BIOTECNOLOGÍA, Palacio de Convenciones 17-22 de abril de 1989. La Habana, Cuba, y visitar va

rios centros de la isla donde se trabaja en Biotecnología particularmente con métodos de detección de virus de plantas.

Dentro del informe financiero puedo señalar que se utilizaron los primeros US\$10.000 dólares discriminados así. Construcción de un cuarto con temperatura, humedad y fotoperiodo controlados (US\$ 4.166), compra de una microcentrifuga Beckman (US\$ 4.370) y pasajes y viáticos por el viaje del Dr. Peñaranda a Cuba (US\$ 1.464).

En el momento, la ejecución de las actividades no terminadas requiere indispensablemente de una financiación adicional, principalmente para la adquisición de radioisótopos para seguir la infección de los protoplastos con el PLRV (32 P para marceje de cDNA y 35 S-L-metionina para seguir las proteínas específicas asociadas a la infección de los protoplastos).

Espero haber complementado un poco el informe inicial presentado por el Dr. Peñaranda y de esa manera satisfacer su requerimiento en orden a reunir las condiciones que permitan la continuidad de la financiación de UNIDO.

Atentamente,



GERARDO ANCOCHEA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional