



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

19500

9/10/90

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.**

PERIODO: ABRIL-OCTUBRE DE 1990

En la reunión de organización del del segundo año del proyecto que se realizó en Irapuato, Gto. México en Marzo de 1990, se programó para el CINVESTAV-Irapuato, las actividades 3.3 y 3.4.3. A continuación se desgloza el informe de lo realizado en los primeros seis meses:

Actividad 3.3 Construcción de genes quiméricos de resistencia a virus:

PVX

El gen de la proteína de la cápside del PVX (CP-PVX) recibido del grupo colaborador argentino, fué amplificado por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando la enzima termosensible Taq y dos oligonucleotidos sintetizados en base a las secuencias publicadas del virus. Aunque este gen cuenta con todas las señales para expresarse adecuadamente en la planta, no tenía sitios de restricción que lo hicieran facilmente manipulable. El oligonucleótido del extremo 5' (25 bases: GCGGTTAAGTTTCCATCGATAAATTG) introduce un sitio ClaI (subrayado) para dirigir su clonación en la orientación adecuada. Al oligo del extremo 3' (30 bases:ATTTATATTATTCATACAATCAAACCAGAA)

no se le añadió ningún sitio nuevo puesto que se contempló subclonarlo como extremo rasurado. El tamaño del oligo 3' es mayor porque esta región del gen tiene un alto contenido de A-T, lo que disminuye la estabilidad de oligos pequeños.

La amplificación se hizo incubando el plásmido original enviado por el laboratorio de Esteban Hopp, los oligos antes mencionados y la enzima Taq (con su respectivo buffer y deoxinucleótidos). El uso de la enzima termosensible (Taq) nos facilita el proceso puesto que no hay que agregar enzima (DNA polimerasa) después de cada ciclo. Cada ciclo consistió de una incubación de 1 min. a 95 C para abrir la doble cadena, 1 min a 37 C para permitir el apareamiento de los oligos con el plásmido y 3 minutos de incubación a 70 C para permitir la síntesis y extensión de los oligos (primers). El proceso (ciclo) se repitió 25-30 veces y el resultado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Al teñir con bromuro de etidio, se observaba una única banda de aproximadamente 840 pb. Esta banda fue rescatada del gel y purificada por el método de GENCLEAN. El material purificado fue ligado en un plásmido Bluescript (BS) previamente digerido con SmaI (extremos rasurados), y este material se usó para transformar *E. coli*.

NOTA: Hay que hacer notar que las ligaciones del material amplificado por PCR han presentado ciertos problemas. Originalmente intentamos cortar los fragmentos amplificados con las enzimas correspondientes a los sitios introducidos (en este caso ClaI), sin embargo, la digestión aparenta ser muy deficiente. Puede ser que el sitio de restricción este muy cerca del extremo y no haya un reconocimiento apropiado. También se ha intentado aumentar el porcentaje de ligación, aumentando la concentración de ligasa, quitando los sitios 5' del fragmento amplificado, o rellenando con Klenow para asegurar verdaderos sitios rasurados. Esta última opción fue la que nos produjo mejores resultados.

Las colonias con el plásmido BS sin inserto toman un color azul en presencia de XGal + IPTG debido a la actividad de B-galactosidasa. Plásmidos con insertos interrumpen el gen que proporciona la B-galactosidasa y se ven blancas en el medio anterior.

Las colonias que resultaron blancas en las placas de Lb-Amp-XGal + IPTG fueron tomadas como posible candidatos con insertos conteniendo el gen CP-PVX. Un segundo escrutinio se hizo por medio de hibridación molecular de las colonias (colony hybridization) usando como sonda el gen original de CP-PVX. Se probaron 40 colonias y las que dieron una señal fuerte de hibridación (en la autoradiografía) fueron analizadas haciendo mini preparaciones de plásmidos y mediate mapeo de restricción. Se seleccionó una colonia que contenía un plásmido (que se denominó pIGV15) que mostró los sitios de restricción requeridos (especialmente el sitio ClaI que se introdujo). Para comprobar que durante la amplificación no se introdujeron mas cambios en el gen, se procedió a secuenciar el fragmento en el plásmido pIGV15. El plásmido BS cuenta con un origen de replicación del ϕ x y presenta la facilidad de poder generar DNA de cadena sencilla por medio de una infección con un fago auxiliador. La cadena sencilla se usó como templado en reacciones de secuenciación del tipo Sanger (dideoxyribonucleotidos). El análisis de la secuencia mostró que no hubo otras alteraciones internas. Sin embargo, sorpresivamente se perdieron las primeras 4 bases del oligo 3' (es decir, las últimas 4 bases del fragmento). Aunque esto no afecta el gen de manera alguna puesto que está fuera de la región codificante, esta pérdida de bases puede ayudar a explicar los problemas presentados durante la ligación. Por otro lado, este evento, sirve para llamar la atención durante el diseño de oligonucleotidos para usarse en la amplificación de genes. Es recomendable seleccionar regiones fuera del gen estructural para que en caso de perdidas de bases, no se afecte la proteína esperada.

Una vez que se verificó la calidad del gen, se subclonó en el plásmido pMON858 para obtener su expresión en plantas. Este plásmido cuenta con el promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) para asegurar una expresión constitutiva y fuerte en todos los tejidos de la planta. Del plásmido pIGV15 se obtuvo un fragmento ClaI-EcoRI que contenía el gen CP-PVX y se ligó con el plásmido pMON858 previamente cortado con las mismas enzimas. Después de la transformación con los productos de la ligación, de entre varias colonias candidatas, se seleccionó aquel que contenía el inserto adecuado. Puesto se esperaba un plásmido (derivado de pMON858) de alto peso molecular (11-12000 pb) y que se encuentra en bajo números de copias por células, el análisis por medio de mapeo de restricción presentaba problemas. Para comprobar si el gen en verdad se encontraba insertado en el vector, se recurrió de nuevo a la técnica de PCR. Varias colonias candidatas fueron tomadas y llevadas a un tubo eppendorf individualmente. Las células fueron calentadas a 95°C por 5-10 minutos, se enfriaron en un baño con hielo y enseguida se les añadieron las mezclas de reacción incluyendo los oligonucleótidos mencionados arriba. Los productos fueron analizados por electroforesis en agarosa y 2 de 4 colonias mostraron el fragmento amplificado indicando que esas colonias tenían el gen CP-PVX. Se seleccionó un plásmido (pMON858 + CP-PVX) y se denominó pIGV16.

En estos momentos se está transfiriendo este plásmido (pIGV16) a *Agrobacterium tumefaciens* para ser usado para infectar explantes de papa.

PVY

El gen de la proteína de la cápsida del virus PVY se amplificó/mutagenizó por medio de la técnica de PCR descrita arriba. Los oligos sintetizados para la amplificación fueron:

- a) Extremo 5', 30 bases: TGAGGATCCCAATATGGCAAATGATACAAT, el cual introduce un sitio BamHI (subrayado) y el codón de iniciación ATG (doble subrayado) para permitir su adecuada expresión;
- b) Extremo 3', 25 bases: CGTGAATTCCTTATATATCGTCCGGA, el cual introduce un sitio EcoRI para facilitar su manipulación.

La amplificación se hizo en forma simultanea al CP-PVX, lograndose recuperar un fragmento con el tamaño adecuado (ca. 830 pb). Sin embargo, debido a los problemas de ligación referidos arriba no se pudo clonar en el plásmido BS. En esos momentos se decidió concentrarse en un solo gen y se escogió el CP-PVX como ya se describió. Ahora que el CP-PVX está listo para introducirse a plantas, se ha podido reenfocar la atención al CP-PVY. Se hizo otra amplificación por PCR con resultados bastantes satisfactorios y en estos momentos se estan estableciendo las condiciones para la ligación del fragmento amplificado en el plásmido BS y de ahí pasarlo a pMON858.

NOTAS ADICIONALES A LA ACTIVIDAD:

Tambien se ha recibido del laboratorio de Esteban Hopp otras clonaciones de genes de los virus PVX y PVY. Algunas venian en *E. coli* y se está obteniendo DNA para introducirlo a *A. tumefaciens* e infectar explantes de papa.

Por otro lado se esta trabajando en la construcción de un vector mejorado que contenga un doble promotor 35S del CaMV (promotor 70). El vector original (pSS) no tiene un buen sitio de clonación multiple ya que solo se puede usar EcoRI y SmaI, por lo que se están eliminando algunos de los sitios dobles para aumentar el número de sitios únicos y tener mas variedad en la estrategia de clonación. Este vector presentará tambien la posibilidad de manejar el gen de interés, mas las señales para expresión de plantas (promotor y terminador), como un "cassette" que puede manipularse facilmente e introducir varios genes virales al mismo tiempo. Esto nos evitaría tener que hacer varias

transformaciones (una para cada gen), pudiendo introducir dos o tres genes virales en un mismo evento (CP-PVY + CP-PVX).

Actividad 3.4.1 Adaptación de las técnicas de transformación a cultivares locales de papa.

Desde que se inició el proyecto nosotros hemos estado trabajando con la variedad de papa Alfa, ya que es la que mas se consume en México. A la fecha ya se han encontrado las condiciones de regeneración y transformación de esta variedad aunque la eficiencia no es tan buena como la variedad Desiré que se ha usado como control. De esta manera, el reporte del primer año incluía la adaptación de las técnicas de transformación a nuestra variedad local Alfa. A partir de la reunión de organización del segundo año del proyecto, se envió a todos los países participantes un protocolo de la metodología establecida con la intención de que cada país la adaptara a sus variedades locales. En este mismo contexto está por llegar un visitante argentino que vendrá por un tiempo para familiarizarse de manera directa con nuestras técnicas de transformación de explantes (hoja) de papa.

A continuación se presenta un breve resumen del protocolo que se ha seguido en los experimentos de cultivo de tejidos y transformación de papa.

Propagación del material

Se ha trabajado con las siguientes variedades: variedad Desirée, obtenida del Instituto Max Planck de Cclonia; variedad Russet Burbank, obtenida del Centro Internacional de Papa, Lima, Perú y la variedad Alfa de uso local.

Para evitar en lo más posible tener variación somaclonal, las plantas han sido solo propagadas mediante meristemos, de las siguientes dos maneras:

1) Cortando el ápice (1-2 cm), al cual se le quitan las hojas y resemebrandolo.

2) Pesembrando los internodos cortados en segmentos de aproximadamente 1 cm de largo. Se espera a que las llemas se desarrollen, se cortan las plantas regeneradas y estas se vuelven a resementar.

Las resiembras se hacen, en medio MS + 0.7% agar + 2 % sacarosa, cada 15-25 dias cuando las plantas ya hayan echado raices.

Cocultivo para la transformación

Para infectar los explantes se ha usado una cepa de *A. tumefaciens* que contiene el gen de la glucuronidasa (GUS) dentro de su T-DNA. 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 seleccionando las hojas mas vigorosas y colocandolas con 10 ml de MS liquido y 30-70 ul del cultivo de bacterias. El tiempo de cocultivo es de 48 hrs a 26°C.

Regeneración de los explantes transformados y enraizamiento

Al terminar el cocultivo los explantes se transfieren al medio de regeneración (MS + agar + glucosa + zeatina + antibioticos). Los explantes se transfieren a medio fresco cada semana.

Cuando los brotes alcanzan una talla de 1 o 2 cm se cortan y se ponen en medio de enraizamiento (MS + agar + sacarosa + claforán). 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 GUS y análisis por hibridación molecular).

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.**

PERIODO: NOVIEMBRE 1990 - ABRIL 1991

En la reunión de organización del segundo año del proyecto que se realizó en Irapuato, Gto. México en Marzo de 1990, se programó para el CINVESTAV-Irapuato, las actividades 3.3 y 3.4.3 del proyecto original propuesto en Buenos Aires, Argentina. A continuación se desglosa el informe de lo realizado en el segundo semestre:

- ACTIVIDAD 3.3 Construcción de genes quiméricos de resistencia a virus:
ACTIVIDAD 3.43 Transformación de células de papa con los genes quiméricos.

PVX

El plásmido pIGV16 (descrito en el reporte anterior) que contiene el gen de la proteína de la cápside de PVX con el promotor 35S del CaMV fué transferido a *A. tumefaciens* por medio de electroporación. Las bacterias transformantes se seleccionaron en presencia del antibiótico Spectinomycin. Para verificar si en realidad las colonias que crecieron en el medio con antibiótico contenían el plásmido, se hizo un ensayo de hibridación en colonia usando como sonda el gen CP-PVX original. El 100 % de la colonias dieron señal positiva, confirmando la presencia del gen dentro de *A. tumefaciens*. Se seleccionó una de estas bacterias y con ella se procedió a infectar explantes de papa (variedad alfa) y de tabaco.

Se usa tabaco por la facilidad en la transformación, y la rapidez con que se obtienen plantas transgénicas. Esto es muy recomendable para poder verificar la funcionalidad de las construcciones nuevas, y ver los

niveles de expresión obtenidos. Asimismo, ya que el virus PVX infecta a tabaco, se pueden ver los niveles de protección que nuestra construcción ofrece. Hacerlo únicamente con papa pudiera tomar mucho más tiempo en caso que se tuviera que modificar las construcciones para aumentar la expresión del nuestro gen de interés.

Como ya se mencionó en reportes anteriores, los pasos necesarios para obtener plantas (en suelo) para iniciar los ensayos de resistencia, toman varios meses (desde el cocultivo de los explantes, inducción de callos, inducción de brotes y raíces hasta la transferencia a suelo).

Se obtuvieron varias plantas de tabaco que han resistido en varios ensayos con Gentamicina (el pIGV16 es derivado del pMON858 que contiene el gen marcador ACC-IV que confiere resistencia a Gentamicina por medio de una reacción de acetilación). A continuación se procedió a hacer los ensayos tendientes a verificar la expresión del gen CP-PVX.

Desafortunadamente no se pudo encontrar expresión en ninguna de las plantas transformadas. En vista de los resultados negativos se decidió revisar las construcciones obtenidas y en un análisis de secuenciación se vio que la clona utilizada y obtenida por PCR contenía una mutación en el codón de iniciación ATG (ver figura anexa de la secuenciación). El error se pudo seguir y la explicación que tenemos en este momento es que cuando se clonó el CP-PVX por medio de PCR, se seleccionaron dos colonias que se manejaron indistintamente por error. Una se secuenció y estaba normal. Sin embargo, la segunda tenía la mutación antes mencionada y fue la que se introdujo en *A. tumefaciens*.

Este inconveniente nos hizo perder bastante tiempo y se han tenido que repetir las construcciones usando ahora la clona verificada. También se está cambiando un poco la estrategia ya que los resultados que se habían obtenido con las construcciones derivadas del pMON858 (con resistencia a Gentamicina) no han sido del todo aceptables, no solo en el caso de papa, sino de tabaco también. Las construcciones se están haciendo ahora en un plásmido (pSS) que contiene un promotor doble 35S del virus mosaico de la coliflor. Esto asegurará una expresión más alta del gen viral. Además, el plásmido contiene el gen Neomicin fosfotransferasa II (NPT II) que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, el cual es más confiable y fácil de verificar. Para esto se digirió el plásmido pIGV15

(pBluescript + CP-PVX) con ClaI-EcoRV o con ClaI-SmaI y se clonó entre los sitios ClaI y SmaI. del pSS.

PVY

El gen de la proteína de la cápside del virus PVY se amplificó y mutagenizó por medio de la técnica del PCR como se describió en el reporte anterior. El primer intento de clonación fracasó debido a problemas en la ligación del fragmento amplificado. La nueva amplificación produjo bastante material y se está procediendo a clonarse en el plásmido pSS con el doble promotor 35S del CaMV.

Alternativamente se está usando una construcción proporcionada por Esteban Hopp denominada pMRKAP y que contiene el gen de la proteína de la cápside de PVY.

La metodología para la transformación de papa se ha aplicado eficientemente a la variedad Alfa. Esta variedad es importante para México ya que representa hasta el 70% de la papa consumida en el país. Así mismo se han proporcionado protocolos a los otros países participantes para que la adapten a las variedades locales. En el caso de la Argentina se recibió la visita de Mariana del Vas para entrenamiento en la transformación de papa y su adaptación a las variedades argentinas (ver Entrenamientos).

Con la construcción pMRKAP se han hecho varios experimentos de transformación con la variedad Alfa de papa. En un intento para optimizar las condiciones de transformación se han hecho cocultivos de los explantes de papa con *Agrobacterium* (conteniendo pMRKAP) con dos tiempos de exposición (incubación): 24 y 48 horas. La inducción de brotes es ligeramente superior cuando los explantes se dejan en contacto con la bacteria por 48 horas (antes de pasar a medio con antibiótico para eliminar *Agrobacterium*). Esto puede atribuirse a que la bacteria pasa más tiempo en contacto con las células vegetales y puede infectar a un número mayor. En cada experimento se ha empezado con alrededor de 1000 explantes. En las fotografías adjuntas se puede observar la producción de brotes en ambas condiciones (24 y 48 horas). Estos brotes ya han sido pasados a un medio selectivo para la inducción de raíces en presencia de kanamicina. La apariencia de la mayoría de los brotes que han sobrevivido

es bastante buena, aun cuando se han mantenido en presencia del antibiótico. Esto nos sugiere que dichos brotes estan transformados. En cuanto muestren la formación de una buena raiz, los brotes serán pasados a macetas (suelo) para poder efectuar las pruebas de resistencia al virus PVY. Adicionalmente se seleccionarán algunas plantas para ser analizadas en ensayos tipo Southern para verificar la presencia del gen viral en el genoma de la planta y ensayos tipo Northern para verificar su expresión. Definitivamente el ensayo biológico es el mas validero para nuestros propositos, sin embargo conviene tener una idea de la expresión del gen viral, asi como de su número de copias.

Es necesario mencionar que se han usado dos tipos de explantes para la transformación, tallo y hoja. Ambos son eficientes, sin embargo tallo es mucho mas facil de manejar y no es tan delicado como los explantes de hoja. De esta manera se ouede decir que finalmente la eficiencia de tallo es mucho mejor.

Entrenamiento y Capacitación técnicos.

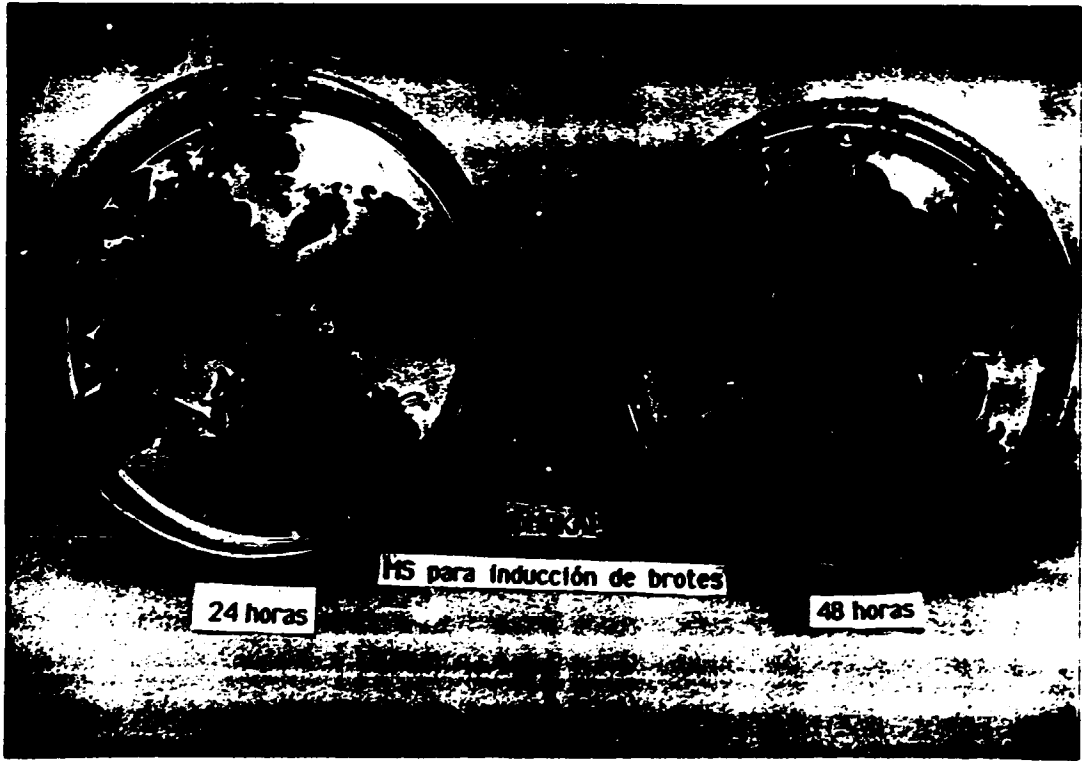
Se recibió la visita de Mariana del Vas del laboratorio de Esteban Hopp (Argentina) por casi tres meses. Durante su estancia utilizó la metodología desarrollada para la transformación de las variedades Desireé y Alfa y la aplicó a 2 variedades argentinas (una de ellas Spunta). Los resultados preeliminares que obtuvo aqui fueron prometedores y se espera que a su regreso a Argentina se establezca la transformación de dichas variedades.

Al mismo tiempo estuvo trabajando en la clonación del gen de la proteína de la cápside del virus PLRV. Sus resultados serán reportados por el laboratorio argentino.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
LIBRARY
540 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637
TEL: 773-936-3000
WWW.CHICAGO.EDU

UNIVERSITY OF CHICAGO

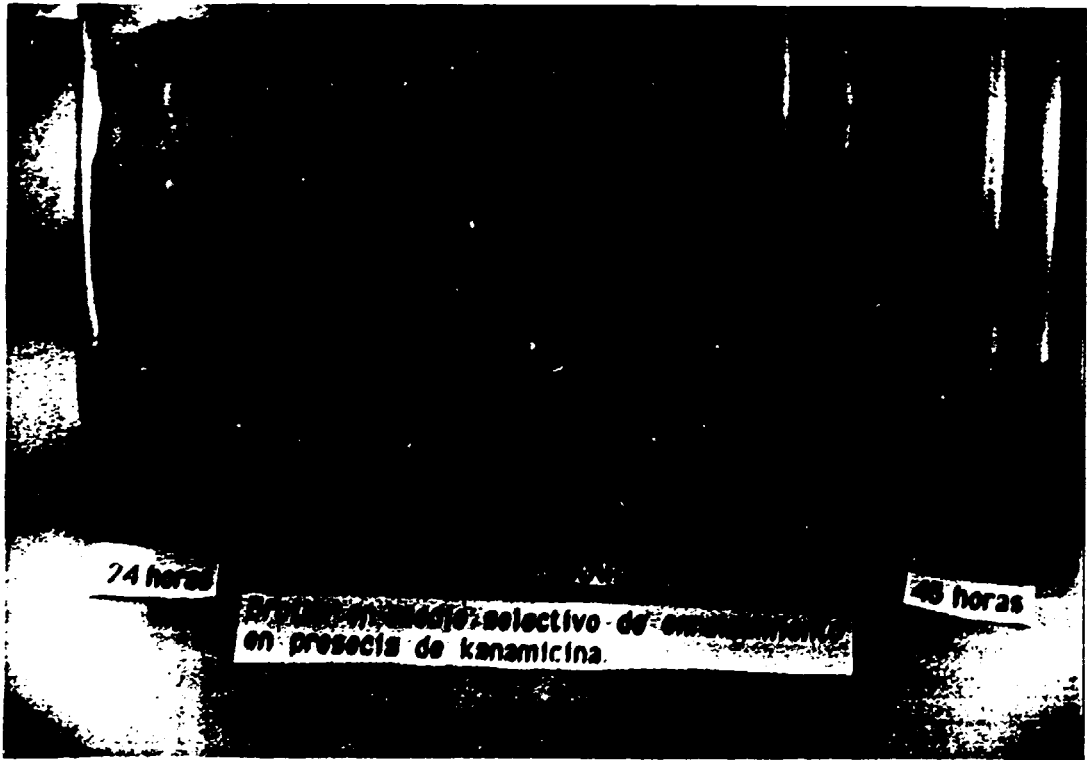
UNIVERSITY OF CHICAGO



24 horas

MS para inducción de brotes

48 horas



24 horas

Brotos de algas: selectivo de emulsión
en presencia de kanamicina.

48 horas