



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50<sup>th</sup> 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](mailto:publications@unido.org) for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at [www.unido.org](http://www.unido.org)

19503

151  
J. L.

Ciudad de la Habana, 26 de Noviembre de 1991.

Informe Anual / 1991 (contrato No.91/014), de las actividades realizadas por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Cuba) para el proyecto de Resistencia a Virus en Papa. (DP/RLA/83/003).

En este informe damos respuesta a los siguientes aspectos acordados en el referido contrato:

Actividad 1: Desarrollo de sistema ELISA para la detección del virus "Y" de la papa (actividad 1.4 del proyecto general).

Se logró establecer un sistema de diagnóstico tipo ELISA para la detección del virus "Y" de la papa, utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales anti-PVY.

Este sistema al igual que los kits elaborados para detectar los virus PVX y PLRV de la papa (Fig. 1) han sido aceptados y aprobados por el Ministerio de la Agricultura de Cuba para la certificación de toda la semilla agrícola nacional que se empleará en la próxima campaña (91/92) de siembra de papa. Actualmente el Instituto Nacional de Sanidad Vegetal los emplea para diagnosticar estas enfermedades en nuestro país.

Podemos por tanto afirmar que esta actividad se cumplió totalmente en la etapa con los resultados esperados.

Actividad 2: Obtención de genes que codifican para la proteína de la cápside del PLRV (actividad 3.1 y 3.2 del proyecto general).

Para aislar el gen que codifica para la proteína de la cápside del PLRV (CP-PLRV) se siguió la siguiente estrategia (Fig. 2): se purificó el ARN genómico del virus y se realizó un cADN, posteriormente se diseñaron oligonucleótidos de la región 5' y 3' del gen que codifica para la CP-PLRV; en base a la secuencia del virus reportada en la literatura se realizó un PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a partir del cADN. El fragmento amplificado tenía un tamaño de 670 pb como era de esperar, y fue introducido en el vector pUC-18. En este vector no fue posible detectar niveles apreciables de expresión; pensando que era producto de la estabilidad del mRNA de nuestro gen, y no de la proteína en este hospedero. Posteriormente se diseñó un vector de expresión pEX1-3, que se expresó en la bacteria *Escherichia coli*, donde según Stanley K. Miller (1988) las proteínas de este organismo correspondientes a la región 5' y 3' del gen, y las proteínas totales pueden ser purificadas fácilmente mediante la utilización de

anticuerpos anti-PLRV que algunos de los clones que contienen el gen expresaban la proteína de la cápside del PLRV, cuando se inducía el sistema.

Cuando estos clones fueron inducidos a 42°C y analizados en SDS-PAGE se observó una banda muy fuerte correspondiendo a un peso molecular de 114 kd. En análisis por western blot, empleando IgG anti-PLRV, solo se observó señal positiva en los clones donde la proteína de la cápside estaba fusionada a la  $\beta$ -galactosidasa.

### **Actividad 3: Secuenciación de clones de PLRV (actividad 3.2.1 del proyecto).**

Este aspecto no lo hemos concluido totalmente, ya que la secuencia realizada a la proteína de la cápside del aislado cubano (Fig. 3.1), difiere en algunos nucleótidos con otras secuencias publicadas anteriormente. En estos momentos nos encontramos realizando nuevas secuencias para corroborar estas posibles divergencias.

### **Actividad 4: Adaptación de técnicas de transformación de la papa a la variedad Désirée.**

Para los experimentos de transformación usamos plantas de papas libres de patógenos de las siguientes variedades: Désirée, Baraha, Spunta, Tumbina y Chieftain, crecidas a 21°C con un fotoperíodo de 16h y una intensidad de 9000 lux. Los explantes fueron micropropagados cada 4 semanas, transfiriendo un segmento del tallo (conteniendo una hoja y una yema) a un medio MS (Murashige and Skoog 1962) modificado (sales del MS, ácido giberélico 0.1 mg/l, glicina 2 mg/l, ácido nicotínico 0.5 mg/l, piridoxina 0.5 mg/l, tiamina 0.4 mg/L).

#### **Regeneración:**

La regeneración de plantas de papas es un proceso complejo que depende del tipo de explantes que se utilice y la composición del medio a emplear. Hasta el momento se ha reportado la regeneración de discos de tubérculos, tallos y discos de hojas (Stiekema, 1988; Newell in press; Tavazza, 1988; Wenzler, 1988 y De Bock, 1988). Nosotros hemos obtenido mejores resultados en los experimentos de regeneración a partir de discos de hojas que de discos de tubérculos. Para la regeneración de plantas de papas se evaluaron diferentes medios (Tabla. 1), y acorde con los resultados obtenidos en estos experimentos, seleccionamos, para evaluar la capacidad de regeneración de las diferentes variedades, los medios O37 (Wenzler, 1987), W11 (Tabla. 2). Los trabajos relacionados con la regeneración y transformación de papa se centraron fundamentalmente en la variedad Désirée, pues ésta constituye aproximadamente el 70% de la producción de papa de nuestro país.

## Transformación Genética de Plantas de Papa.

Para los experimentos de transformación se usaron hojas de un tamaño de 5 X 3mm, provenientes de plantas crecidas "in vitro". Las cepas de *A. tumefaciens*: pGV3850::pCib-G7X631, pGV3850::pCib-Y14 y pGV3850::pCib-LR4 se crecieron hasta la fase estacionaria. Las hojas fueron cortadas en la base y colocadas con el envés hacia arriba en una placa petri, conteniendo una dilución de 1/10 del *Agrobacterium* en medio MS. Después de 2 días de co-cultivación a 25°C en la oscuridad, los explantes se lavaron con medio MS para quitar el exceso de *Agrobacterium* y posteriormente se pusieron sobre medio CD3Z, conteniendo Clorofán (500 mg/L) y Kanamicina (100 mg/L) hasta la formación de brotes.

Después de 6 semanas los brotes se individualizaron y se pusieron en el medio de propagación para papa, el cual contenía los dos antibióticos anteriormente mencionados. Se probaron diferentes tipos y concentraciones de zeatina con el propósito de aumentar la capacidad de regeneración de los explantes (Tabla. 3).

Cuando se conoce que la acetosirringona estimula la transformación, nosotros realizamos algunos experimentos en éste sentido, con el objetivo de aumentar la eficiencia de nuestras transformaciones (Tabla. 4).

### **Actividad 5: Transformación de plantas de papa con híbridos que codifican para la proteína de la cápside del PVX, PVY y PLRV.**

Discos de hojas de *Solanum tuberosum* L. c.v. Désirée fueron infectadas con las cepas de *A. tumefaciens*: pGV3850::pCib-G7X631, pGV3850::pCib-Y14 y pGV3850::pCib-LR4, mediante el protocolo descrito anteriormente. Las plantas de papa que contenían en su genoma el gen que codifica para el NP111 fueron seleccionadas por su crecimiento en kanamicina a 100 µg/ml (Fig. 4). Brotes de 3 a 5mm de tamaño se excindieron y se colocaron en un medio de enraizamiento conteniendo kanamicina 100 µg/ml (Fig. 5). Cuando las plantas alcanzaron un tamaño aproximadamente de 5 cm, fueron transferidas a invernaderos con condiciones controladas (Fig. 6.).

Para demostrar la integración de la proteína de la cápside de los virus PVX, PVY y PLRV, en el genoma de las plantas de papas, se utilizó la técnica del PCR (Polymerase Chain Reaction), para ésto se purificó ADN total de hojas de plantas (aproximadamente 30 clones diferentes para cada construcción) crecidas en Kanamicina 100 µg/ml.

En todos los casos la amplificación por PCR fue realizada en un volumen de 0.1 ml conteniendo 10 mM de Tris-HCl (pH-8.3), 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.01% de gelatina, 0.2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTT, 0.1 μM de cada oligonucleótido, 1 μg de ADN total y 2.8 U de laq ADN pol. (Enzibiot, CIGB, Cuba). La amplificación fue realizada en un ADN Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus) programado para 30 ciclos de 3 min a 95°C para la desnaturalización inicial, seguido por 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C. Los productos del PCR fueron chequeados por electroforesis en gel de agarosa 0.8%, teñidos con etidium bromide y fotografiados (Fig. 7, Fig. 9 y Fig. 11). Posteriormente las bandas amplificadas fueron analizadas por southern blot (Fig. 8, Fig. 10 y Fig. 12), utilizando para la hibridación los genes que codifican para las proteínas de las cápsidas del PVX, PVY y PLRV respectivamente.

#### **Actividad 6: Entrenamiento y superación técnica.**

Por cuanto dos nuevos investigadores con experiencia en biología molecular y entrenamiento en instituciones extranjeras se han incorporado al proyecto, consideramos que en estos momentos era más conveniente utilizar los fondos destinados para entrenamiento con los fines de adquirir reactivos y materiales indispensables para asegurar la continuidad del proyecto, ya que el mismo se viene desarrollando más aceleradamente de lo previsto.

**Conclusiones:** En general todos los aspectos comprometidos por nosotros en el marco del proyecto para este año se han cumplido satisfactoriamente.

### *Referencias.*

- 1- De Block, M. 1988. Theop. Appl. Genet. 76:767-774.
- 2- Murashige, I. and F. Skoog. 1962. Physiol. Plant. 15:473-497.
- 3- Newell, C.A. in press. Plant Cell Reports.
- 4- Stanley, K. et al. 1984. EMBO J. 3:1429.
- 5- Strickeman, W.J. et al. 1968. Plant Cell Report. 7:47-50.
- 6- Tavazza, R. et al. 1988. Plant Science. 59:175-181.
- 7- Wenzler, H. et al 1988. Plant Science. 63:79-85.

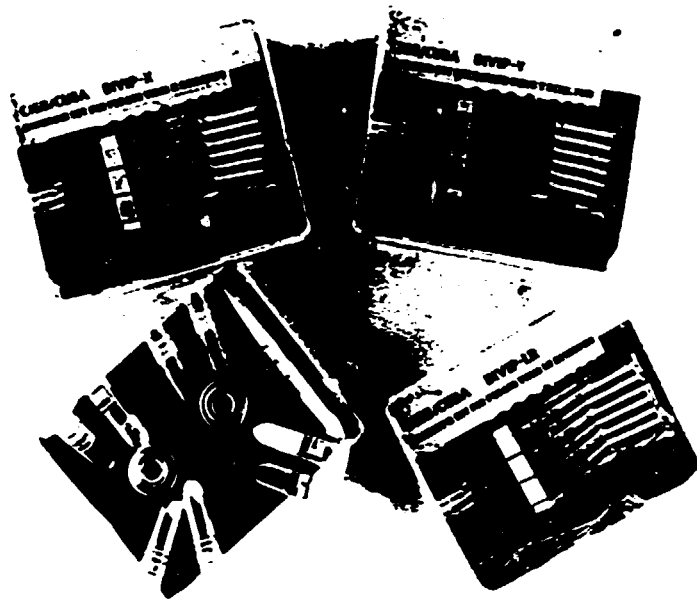


Fig. 1. Sistemas de diagnosticos desarrollados para la detección de los virus X, Y y LP de la papa.

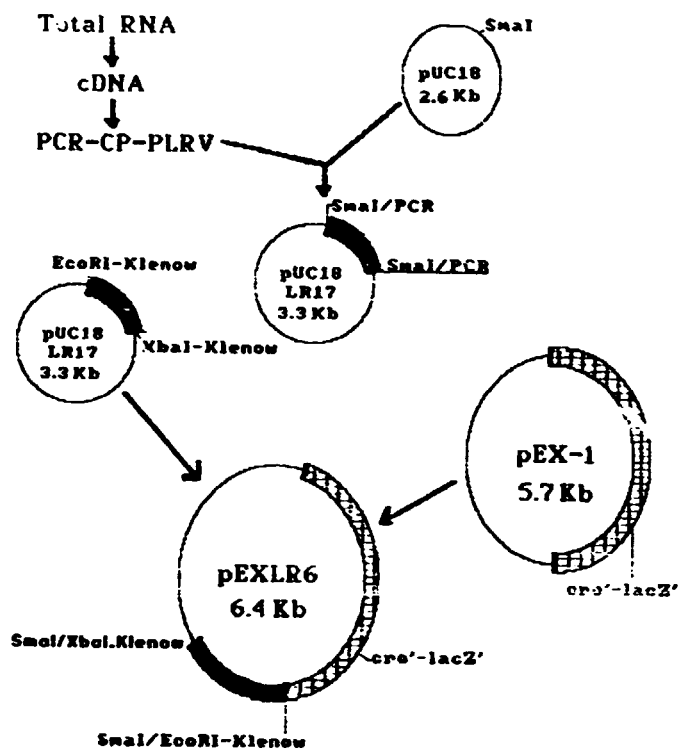


Fig. 2. Construction of the recombinant plasmid (pEXLR6) for the PLRV coat protein expression in *E. coli*.

```

ATG AST ACG GTC GTG GTT AAA GGA AAT GTC AAT GGT GGT GTg CAA CAA
CCA AGA AGG CGA AGA AGG CAA TCC CTT CGC AGG CGC GCT AAC AGA GTT
CAG CCA GTG GTT ATG GTC ACG GCC CCT GGG CAA CCC AGG CGC CGA AGA
CGC AGA AGA GGA GGC AAT CGC CGC TCA AGA AGA ACT GGA GTT CCC CSA
GGA CGA GGC TCA AGC GAG ACA TTC GTG TTT ACA AAG GAC AAC LTC GIG
GGC AAC TCC CAA GGA AST TTC ACC TTC GGG CCG AGT CTA TCA GAC TGI
GGG GCA TTC AAG GAT GGA ATA CTC AAG GCC TAC CAI GAG TAI AAG ATC
ACA AGC ATC TTA CTT CAG TTC GTC AGC GAG GCC TCT TCC ACC TCC TCC
Gat TCC ATC GCT TAT GAG TTG GAC CCL CAT TGC AAA GTA TCA TCC CTC
CAG TCC TAC GTC AAC AAa TTC CAA ATT ACG AAG GCC GGC GCC AAA ACT
TAT CAA GCG CGG ATG ATA AAC GGG GTA GAA TGG CAC GAT TCT TCT GAG
GAT CAG TGC CGG ATA CTG TGG AAG GGA AAT GGA AAA TCT TCA GAT ACC
GCA GGA TCC TTC AGA GTC ACC ATC AGG GTG GCT TTG CAA AAC CCC AAA
TAG

```

Fig. 3. Sequences of CP-PLRV. The strikeouts bases are different from reported sequences



Medium	Hormone composition (mg/L)					Shoot Formation
	Zeatine	ANA	AIA	Giberelic Acid	BAP	
RT	---	---	1	10	1	0
RS	2	0.2	---	20	---	0
CD3Z	3	---	---	3	---	multi-shoot
W(I)	---	---	0.2	10	2.24	
W(II)	---	---	---	10	2.24	multi-shoot

Table. 1: *Medium evaluation in the Potato regeneration.*  
 RT, RS, CD3Z, W(I) and W(II) are MS basal medium supplemented with different hormone.

Variety	Medium	Explant number	Shoot formation (multi-shoot)
Red Pontiac	W	50	2
	CD3Z	50	6
Claudia	W	50	12
	CD3Z	50	1
Spunta	W	50	50
	CD3Z	50	0
Baraka	W	50	23
	CD3Z	50	6
Chieftain	W	50	0
	CD3Z	50	0
Dsire	W	50	15
	CD3Z	50	30

Type	Explant number	Plants number
Zeatine Riboside	49	56
Zeatine	49	19

*Zeatine Evaluation.*  
 Cultivar: *Dsire*.  
 Construction: *pGV3850::pCib-GZX631*.

Treatment	Total explants	Total shoots
Control Km (+)	50	0
Control Km (-)	50	45
Acetosyringone (+)	184	102
Acetosyringone (-)	180	74

Table 4: *Acetosyringone effect in potato transformation.*  
 Cultivar: *Dsire*.  
 Construction: *pGV3850::pCib-GZX631*.



Fig. 4. Transformation of *Solanum tuberosum* L. c.v. Désirée via *Agrobacterium tumefaciens*.

The left petri dish shows potato leaf disks after 7 days of incubation in 100 mg/l Kanamycin, after of potato leaf disks had been infected with *Agrobacterium tumefaciens* strain C58. The right petri dish shows potato leaf disks after incubation of 100 mg/l Kanamycin.

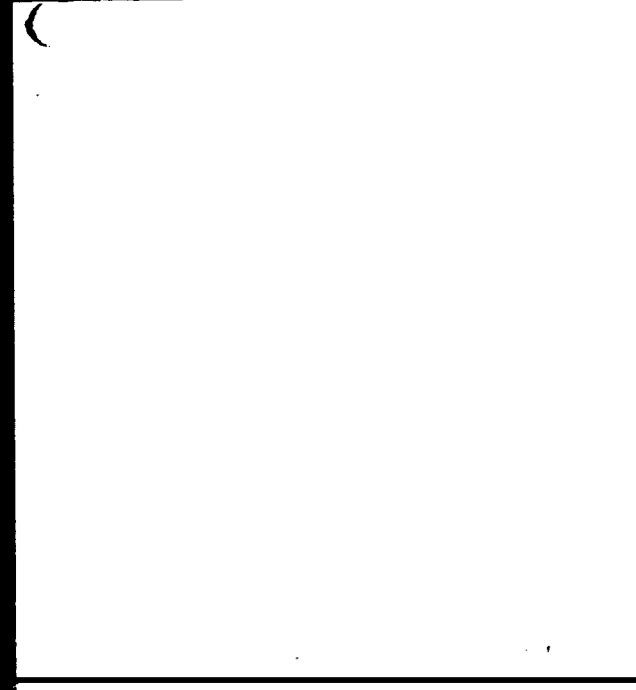




Figure 1. A view of the field of plants in the experimental plot. The plants are arranged in rows and are growing in a field. The plants are dark against a bright background. The plants are arranged in rows and are growing in a field. The plants are dark against a bright background.



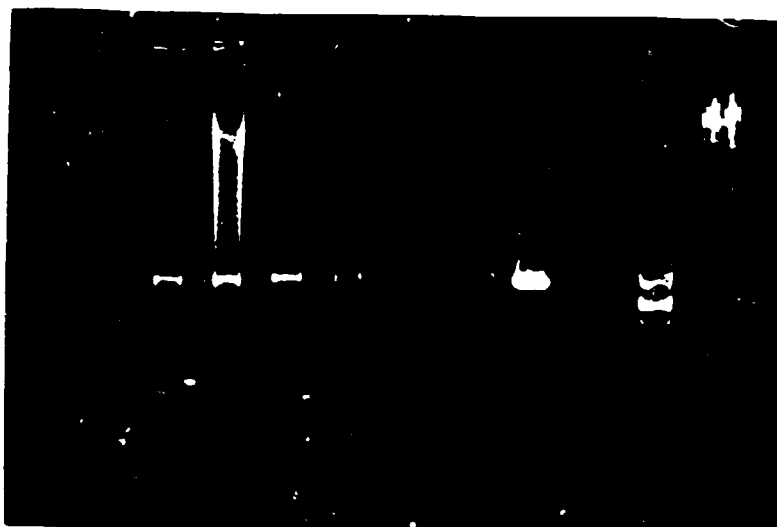


Fig. 1. Southern blot detection of PVX coat protein gene from total DNA extracted from potato plants.

Line 1: Clon X-1	Line 5: Clon X-5
Line 2: Clon X-2	Line 6: Untransformed plant
Line 3: Clon X-3	Line 7: Positive control (100pg pUCX6)
Line 4: Clon X-4	

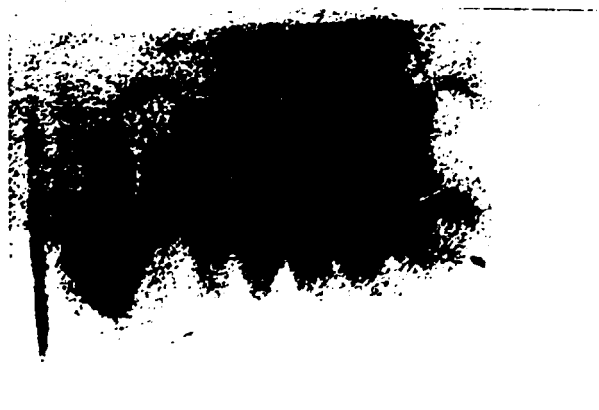


Fig. 2. Southern blot analysis of the PCR products from potato transformants containing the PVX coat protein gene.

Line 1: Positive control (100pg pUCX6)	Line 5: Clon X-3
Line 2: Untransformed potato plant	Line 6: Clon X-4
Line 3: Clon X-1	Line 7: Clon X-5
Line 4: Clon X-2	

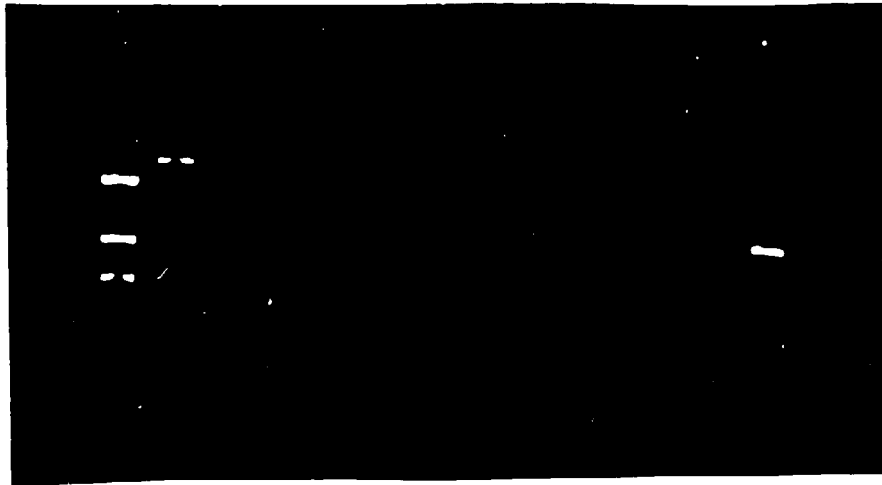


Fig. 10.50. Agarose gel electrophoresis of the DNA extracted from potato leaves and plants.

- |   |                         |
|---|-------------------------|
| Line 1: MW (pUC/Taq= 1.4, 0.73, 0.42kb) | Line 8: Clon Y-31       |
| Line 2: Linear plasmid (pGY14)          | Line 9: Clon Y-32       |
| Line 3: Untransformed potato plant      | Line 10: Clon Y-33      |
| Line 4: Clon Y-24                       | Line 11: Clon Y-34      |
| Line 5: Clon Y-18                       | Line 12: Clon Y-35      |
| Line 6: Clon Y-27                       | Line 13: 100ng of pGY14 |
| Line 7: Clon Y-3                        |                         |

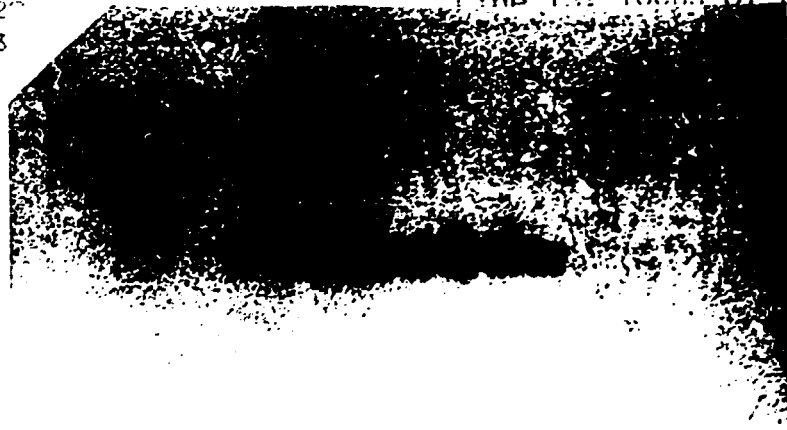
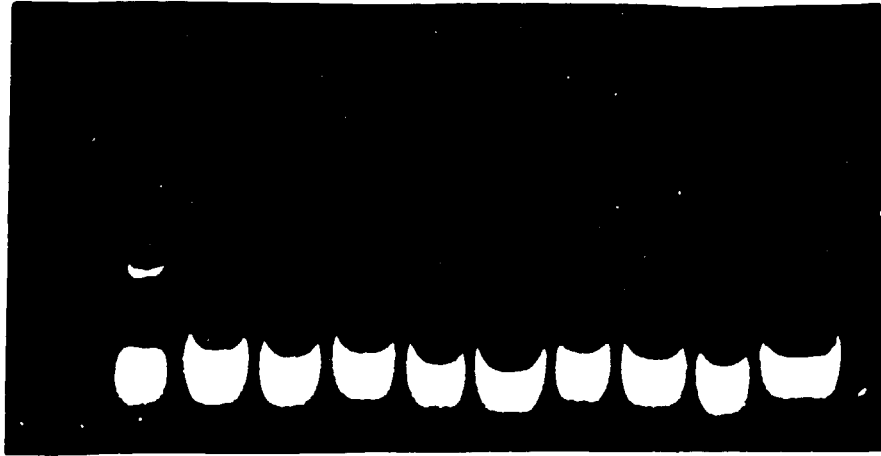


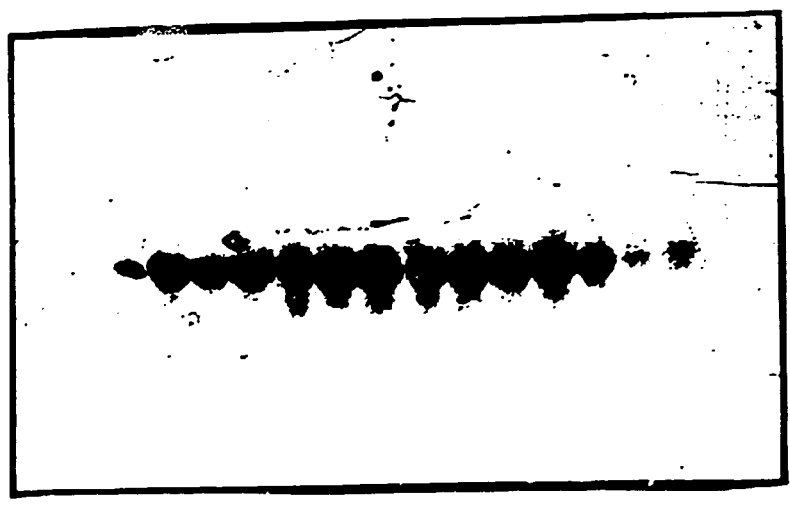
Fig. 10.50. Agarose gel electrophoresis of the DNA extracted from potato leaves and plants.

- |                                |                    |
|--------------------------------|--------------------|
| Line 1: MW                     | Line 8: Clon Y-31  |
| Line 2: Linear plasmid (pGY14) | Line 9: Clon Y-32  |
| Line 3: Untransformed plant    | Line 10: Clon Y-33 |
| Line 4: Clon Y-24              | Line 11: Clon Y-34 |
| Line 5: Clon Y-18              |                    |
| Line 6: Clon Y-29              |                    |



**Fig. 11.** PCR amplification of PLRV coat protein gene from total DNA of potato transgenic plants.

1:	Standard plants.	200 ng total DNA
2:	Standard plants.	100 ng total DNA
3:	Standard plants.	50 ng total DNA
4:	Standard plants.	25 ng total DNA
5:	Standard plants.	12.5 ng total DNA
6:	Standard plants.	6.25 ng total DNA
7:	Standard plants.	3.125 ng total DNA
8:	Standard plants.	1.5625 ng total DNA
9:	Standard plants.	0.78125 ng total DNA
10:	Standard plants.	0.390625 ng total DNA



**Fig. 12.** Southern blot analysis of the PCR products from potato transgenic plants containing the PLRV coat protein gene.

1:	Standard plants.	200 ng total DNA
2:	Standard plants.	100 ng total DNA
3:	Standard plants.	50 ng total DNA
4:	Standard plants.	25 ng total DNA
5:	Standard plants.	12.5 ng total DNA
6:	Standard plants.	6.25 ng total DNA
7:	Standard plants.	3.125 ng total DNA
8:	Standard plants.	1.5625 ng total DNA
9:	Standard plants.	0.78125 ng total DNA
10:	Standard plants.	0.390625 ng total DNA