



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

19688

147 E

INFORME ANUAL DEL PROYECTO "RESISTENCIA A VIROSIS EN PAPA"

Dr. Horacio Esteban Hopp

En representación de los laboratorios argentinos: Instituto de Biología Molecular CICV-INTA Castelar, INGENI-CC-ICET, Buenos Aires, Cátedra de Genética Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires, Instituto de Fitovirología INTA-Córdoba, EEA INTA-Balcarce, Buenos Aires y EEA INTA-Luján de Cuyo, Mendoza.

Junio 1991.

ORGANIZACION DEL INFORME:

I>- Descripción de lo realizado en los servicios comprometidos en el contrato con ONUDI para el segundo año)

Servicio A.- Firma del contrato

Servicio B.- Búsqueda de genes de resistencia. Infección "in vitro" de protoplastos obtenidos de genotipos resistentes de papa y evaluación de la replicación viral.

Servicio C.- Búsqueda y selección de clones codificantes para la cápside viral de PLRV.

Servicio D.- Construcción de genes quiméricos de resistencia a virosis

D.1- PVX

D.2- PVY

D.3- PLRV

Servicio E.- Establecimiento de las técnicas de transformación de papa de interés para Argentina.

Servicio F.- Transformación de plantas de papa

F.1- PVX

F.2- PVY

F.3- PLRV

F.4- Entrenamiento de una estudiante graduada en México.

Servicio G.- Presentación de informes semestral y anual.

II>- Presentaciones a congresos y publicaciones.

III>- Intercambios e interacciones con otros países participantes del proyecto.

IV>- Evaluaciones de cumplimiento de Argentina.

I>- Desarrollo de actividades:

Servicio B.- Búsqueda de genes de resistencia. Infección "in vitro" de protoplastos obtenidos de genotipos resistentes de papa y evaluación de la replicación viral.

RESUMEN DE LA ACTIVIDAD REALIZADA

1- Se obtuvieron protoplastos de papa de variedades locales (Huinkul, susceptible a PVX; Serrana-INTA, inmune a PVX) y extranjeras (Spunta, de amplia difusión en la Argentina y susceptible a PVX), obteniéndose un promedio de 106 protoplastos viables por gramo de tejido (hojas) de partida.

2-El PVX se aisló, purificó y cuantificó en base a su absorbancia. Protoplastos obtenidos de cultivares de papa susceptibles al PVX se infectaron con PVX en alta multiplicidad de infección en presencia de

fusógenos químicos (PEG). Un 60 % de protoplastos sobreviven al tratamiento y de estos, más de un 70 % queda infectado con virus.

3- La multiplicación viral a lo largo del tiempo se analizó tomando alícuotas a distintos tiempos post infección hasta completar 40 horas mediante los siguientes parámetros: a) Incorporación de aminoácidos marcados (3H-Leu) a proteína de cubierta por inmunoprecipitación. b) Desaparición y posterior reaparición (síntesis) de proteína de cubierta por ELISA con anticuerpos policlonales y conjugados monoclonales anti-PVX. c) Síntesis de RNA genómico viral por hibridación molecular mediante la técnica del "dot-blot" con la sonda pX1 (cDNA de PVX). d) Inmunofluorescencia de los protoplastos.

4- Los resultados obtenidos hasta ahora indican que tras un período de aproximadamente 15 horas (valle del ELISA) se dispara la síntesis de proteína de cubierta en forma continua alcanzando un plateau a las 30 hs. La síntesis de RNA genómico empieza unas 5 hs. antes siguiendo una tendencia similar a la de la proteína de cubierta.

5- Por otro lado, se probó la infección en paralelo de protoplastos de variedades de papa susceptible e inmune al PVX a las siguientes densidades de infección: 0.01 ng PVX/protoplasto viable/ul; 0.1 ng PVX/protoplasto viable/ul y 1 ng PVX/protoplasto viable/ul; los resultados indican que en condiciones de bajo inóculo (densidades de infección de 0.01 y 0.1) la concentración de antígeno de cápside viral en los protoplastos de la variedad inmune, monitoreada mediante la técnica de ELISA, muestra un 90 % de reducción respecto a la de protoplastos de variedades susceptibles; sin embargo, cuando el inóculo es alto (densidad de infección de 1 ng), la cinética de replicación viral en los protoplastos de la variedad inmune medida a través de la producción de antígeno es análoga a la de la variedad susceptible control.

6- Experimentos de "slot-blot" realizados con infecciones de protoplastos de las variedades susceptibles e inmunes en paralelo, a densidades de infección bajas (0.1 ng) confirmaron una menor producción de RNA viral por protoplasto viable en la variedad inmune respecto a la producción de RNA viral observada en la variedad susceptible, lo cual sugeriría que la disminución relativa de producción de antígeno de cápside observada en protoplastos de la variedad inmune Serrana se vería acompañada por una disminución en la cantidad de RNA genómico viral.

7- Experimentos de inmunofluorescencia realizados con protoplastos de las variedades susceptibles e inmunes infectados a una densidad de infección baja (0.1 ng), muestran una menor acumulación de antígeno (cápside viral) por protoplasto (fluorescencia más débil) en la variedad inmune respecto a la observada en los protoplastos de la variedad susceptible control; estos resultados estarían indicando que la diferencia en la producción viral entre ambos tipos de protoplastos susceptibles e inmunes no se debería a una infección y replicación diferencial del virus en una sub-población celular de Serrana sino a una inhibición de la multiplicación viral que existiría en todas las células de esta variedad.

8- Además de estos experimentos realizados con protoplastos de ambos tipos de cultivares de papa, se realizaron Westerns y Northern blots a partir de hoja de cultivares de papa (susceptible e inmune) infectados y no infectados con PVX (controles), cuyos resultados confirmaron que in vivo la inhibición de la replicación viral en el cultivar inmune es prácticamente del 100 %, dentro del marco de sensibilidad que estos sistemas de detección permiten.

9- Gran parte de estos resultados se publicaron el año pasado y durante el presente año (Saladriñas et al. 1990a y 1990b, Ceriani et al. 1990 y Tozzini et al. 1991).

ESTUDIO DE LA EXPRESION DEL GEN DE RESISTENCIA Rx acl A NIVEL CELULAR Y TISULAR.

La inoculación se realiza en las hojas medias de la plántula y al cabo de 1 mes, las hojas inoculadas con virus o con buffer no presentan diferencias entre sí. Un mes después de la infección, RNA aislado de hojas infectadas con PVX o buffer (control) de los cultivares susceptibles Huinkul MAG y Spunta, y resistente Serrana INTA, se corrió electroforéticamente en gel desnaturizante de agarosa al 1.2%. El Northern blot, revelado con una sonda dirigida contra genes tempranos y tardíos de PVX, el clon de cDNA de doble cadena 5x41, mostró hibridación positiva contra RNA genómico y otros RNAs de menor peso molecular, en el caso de las muestras susceptibles, pero no así en el caso de la muestra proveniente del cultivar inmune.

En paralelo a los RNAs mencionados se corrió el virión entero, que en las condiciones electroforéticas mencionadas, corre como una nucleoproteína de 8.7 kb. Se incluyó además en la corrida un escalera de RNA ("ladder", BRL) para la cuantificación del peso molecular en Kb de los RNAs subgenómicos. RNAs controles provenientes de hoja pseudoinoculada de 1 mes, con buffer y sin virus, muestra hibridación negativa. Además de la banda correspondiente a RNA genómico de 6.4 Kb y RNA-proteína asociada de 8.7 Kb, existen numerosas bandas correspondientes a posibles RNAs subgenómicos virales. Algunas de esas bandas son netas y claras (bandas de 4, 3, 2.5, 2.2 y 2 Kb) pero otras son difusas, sugiriendo heterogeneidad de tamaño en los RNAs componentes. La intensidad autoradiográfica relativa de las bandas depende de la cantidad de especies de RNAs por un lado, y de la calidad de estos RNAs, por el otro, (por ejemplo largo de la especie subgenómica). Parecería que las especies mayoritarias son las correspondientes a los RNAs de rango de peso molecular de alrededor de 5.2 Kb y 4 Kb. Le seguirían en orden, RNAs de rango de peso molecular bajo: 1.1-1.6 y 0.1-0.9, y por último, los RNAs de peso molecular intermedio 3, 2.5, 2.2 y 2.

La estrategia de replicación a través de RNAs subgenómicos intermediarios no es novedosa y de hecho, con respecto a PVX, ya existen trabajos publicados en donde se muestran Northern blots realizados con RNAs extraídos de hoja o células infectadas que hibridan con distintas especies de RNAs de menor tamaño que el genómico (Dolja, 1987; Karasev, 1987; Adams, 1985). Sin embargo, los pesos moleculares asignados a esos RNAs subgenómicos varían según el grupo de trabajo (Dolja, 1987; Karasev A.V, 1987). Se han informado por lo menos 6 tipos de RNAs subgenómicos, todos 3' co-terminales y con análogos de doble cadena (Dolja, 1987).

El subgenómico de menor peso molecular, 0.9 Kb, es la expresión *in vivo* del gen de la cápside viral; a través de este subgenómico el virus produce proteína de cápside necesaria para la formación de viriones y aunque de su función ya no quedan dudas, existen diferencias en cuanto al peso molecular asignado al mismo: mientras un grupo informa 0.9 Kb (Dolja, 1987) otro informa 1 a 1.3 Kb (Karasev, 1987). Nuestros resultados estarían más a favor de los del primer grupo (0.9-0.1 Kb). En cuanto a los otros, pueden encontrarse similitudes en el peso molecular para algunos de ellos (3.6/4, 3/3, 2.1/2.2, 1.8/2, 1.4/(1.6-1.1) y 0.9/(0.9-0.1)), pero nuestros resultados arrojan claras diferencias en lo que respecta a por lo menos dos: Una banda mayoritaria de alto peso molecular (alrededor de 5.2 Kb) y otra banda menor pero también clara de 2.5 Kb.

Se atribuye a cada especie subgenómica simple cadena (de igual polaridad que el RNA genómico viral, por definición) su correspondiente de doble cadena (Dolja, 1987). Si esto es cierto, el aislamiento de RNA bicatenario a partir de una preparación de RNA total de hoja infectada

por columnas de CF-11 y posterior corrida en gel de agarosa desnaturalizante debería mostrar un patrón electroforético de bandas equivalente. Se vislumbran dos bandas muy tenues en la autoradiografía, de peso molecular igual a 6.4 y 5.7 aproximadamente, presentes en la muestra de RNA bicatenario. La no aparición de otras bandas, no es prueba de la no existencia de otros posibles intermediarios bicatenarios, ya que es posible que utilizando cantidades mayores a 100 ug de RNA total (en este experimento se utilizaron 100) en el aislamiento de RNAs bicatenarios por columna CF-11, puedan visualizarse. Lo interesante de estos resultados es que las bandas que aparecen como mayoritarias, las especies de 6.4 y la de 5.2 Kb, tendrían su contraparte bicatenaria, a juzgar por las bandas que aparecen en la foto D (6.4 y 5.7 Kb).

En base a su interacción con los genes de hipersensibilidad Nb y Nx, o con el gen de resistencia extrema Rx, las cepas de PVX pueden clasificarse en 5 grupos:

Genotipo	grupo de cepa viral				
	1	2	3	4	HB
nx nb	sa	s	s	s	s
Nx nb	R	s	R	s	s
nx Nb	R	R	s	s	s
Nx Nb	R	R	R	s	s
Rx(acl)	R	R	R	R	s
Rx(adq)	R	R	R	R	s

aR=Resistente; s=susceptible. La resistencia está asociada a un alelo dominante, mientras que la susceptibilidad a un alelo recesivo (Tavantzis 1990; modificado de Cockerham, 1955) El primer tipo de resistencia extrema al virus fue informada por Schultz y Raleigh (1933). La resistencia parecía estar codificada por un único gen dominante (Cockerham, 1970).

La resistencia provenía de un cultivar salvaje Solanum andigena y fue transferida al clon Solanum tuberosum USDA 41956. Este gen, llamado Rx(adq), fue incorporado a cultivares comerciales norteamericanos.

Otro caso de resistencia extrema fue informado por Ross en 1954, y fue encontrado en Solanum acaule. Este gen se denominó Rx(acl), y ha sido incorporado a algunos cultivares europeos. La relación entre Rx(adq) y Rx(acl) es desconocida.

Una cepa o grupo de cepas de PVX designada PVX-HB, común en el 7 % de los clones bolivianos, se comporta como un aislado virulento frente a este gen, es decir, es capaz de replicar en aquellos cultivares que lo poseen. También replica en cultivares que poseen los genes de hipersensibilidad, sin embargo, no lo hace frente a Solanum sucrense, un cultivar que posee un gen dominante denominado Rx(scr), que le confiere "inmunidad" extrema contra PVX-HB.

Hasta hoy, varias décadas después de la incorporación de los genes Rx(adq) y Rx(acl) a cultivares comerciales, no existen evidencias que cepas del grupo HB constituyan una amenaza importante para aquellos cultivares norteamericanos o europeos que poseen esos genes. Por lo tanto, siendo estos genes de resistencia extrema de alto valor agronómico, es muy deseable su caracterización.

Caracterización de los genes de virulencia de los aislamientos argentinos y extranjeros de PVX. Se infectaron razas fisiológicas indicadores de papa a fin de clasificar dos aislamientos realizados por la Fac. Cs. Agrarias de Córdoba y compararlos con otras razas caracterizadas. Los resultados preliminares indican que en condiciones de laboratorio, son capaces de superar el gen Rxacl presente en Serrana

INTA y en entradas de S. acaule manifestando un comportamiento que recuerda a la raza HB. Sin embargo, análisis inmunológicos realizados en el CIP indicaron que ambos aislamientos no tienen relación con el llamado grupo andino de razas de PVX al que pertenece HB.

PUESTA A PUNTO Y UTILIZACION DE LIPOFECTINA PARA LA TRANSFORMACION DE PAPA E INOCULACION ARTIFICIAL DE PROTOPLASTOS DE PAPA CON VIRUS:

1) Inóculo adsorvido:

El Inóculo (PVX) adsorvido por lipofectina es menor al adsorvido por PEG (en general del 3 al 6 % del adsorvido por PEG).

El virión en contacto con los protoplastos parece tener una entrada espontánea a lo largo de las 2 hs de incubación. La presencia de lipofectina no incrementa demasiado esta entrada de virión. La producción de viriones progenie a partir de un inóculo viral con o sin lipofectina parece ser equivalente a las 48 hs.

La presencia de PEG y no de lipofectina es lo que determina la entrada eficiente de virión a la célula. Esto se desprende de los controles de infección viral realizados según el trabajo del Dr. Chua para transfección estable con DNA en protoplastos de arroz. En este paper, donde se dice lograr la transfección estable utilizando una combinación de PEG-lipofectina no se incluye el control correspondiente de transfección con la misma densidad de PEG sin lipofectina. Cabe uno preguntarse si la transfección positiva lograda en dicho trabajo se debió o no a la lipofectina.

2) Toxicidad de lipofectina:

La temperatura de incubación con lipofectina es crítica en lo que respecta al cultivar utilizado: mientras que para algunos temperaturas de hasta 37 °C y no lavado de la lipofectina luego de la incubación pueden ser inocuas (SPUNTA), para otros la mejor viabilidad se obtiene con bajas temperaturas y lavado de lipofectina luego de la incubación con la misma (HUINKUL, SERRANA). En estos últimos casos se observa incluso un mejoramiento y mantenimiento de la fluorescencia en general tanto en controles no infectados como en células infectadas con el virus a lo largo del ciclo viral. A horas más allá de las 48, se han observado figuras en división celular (otra indicación de la inocuidad de los liposomas).

En comparación con el método del PEG, la utilización de los liposomas permite utilizar de partida un menor número de células (usualmente un orden de magnitud inferior) por la poca toxicidad que estos poseen, manteniéndose una buena viabilidad a lo largo de todo el ciclo de replicación viral. Aquellos protoplastos infectados o pseudo infectados por el método del PEG, muestran una mayor tasa de mortalidad a lo largo del ciclo viral que los tratados con lipofectina, poseyendo además, ya desde el tiempo 0 del ciclo viral, una viabilidad también menor con mayor preponderancia de fluorescencia del tipo verde pálida a rojiza.

Una cantidad óptima de lipofectina a utilizar parece estar en el rango de 30 a 45 µg/millón de protoplastos viables. Dado que la utilización de cualquiera de estos dos valores produjo resultados equivalentes en lo que respecta a la viabilidad celular y a la producción de virión, se tomó como concentración de elección la menor. No se probaron concentraciones menores o mayores de liposomas para infección o transfección vía RNA.

3) Transfección vía lipofectina:

El método de la lipofectina permite la transfección y expresión de RNA viral en protoplastos.

Utilizando una misma densidad de infección (30 ng RNA/ 300 pv/ul) e

independientemente del método de preparación de RNA (guanidina o TAE/SDS), la elección de la temperatura es crítica: bajas temperaturas permiten una mayor entrada de RNA y su expresión (producción de antígeno viral) puede detectarse ya a las 20 hs por ELISA. En cambio, temperaturas mayores (ambiente: 25-30°C) parecen hacer menos eficiente la captura de RNA por la célula, de modo que la producción de antígeno solo es detectable a partir de las 40 hs (fin del ciclo viral). Un corto período de preincubación a 0 °C (usualmente 10 min) del complejo liposomas/RNA parece contribuir a la eficiencia de entrada del ácido nucleico.

Se probaron dos densidades de transfección vía lipofectina diferentes: Una de bajo inóculo dió negativa la producción de antígeno viral por ELISA a las 40 hs (10 pg RNA viral/pv/ul), en cambio un inóculo un orden mayor (100 pg RNA viral/pv/ul) dió infección positiva.

Se comparó este protocolo de transfección vía lipofectina con otro de transfección vía PEG (sacado de Maule y Boulton, 1980, J.Gen.Virol. 47:199-200). Este último protocolo también se probó a dos densidades de infección distintas (las mismas que para lipofectina) resultando no sólo negativa la producción de antígeno de cápside por ELISA a 40 hs post infección, sino también un efecto notablemente deletéreo sobre la viabilidad y la tasa de mortalidad en general, luego del tratamiento con el PEG.

Es de notar que en el trabajo original de Maule et al. se parte de una cantidad de células a infectar dos órdenes de magnitud mayor de la que se parte en forma estándar en nuestro caso (1×10^7 y 1×10^5 respectivamente) y de una cantidad también notablemente mayor de RNA (0.5 mg RNA).

Otros protocolos similares de transfección de RNA vía PEG, si bien pueden ser efectivos utilizando densidades de transfección menores que las nuestras con lipofectina (entre 8 a 50 pg RNA/pv) necesitan también partir de una cantidad de células del orden de 10^7 por la alta mortalidad que provoca el tratamiento, lo que también implica poder contar con cantidades de RNA considerablemente mayores (del orden del miligramo en muchos casos).

En nuestra experiencia de transfección de RNA viral con lipofectina, la alta viabilidad post-transfección obtenida permite partir de cantidades celulares y de RNA una o dos órdenes de magnitud menores a las utilizadas en protocolos convencionales de transfección vía PEG.

-CARACTERIZACION DE NUEVOS GENES DE INMUNIDAD DEL GERMOPLASMA DE PAPA:

Durante 1990 se caracterizó la cinética de replicación viral mediante ELISA, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, hibridación de ácidos nucleicos, etc. en protoplastos de entradas del banco de germoplasma de S. acaule que tienen el gen de reacción a PVX Xi de Ross, también llamado Rxacl (ver Saladriqas et al. 1990, Ceriani et al. 1990, Hopp et al. 1991); así como de otras entradas con genes de resistencia extrema que estamos caracterizando (Tozzini et al. 1991) de las especies S. sparsipillum, S. oplocense, S. tuberosum andigena, etc. observandose una clara inhibición de la replicación viral que estaría afectando la transcripción o replicación del genoma viral. El detalle de todo lo hecho en este punto está claramente expresado en el trabajo de Tozzini et al. aceptado para publicarse que se adjunta a este informe. Actualmente se continúa la caracterización molecular y se están implementando distintas estrategias para aislar los genes de resistencia.

Servicio C.- Búsqueda y selección de clones codificantes para la cápside viral de PLRV.

no se habían incluido antes (además de los anteriores 25 clones y, por supuesto del control negativo: DNA del plásmido Bluescript sin inserto).

El resultado de la hibridación usando el oligo 2 como sonda, indicó un sólo clon positivo, el número 32.

La hibridación usando el oligo 1 como sonda no arrojó ningún positivo. A continuación se analizó mediante el uso de enzimas de restricción al DNA del clon 32. Por un lado se liberó el inserto cortando DNA purificado del clon 32 con dos enzimas, Bam HI y Pst I. Por otro lado, se cortó DNA de este clon y del plásmido Bluescript por separado con la enzima Hinf I, lo cual libera siete fragmentos; uno de ellos aumenta su tamaño proporcionalmente al tamaño del inserto. Se corrió un gel de poliacrilamida al 5% sembrando el resultado de todas estas restricciones y un marcador de peso molecular. De esta manera se determinó que el inserto del clon 32 es muy corto, tiene unas 50 pb.

En el informe anterior, se reportó la realización de una reacción de PCR, utilizando los oligonucleótidos como iniciadores y la primer cadena de cDNA (obtenida utilizando RNA de planta infectada como templado y transcriptasa inversa) como templado. Esta reacción no dio resultados, es decir, a pesar de que se comprobó que se sintetizaba cDNA, no hubo amplificación del gen de la proteína de la cápside. Como también se explicó en ese informe, esto pudo haber ocurrido porque el templado para la reacción de PCR, si bien era suficiente para detectarlo, marcado con α -³²P-CTP en un gel de agarosa, no era suficiente para comenzar la reacción de amplificación. Un problema importante es que, normalmente, para una reacción de síntesis de primer cadena de cDNA hace falta partir de 1 μ g de RNA templado. Como se contaba con RNA total de planta infectada para usar como templado, para poner 1 μ g de RNA viral, habría que utilizar unos 200 μ g de RNA total, lo cual es metodológicamente dificultoso.

Es por esto que se comenzó la búsqueda de templados alternativos en los clones de la genoteca. Como no se detectó algún clon que contuviera el gen de la proteína de la cápside completo, estos clones no sirvieron como templados alternativos.

Fue importante entonces, volver al punto de partida, el RNA extraído de planta infectada, y tratar de enriquecerlo en RNA viral. Para ello se aplicó la técnica de liberación del híbrido.

Se fijaron 5 μ g de DNA de c/u de los clones 55, 69, y 32 en una membrana de nylon según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Se eligieron los clones 55 y 69 porque tienen insertos muy grandes (aprox. 2 kpb), y el clon 32 porque contiene un inserto correspondiente al de cápside según se desprende del experimento descrito anteriormente.

Una vez finalizados los lavados (ver Materiales y Métodos), se liberó de la membrana el RNA que hibridó con alguno de esos clones por calentamiento. Se precipitó el RNA, se lo resuspendió en agua y se lo corrió en un gel desnaturalizante. Se obtuvo una sola banda de RNA, a diferencia de las varias bandas que se ven cuando se corre RNA total de planta infectada (correspondientes a RNA ribosomal de citoplasma, cloroplastos y mitocondrias). En total se obtuvieron 3 μ g de RNA.

Identificación del RNA viral rescatado con clones de cDNA por la técnica de liberación del híbrido:

Se fijó DNA y RNA a un filtro de nylon, y realizó una hibridación de este filtro usando el clon 32 marcado por iniciación al azar como sonda. Lo que interesa demostrar es que el RNA liberado en el experimento anteriormente descrito hibrida con el clon 32 que, ya se sabe, contiene parte del gen de la proteína de la cápside. Se observó una fuerte hibridación de la sonda con el RNA liberado y con el control positivo, y algo de hibridación inespecífica con el tRNA. No hay hibridación con el RNA total, lo cual era esperable ya que, durante el

experimento de liberación del híbrido, de 200 µg de RNA total se obtuvieron 3 µg de RNA liberado. Este resultado nos indica que el RNA es de origen viral y puede ser usado como molde (templado) para generar una genoteca de cDNA.

Para su amplificación y clonado se utilizó un kit de Invitro-gen utilizando los oligonucleótidos arriba detallados. El fragmento amplificado mostró un comportamiento electroforético coherente con lo esperado. A su vez, al ser transferido mediante Southern blot a una membrana de nitrocelulosa e hibridizado con sondas del clon arriba mencionado, mostró una alta señal de hibridación. Después de ser subclonado e introducido en un fasmido vector en E.coli, se preparó cantidad suficiente para secuenciación, la cual se encuentra actualmente en curso.

Servicio D.- Construcción de genes quiméricos de resistencia a virosis

-D.1 y D.2- PVX y PVY:

Como se informó anteriormente, a partir del conocimiento y de los clones de cDNA obtenidos para PVX y PVY se realizaron distintas construcciones quiméricas con el objeto de introducir las en plantas de papa y obtener resistencia. Se prosiguen dos estrategias paralelas:

1) Por un lado se intenta introducir y expresar las respectivas cápsides virales en papa (cross protection). Se dispone ya de tres construcciones constituidas por los genes de cápside de PVX y PVY bajo el control del promotor constitutivo doble del transcripto 35S del CaMV.

2) Por otro lado se intenta inhibir la replicación viral por expresión constitutiva en la planta de transcriptos de polaridad negativa que corresponden a regiones del genoma consideradas clave en el ciclo de replicación. Se dispone de tres construcciones "antisentido" (bajo la dirección del promotor doble arriba mencionado) de la región 5' no codificante del genoma de PVX y PVY y de la región 5' del mensajero subgenómico de la cápside viral de PVX. Para ello se realizó el subclonado en vectores de tipo Ri de agrobacterias.

- D . 3 -
Aún no iniciada.

P L R V

Servicio E.- Establecimiento de las técnicas de transformación de papa de interés para Argentina.

Puesta a punto de tecnología de regeneración y transformación de cultivares de papa de uso local:

Paralelamente se realizaron experimentos de puesta a punto de transformación y regeneración de los cultivares de papa Huinkul MAG y Spunta (de uso en Argentina) y Alfa (de uso en México).

Ya han sido determinadas las condiciones que permiten regenerar plantas a partir de discos de hojas y minitubérculos. Se realizaron ensayos de transformación de discos de hoja y, en menor medida, de cortes de minitubérculo variando los métodos de infección y utilizando distintas cepas de Agrobacterias capaces de transferir a la planta marcadores genéticos de fácil identificación (resistencia a antibióticos y herbicidas y expresión de glucuronidasa). Estas condiciones se utilizarán para la transferencia de las quimeras descritas y de otros genes de interés.

Ensayo de regeneración a partir de discos de tubérculo: Se realizó un ensayo de regeneración utilizando mini tubérculos libres de virus obtenidos en invernadero, del cultivar de mayor utilización en la Argentina, Spunta.

El primer paso fue la determinación de las condiciones de esterilización superficial del tubérculo. Para ello se ensayaron tres tratamientos. En todos ellos, primero se lavan los tubérculos con detergente y cepillo. Se pelan y se tratan con alcohol 70% durante un minuto. Luego se tratan con:

- a) lavandina 0,6%, tween 20 0,1% durante 20'
- b) lavandina 1,2%, tween 20 0,1% durante 20'
- c) lavandina 1,2%, tween 20 0,1% durante 35'.

Se toma la parte central con un sacabocados estéril, se cortan las rodajas y se colocan en un medio con las sales y vitaminas MS, sacarosa 3%, agar 5,5 g/l pH 5,7.

El tratamiento c) fue el que dió mejores resultados, ya que no hubo contaminación con bacterias y hongos sobre las rodajas de papa como se observó en los tratamientos a) y b).

Una vez que se determinaron las condiciones de esterilización, se realizó un experimento que consistió en determinar las condiciones óptimas de regeneración del cultivar Spunta a partir de rodajas de tubérculo.

En 1989 Cornelissen realizó una tarea similar para las variedades europeas Bintje, Désiree y Escort, en donde determinó, luego de probar distintas hormonas (kinetina, ac. naftalenacético, ac. indolacético, ribósido de zeatina) que las hormonas y concentraciones adecuadas eran: 10 μM Zeatina/1 μM IAA para Escort y Bintje, y 5 μM Zeatina/0,3 μM IAA para Désiree.

Luego de una esterilización superficial (según el tratamiento c)) de tubérculos de Spunta, se colocaron las distintas rodajas de unos 0,9 cm de diámetro y 2 mm de espesor en 7 medios diferentes según las concentraciones de hormonas utilizadas. Todos los medios contenían los macro y micronutrientes y vitaminas de MS, sacarosa 3%, agar 5,5 gr/lt. Ver la Tabla N01:

Tabla N01:

IAA (μM) \ ZEA (μM)	0	5	10
0	10*	-**	15
5	-	15	15
10	15	15	15

* indica número de rodajas de tubérculo por tratamiento.

** indica concentraciones no ensayadas.

A los 14 días de iniciado el tratamiento, se observó la aparición de callos en las concentraciones ZEA 10/IAA 10, ZEA 10/IAA 5, ZEA 5/IAA 10, y ZEA 5/IAA 5. No se observó aparición de callos en las concentraciones ZEA 0/IAA 0, ZEA 0/IAA 10, ZEA 10/IAA 0.

A los 35 días los callos eran verdes y de un diámetro de entre 1,5 y 2,5 cm. No se diferenció ningún brote a partir de estos callos.

A los 35 días se observó la aparición de microcallos en el 100% de las rodajas de tubérculos que estaban bajo el tratamiento de ZEA 10/IAA 0. Una semana después, surgieron brotes a partir de todos estos microcallos. Cuando los brotes alcanzaron un tamaño de unos 10 cm se los separó de las rodajas de tubérculo con un bisturí y se los transfirió a medio de enraizamiento. A los 15 días, todos los brotes enraizaron. El tratamiento con zeatina 10 μM /IAA 0 fue, por lo tanto, el de elección para el ensayo de transformación que se describe a continuación.

Ensayo de transformación de discos de tubérculo: Al igual que el ensayo anterior se utilizaron mini tubérculos de Spunta y las mismas condiciones de esterilización superficial y manipuleo.

Para la transformación se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens*

C58C1 rifr (pGSFR1280). Como control se utilizó la cepa de Agrobacterium tumefaciens C58C1 rifr (pGV2260). Se realizó la coinfección de 60 rodajas control y 60 rodajas con la cepa que contiene el plásmido pGSFR1280 que confiere resistencia a kanamicina. A continuación se transfirieron a tubos sin presión de selección (20 rodajas) o con presión de selección. Se ensayaron dos concentraciones de kanamicina (kan): 25 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$ (20 rodajas en cada concentración).

El relevamiento realizado al mes arrojó los siguientes resultados (ver tabla No2).

Tabla No2:

		km 0	km 25	km50
pGFSR1280	A	12 (60%)	15 (75%)	18 (90%)
	B	4 (20%)	2 (10%)	0
	C	4	4	2
	D	15 (20%)	8 (15%)	2 (10%)
pGV2260	A	7 (35%)	16 (80%)	20 (100%)
	B	6 (30%)	0	0
	C	7	4	0
	D	15 (35%)	16 (20%)	0

A: rodajas necrosadas.

B: rodajas verdes; tejido vivo.

C: rodajas que dieron lugar a callos.

D: rodajas que dieron lugar a brotes.

Como se observa en la tabla, en ambos casos hay una mayor proporción de necrosis a medida que la presión de selección aumenta. Además un 10% de rodajas coinfectadas con las bacterias que contienen el vector que confiere resistencia a kanamicina son capaces de generar callos y/o brotes a altas concentraciones de kanamicina.

Las rodajas coinfectadas con el vector control no fueron capaces de dar lugar a callos y/o brotes en 50 $\mu\text{g/ml}$ de kan, por lo que se usará en lo sucesivo ésta concentración de kan. como presión de selección.

Todos los brotes fueren transferidos a medio de enraizamiento con 50 $\mu\text{g/ml}$ de kan. Si alguno logra a enraizar en esta concentración de kan, se ensayarán concentraciones mayores y se harán las pruebas necesarias para confirmar transformación.

Ensayo de transformación de discos de hojas de papa: Se siguió un protocolo proporcionado por la Dra. Aileen O'Connor del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (Instituto Politécnico Nacional), Irapuato, México, con el que tenemos colaboración. Se trabajó primero con la variedad europea Desirée y luego con las variedades Huinkul MAG y Alfa. Para la transformación se utilizó la cepa de Agrobacterium tumefaciens C58C1 rifr(pGSFR1280).

Se hicieron dos tipos de controles. Por un lado se hizo una infección simulada siguiendo todos los pasos detallados en el protocolo pero sin agregar el Agrobacterium. Por otro lado se realizaron coinfecciones con la cepa de Agrobacterium tumefaciens C58C1 Rifr (pGV2260) Se utilizaron 36 discos de hoja en cada uno de los tres tratamientos (transformación y dos controles). Luego de dos días de coinfección, se colocaron 18 discos de cada tratamiento en tubos con un medio sin kanamicina (sin presión de selección) y 18 discos en tubos con medio al que se le agregó 50 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de kanamicina (con presión de selección). Es importante subcultivar los explantos cada semana.

- A las tres semanas se observó aparición de pequeños callos sobre los bordes de los explantos de todos los tratamientos que se encontraban sin presión de selección, así como aquellos con presión de selección previamente coinfectados con Agrobacterium, mientras que no se observaron callos y sí un leve amarillamiento en los explantos controles sin inocular que se encuentran en un medio con kanamicina. Para las rutinas de transformación se utilizó el sistema de cocultivo de Agrobacterium sp. con hojas de plántulas crecidas "in vitro". Se lograron eficiencias de regeneración de brotes a partir de hojas del 70% para el cultivar argentino Huinkul, del 80% para el cultivar europeo Desirée y del 100% para el cultivar mexicano Alfa utilizando 2 mg/lt de zeatina. El ensayo de glucouronidasa (cuando se utilizó un vector conteniendo este gen marcador) dio positivo en el 60% de las plántulas regeneradas indicando su transformación. Por este motivo se eligió esta metodología para los ensayos posteriores.

Servicio F.- Transformación de plantas de papa

F.1- PVX

En la actualidad se cuenta con dos plantas regeneradas en medio selectivo (km 50 µg/ml) obtenidas a partir de hojas de Alfa coinfectadas con el vector pGSH163 que lleva el gen de la toxina de Bacillus thuringiensis (BT 884) bajo el control del promotor PTR2 y el gen de la neomicina fosfotransferasa (NPTII) bajo el promotor PTR1.

Se realizaron ensayos para detectar tanto actividad enzimática de NPTII (por detección en fase sólida de neomicina fosforilada por un extracto de proteínas totales y gamma ATP) como la presencia de este gen por la técnica de PCR (polymerase chain reaction).

Se están micropropagando plantas de Huinkul MAG y de Alfa conteniendo construcciones con el gen Bt de Bacillus thuringiensis y de Bintje con el gen de cápside de PVX.

F.2- PVY

A punto de iniciarse.

F.3- PLRV

Aún no iniciada

F.4- Entrenamiento

Se informa en el punto III (intercambios e interacciones).

II> presentaciones a congresos y publicaciones.

a) Congresos

- HOPP HE, A ARESE, BE ORMAN, F BRAVO ALMONACID, L HAIM y AN MENTABERRY (1989) Diagnóstico de virosis de papa por hibridación molecular. XIV Reunión de la Asociación Latinoamericana de la Papa, Comun. 19, p.15 del Libro de Resúmenes, 5-11 marzo 1989, Mar del Plata.

- ARESE AI y HE HOPP (1989) Uso del sistema biotina-estreptoavidina para la inmunodetección de virus de papa por ELISA. Ibid, comun. 18, p.14 Libro de resúmenes, Mar del Plata.

- SALADRIGAS MV, MF CERIANI, A TOZZINI y HE HOPP (1989) Replicación de PVX en protoplastos de papa. Ibid. Comun. 17, p.14, Mar del Plata.

- HOPP HE, AI ARESE, BE ORMAN, F BRAVO ALMONACID y AN MENTABERRY (1989) Diagnosis of potato viruses by molecular hybridization using PVX, PVY and PLRV cDNA clones. Ibid, Comun. S12-033 Libro de Resúmenes, La Habana, Cuba.

- SALADRIGAS MV, MF CERIANI, A TOZZINI y HE HOPP (1989) Replication of PVX in potato protoplasts. Ibid, Comun. S12-032 Libro de Resúmenes, La Habana, Cuba.

- SALADRIGAS MV, MF CERIANI, AC TOZZINI y HE HOPP (1989) Efecto del gen Rx en la inhibición de la replicación de PVX en protoplastos de papa. Ibid, Res. 239 p. 96, Buenos Aires.

- TOZZINI AC, MF CERIANI, MV SALADRIGAS, AI ARESE y HE HOPP (1989)

- Genes de resistencia contra PVX en distintos genotipos del género Solanum. 12a Reunión Científica Anual de la SAV (Sociedad Argentina de Virología), Res. 4.6 p. 28, Buenos Aires.
- SALADRIGAS V, F CERIANI, A TOZZINI y E HOPP (1990) Expression of resistance gene Xi in Solanum tuberosum protoplasts infected with PVX. Ibid, Res. No. 941.
- DEL VAS M, A ESCANDON y E HOPP (1990) Regeneración de plantas de papa del cultivar Spunta para utilización en experimentos de transformación genética. Presentado a la XXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Resumen No263, Mar del Plata 25-27 noviembre.
- BRAVO ALMONACID F, A ARESE, E HOPP y A MENTABERRY (1990) Obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína de fusión proteína A de S.aureus/cápside de PVY. Ibid, resumen No 74, Mar del Plata 25-27 noviembre 1990.
- CERIANI MF, MV SALADRIGAS, AC TOZZINI y HE HOPP (1990) "Resistance to replication of PVX in protoplasts of a Solanum acaule clone" Actas del Simposio Internacional en Virosis Vegetales, organizado por la IFS (International Foundation for Science, Suecia) y el Instituto de Fitovirología INTA- Córdoba, Villa Carlos Paz, Córdoba, Revista de Investigaciones Agropecuarias INTA (en prensa).
- DEL VAS M, MF CERIANI, AS ESCANDON y HE HOPP (1991) Puesta a punto de la transformación genética de papa. Ibid p.82, Vaquerías, Córdoba.
- SALADRIGAS MV, P CRAMER y HE HOPP (1991) Uso de protoplastos para el estudio de la expresión de genes de resistencia a virus a nivel celular. Ibid p.85, Vaquerías, Córdoba.
- BRAVO ALMONACID F, A ARESE, E HOPP y A MENTABERRY (1991) Caracterización de antisuero contra la proteína de fusión proteína A de S.aureus/cápside de PVY. Ibid p.89, Vaquerías, Córdoba.
- TOZZINI AC, MF CERIANI, MV SALADRIGAS y HE HOPP (1991) Identificación y caracterización de genotipos resistentes a PVX en germoplasma de Solanum utilizando plantas micropropagadas y protoplastos, Ibid p.98, Vaquerías, Córdoba.

PUBLICACIONES

- BRAVO ALMONACID F y AN MENTABERRY (1989) Nucleotide sequence for PVY 3'end genomic RNA. Nucl. Acids Res. 17: 4401
- SALADRIGAS V, F CERIANI, A TOZZINI y HE HOPP (1990) Expression of resistance gene Xi (Rxacl) in Solanum tuberosum protoplasts infected in vitro with PVX (potato virus X). Plant Physiol. (Suppl.) 93: 161.
- CERIANI MF, MV SALADRIGAS, AC TOZZINI y HE HOPP (1990) Resistance to replication of PVX in protoplasts of a Solanum acaule clone. Proceedings of the International Foundation for Science, Sweden and INTA, Argentina: Seminar on Plant Viruses. Rev. Investig. Agropec. 22(1): 22-30.
- SALADRIGAS MV, MF CERIANI, A TOZZINI, AI ARESE y HE HOPP (1990) Potato gene Xi confers inoculum dependent resistance to potato virus X replication in protoplasts. Plant Cell Physiol. 31(6): 749-755.
- TOZZINI A, MF CERIANI, MV SALADRIGAS y HE HOPP (1991) Extreme resistance to potato virus X infection in wild tuber bearing Solanum species. Potato Research (en prensa).
- HOPP HE, L HAIM, F BRAVO ALMONACID, AI ARESE, A TOZZINI, MF CERIANI, MV SALADRIGAS, B ORMAN, R CELNIK, M del VAS y AN MENTABERRY (1991) Development and application of a non-radioactive nucleic acid hybridization system for the simultaneous detection of four potato pathogens. J. Virol. Meth. 31 (1): 11-30.
- SALADRIGAS MV, P CRAMER y HE HOPP (1991) Use of cationic liposomes for infection of potato protoplasts with virus particles or RNA. Enviado para publicación a J. Virol. Meth.

III>- Intercambios e interacciones con otros países participantes del

• proyecto.

- Se envió al Dr. Luis Herrera Estrella varios clones bacterianos conteniendo un plásmidos recombinantes con construcciones capaces potencialmente de conferir resistencia a PVY.
- Viaje y estadía de Mariana del Vas a México, estudiante de doctorado argentina, para realización de experimentos de transformación de papa, subclonado y caracterización del genoma de PLRV en el marco del proyecto conjunto y en cumplimiento del contrato con ONUDI.

IV>- Evaluaciones de cumplimiento de Argentina y del proyecto en su conjunto.

En lo referente al cumplimiento de Argentina puede desprenderse de la lectura del punto I que se cumplió con creces la gran mayoría de lo comprometido, con excepción de partes de los puntos D y F (el D.3 y el F.2 recién se inician, y el F.3 aún no se inició). En ambos casos se previó (ver actividades 3.3. PLRV, 3.4.2. PVY y PLRV del anexo I, proyecto global) que debían continuar en el tercer año del proyecto, aunque se supuso que partiendo de un grado mayor de avance de lo realizado en el segundo año).