



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

19982

S.P.
T.M.
J.M.
A.M.

PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PARA AMERICA
LATINA Y EL CARIBE DP/RLA/83/003

RESISTANCE TO VIROSIS IN POTATO: DEVELOPMENT OF PLANTS BEARING
RESISTANCE TO POTATO VIRUS PVX, PVY AND PVS BY COMBINED
MOLECULAR AND IN VITRO CULTURE TECHNIQUES*

INFORME FINAL

CONTRATO No. 90/94
Instituto de Investigaciones Biológicas
"Clemente Estable"
Montevideo, Uruguay

3751

1992

2280
1974

INFORME DE AVANCES

Técnico administrativo

Titulo: "RESISTENCIA A VIROSI EN PAPA"
N.º OP/ELIA/22800

Contrato: 06/094

Participantes: División Citogenética
Instituto de Investigaciones
Biológicas C. Estable (IIBCE)

Periodo: Primer Reporte Técnico y
Reporte Técnico Final

RENTEN DE ACTIVIDADES REARRILLADAS

1. COORDINACION DE ACTIVIDADES

La coordinación de actividades se llevó a cabo fundamentalmente con el laboratorio del Dr. Esteban Hopp (INTA Cartolar, Argentina), en la búsqueda de la mejor estrategia para la incorporación de la tecnología de RFLPs a la identificación de elementos de resistencia a virus en los cultivos de interés. Se discute la conveniencia de trabajar con el sistema de la soja y con que material se trabajará con resistencia a PVY y otros materiales con las mismas características de los clones de periplasma accesibles. Se sugiere también continuar con la exploración de las posibilidades del papa con técnicas de amplificación de ADN in vitro por PCR utilizando diversos tipos de primers al azar.

El abaco firmante, Dr. Mario Stali se desempeña desde junio de 1991 como responsable de la unidad de Biotecnología de la Estación Experimental Los Brules de INIA. Esta nueva situación, que es la causa fundamental de la demora en la presentación de este informe introduce sin embargo nuevas posibilidades para la mejor ejecución del programa propuesto, especialmente en su última fase. Se amplió la capacidad de cultivo "in vitro", transformación y regeneración de plantas transgénicas, así como la de ensayos de evaluación en invernáculo y a campo. Estos aspectos se discutieron en la última reunión de coordinación en Buenos Aires.

Se propuso transferir el contrato del último año a INIA para el mejor aprovechamiento de la nueva infraestructura y capacidad de investigación.

Otras actividades incluyeron: 1) el envío de la genoteca genómica parcial en el fago lambda EMBLE 3 al Dr. Montalery en INGBI Bs.As.

2. Desarrollo de marcadores de ADN para determinación de polimorfismos en fragmentos de restricción (RFLPs)

Se obtuvieron una serie de sondas marcadas en el genoma de *Solanum tuberosum* provenientes de tomate cedidas por el Dr. E. Tanksley (serie TG) cuya información se adjunta.

2.1. Amplificación de las sondas y clones.

Se transformaron células competentes de *E. coli* JM 109 con los vectores mencionados. Se seleccionaron los transformantes en medio selectivo y se amplificaron por métodos ya descritos en el informe anterior.

Una vez extraídas las sonda se digirieron con los enzimas adecuados para verificar por clones de las inserciones clonadas. También los clones se almacenaron en glicerol para su conservación.

2.2. Extracción de ADN

Se extrajo ADN de 40 diferentes genotipos entre variedades y líneas del programa de mejoramiento de la Estación Experimental Los Brucos y especies silvestres provenientes del banco de germoplasma de Bolivia y Argentina.

Se extrajo ADN de diez plantas correspondientes a líneas isogénicas en desarrollo resistentes o sensibles a la infección por los virus PVX y PVY.

También se extrajo ADN de 10 plantas F1 del cruzamiento 7594.2 X 7595.1.

Adjuntamos lista de los materiales de los que se extrajo el ADN y que fueron utilizados en las transferencias.

2.3. Testado de las sondas sobre transferencias de ADN.

Se testaron varias de las sondas de la serie TG (Fig. 1), así como sondas control de clones de genes ribosomales de papa (Fig. 2). Debido al excesivo número de polimorfismos y al costo relativo de la tecnología en reactivos y mano de obra se decidió en conjunto con los colegas de laboratorios continuar la búsqueda de polimorfismos con sondas polimerizadas e iniciar los ensayos con la tecnología del PCR utilizando diversos primers. Los resultados de la fase de RFLPs se comunicaron a la VI Reunión de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (Ver comunicaciones).

2.4. Utilización de sondas polimerizadas sobre transferencias de ADN.

Como mencionabamos en el informe anterior los resultados con las sondas 22.6 y 22.15 parcialmente cedidas por el Dr. A. Jeffreys, mostraron en los primeros experimentos resultados no concluyentes, que no se pudieron mejorar variando las condiciones de hibridización y lavado, por lo que este ensayo fue desechado por el momento.

2.5. Búsqueda de polimorfismos a través de la amplificación del ADN por la técnica de PCR.

Se ensayó en primer lugar la técnica en forma manual, utilizando pares de primers de secuencias inespecíficas de 14 y 18 pb, para amplificar al por regiones del genoma. Los fragmentos amplificadas de esta manera no separaron en gel de agarosa al 2 % y brindaron patrones de bandas características para cada variedad y especie: AP119 (polimorfismos en el largo de los fragmentos amplificadas). (Fig.3).

Posteriormente se ensayaron primers únicos de secuencia variable y de pequeño tamaño (décamos), de acuerdo a la técnica de (Williams et al 1990), los que brindaron patrones aún mas interesantes. (Fig.4)

Se ensayó la repetibilidad del método, con diferentes condiciones cinéticas y de concentración de reactivos.

Las condiciones típicas de experimentación son:

Vol de reacción	25 ul
ADN	25 ng
Buffer 10 x	5 ul
Primer único	20 pM
Deoxinucleótidos	100 uM
Taq Pol I	1 U

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
	Desnaturalización	60 seg	94 °C
	Primerado	45 seg	36 °C
	Extensión	60 seg	72 °C

Numero total de ciclos 45

Este ensayo también fue utilizado para analizar líneas isocénicas de Solanum resistentes y sensibles a la infección por el virus PVX. Fig. 5.

La metodología de los AFLPs ha demostrado ser una muy versátil herramienta en la exploración de polimorfismos genómicos. Este es un método repetible, rápido, pasible de automatización, óptimo para trabajo con gran número de muestras y con un costo sensiblemente menor a las demás metodologías ensayadas, tanto en tiempo como en insumos materiales y humanos. Por todas estas razones consideramos este como el ensayo de elección para desarrollar en nuestro laboratorio en el marco de este proyecto.

Los resultados preliminares de estos trabajos fueron comunicados a las VI Jornadas de la sociedad Uruguaya de Biotecnología, al Primer Simposio Argentino de Biotecnología Vegetal y parcialmente al II Simposio Latinoamericano sobre Recursos Genéticos de Especies Hortícolas y XIV Congreso Argentino de Horticultura de Mar del Plata.

2. Desarrollo de programas de computación apropiados para la interpretación y generación de resultados.

Programas en desarrollo:

1) POLIMORF. Diseñado para almacenamiento de datos de sondas, blots e individuos.

2) STATCAD. Análisis estadísticos de cadenas de ADN

3) MUTA y SIMMUT, fueron diseñados para simulación de incorporación de mutaciones a una cadena de ADN y para el trabajo estadístico con ellas.

4) SORTA y CONV, permitieron solucionar problemas de conversión y transformación de datos entre diferentes formatos de secuencias de ADN.

Los programas mencionados se pusieron a disposición de los investigadores del proyecto para su evaluación y comentarios. Se adjuntan los protocolos explicativos.

de las variaciones de mutabilidad de los genes de capsido de PVX transferidos por métodos de ingeniería genética al genoma de papa.

Como resultado de este trabajo se realizó el análisis genético del efecto que sufrirían secuencias de capsido del virus PVX al ser introducidas al genoma de papa, en el curso de su transformación experimental en vista a comprender mejor su conducta específica.

De por lo que la hipótesis de que estos genes virales al ser introducidos en el genoma genómico de papa altamente metilada, sufrirían del efecto del decaimiento de la 5 metilación de timina. La comparación entre las mutaciones observadas entre las secuencias de los genes de capsido pedidos por los esperables que ocurren de acuerdo a nuestra hipótesis de trabajo, nos permitirán llegar a algunas conclusiones:

1) El patrón de mutación esperada es diferente del patrón actual como surge de la comparación de secuencias de cápsidos. Las mutaciones esperadas afectarían con más frecuencia zonas actualmente conservadas y probablemente importantes para la función de la proteína de capsido.

2) El decaimiento de las metilaciones en timina originario también aminocídicos y la aparición de codones stop, los que redundaría en una pérdida total o parcial de la eficiencia de estos transgénicos.

3) Este decaimiento en aquellas plantas no sometidas a una presión de selección inactivaría dichos genes, así como los eventualmente transferidos a otras especies emparentadas.

Las conclusiones de este trabajo fueron presentadas en las VI Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias.

TC kit info

LOCUS	SIZE	VECTOR	CLONING SITE	CHR NO.	PROBLEMS	drug resist
• TG16	1900 BP	pUC8	ECO RI	8		AMP
TG18	1900 BP	pUC8	ECO RI	9		AMP
TG20	2300 BP	pUC8	PST I	7		AMP
TG22	2700 BP	pUC8	PST I	4		AMP
• TG23	2500 BP	pUC8	PST I	5		AMP
• TG24	2500 BP	pUC8	PST I	1		AMP
TG26	1800 BP	pUC8	PST I	12		AMP
• TG30	2000 BP	pUC8	ECO RI	11		AMP
• TG31	2400 BP	pUC8	PST I	2		AMP
• TG35	2300 BP	pUC8	PST I	9		AMP
• TG43	2300 BP	pUC8	PST I	10		AMP
• TG45	2000 BP	pUC8	ECO RI	8		AMP
• TG47	1900 BP	pUC8	ECO RI	11	EcoRI/BamHI to get insert	AMP
• TG48	1500	pUC8	ECO RI	2	EcoRI/BamHI to get insert	AMP
• TG53	2100 BP	pUC8	PST I	1		AMP
• TG51	2100 BP	pUC8	PST I	7		AMP
• TG63	2000 BP	pUC8	PST I	10		AMP
TG68	1900 BP	pUC8	ECO RI	12		AMP
• TG69	5300 BP	pUC8	ECO RI	5		AMP
• TG71	2200 BP	pUC8	ECO RI	1		AMP
TG94	1100 BP	pUC 9	SRC/PST	3		AMP
• TG115	2500 BP	pUC 8	PST I	6		AMP
TG118	2500 BP	pUC 8	PST I	6		AMP
TG123	2100 BP	pUC 8	PST I	4		AMP
• TG130	1700 BP	pUC 8	PST I	3		AMP
• TG134	2500 BP	pUC8	PST I	3		AMP

LISTA DE GENOTIPOS EXTRAIDOS EN EL LABORATORIO (IIBCE)
ORIGEN : VILARO (E.E.L.B)

- 1) NISHYSHUTAKA
- 2) FAVORITA
- 3) NORLAND
- 4) MACACA
- 5) 384115
- 6) 384521.22
- 7) 385071.24
- 8) 385128.1
- 9) LBT 8810.1
- 10) LBT 8009

10

S. ACAULE

- 35 RX4
- 35 RX6
- 35 RX7
- 35 RX9
- 35 RX16
- 35 RX9
- 35 RX10
- 35 RX15
- 35 SX6
- 35 SX8
- 35 SX12
- 35 SX13

San

0

PHUREJA DIPLOIDE

12

W 5281.2 X 7506.1 - 1 al 10

BANCO DE GERMOPLASMA DE BALCARCE

SERIE

ESPECIES

ETUBEROSA
ACAULIA

- S. EREVIDENS
- S. ACAULE SP ACAULE
- " " SP AEMULANS

→ Saqueac

MEGISTACROLOBA

- S. MEGISTACROLOBUM
- S. EOLIVIENSE
- S. SANCTAE-ROSAE

COMMERSONIANA

- S. COMM SP COMMERSONII
- S. COMM SP MALMEANUM

CUNEOLATA

- S. INBUNDIBULIFORME
- S. INCAMAYOENSE
- S. GOURLAYI SP GOURLAYI
- S. MIC SP MICRODONTUM
- S. MIC SP GIGANTHOPHYLLUM

TUBEROSA

- S. VENTURII
- S. CKADAE
- S. VERNEI

S. ... OCENSE

Yuzuboo 2R 19. PV

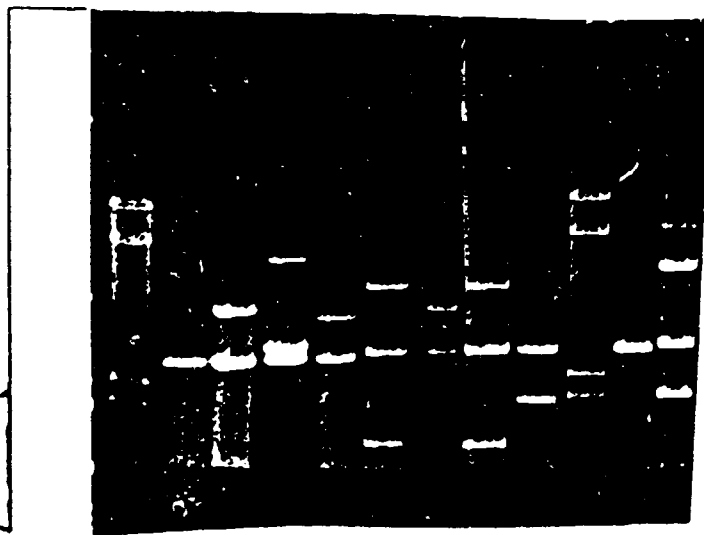


Fig. 3



Sonda Ribosomal

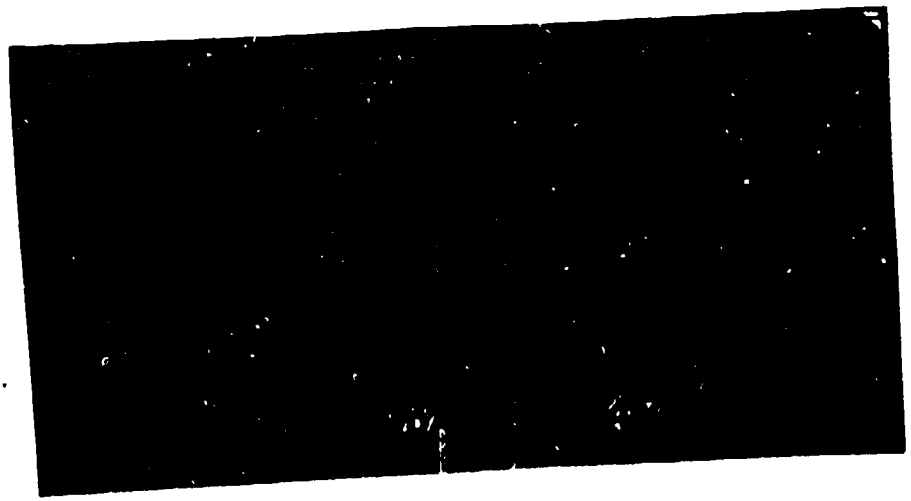


Fig ③

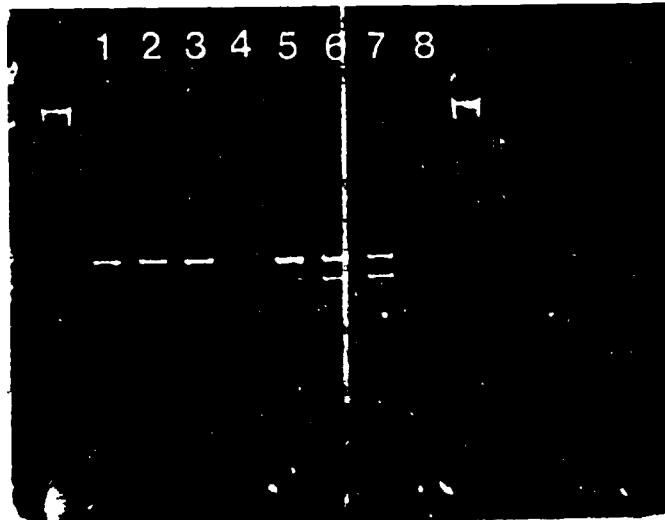
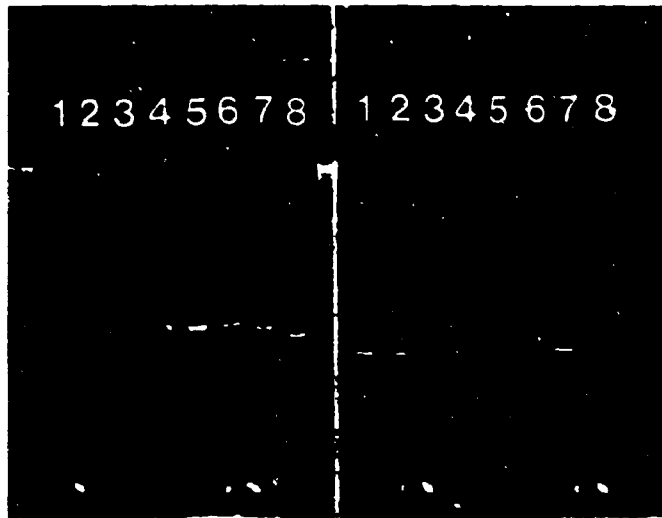


FIGURA NUMERO 3. SERIE DE 17 GENOTIPOS (15 ESPECIES Y 2 SUBESPECIES) a. PRIMER A 04
b. PRIMER A 06

CARRIL / 1: LHE 2: ACA 3: BRE 4: CCM 5: CMM 6: GOU
7: HAN 8: HAW 9: INC 10: KUR 11: MGG 12: MMC
13: OKA 14: OPL 15: SAN 16: SPZ 17: TAN 18: VER
19: LAMBDA HE (idem 1)

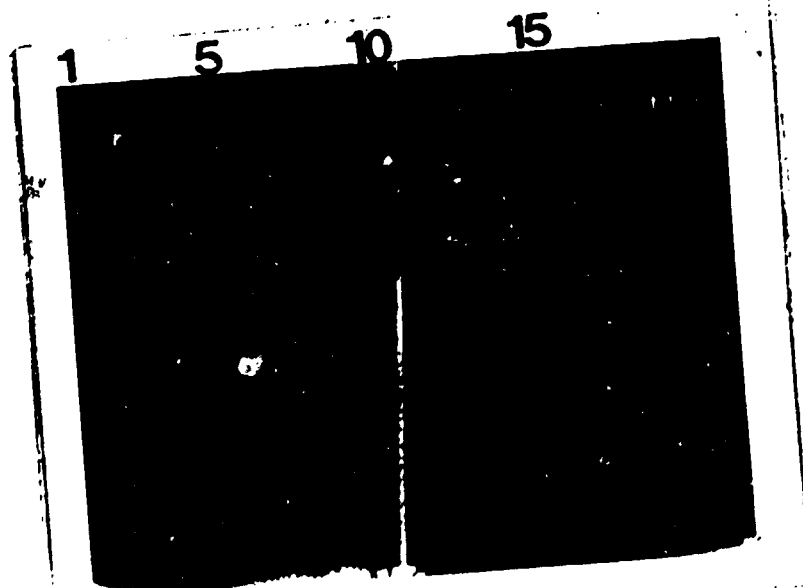
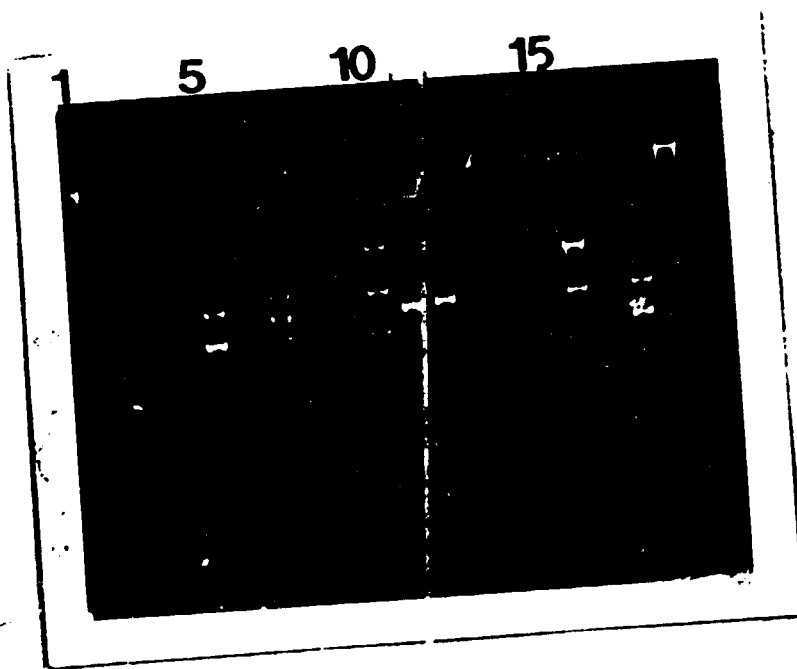
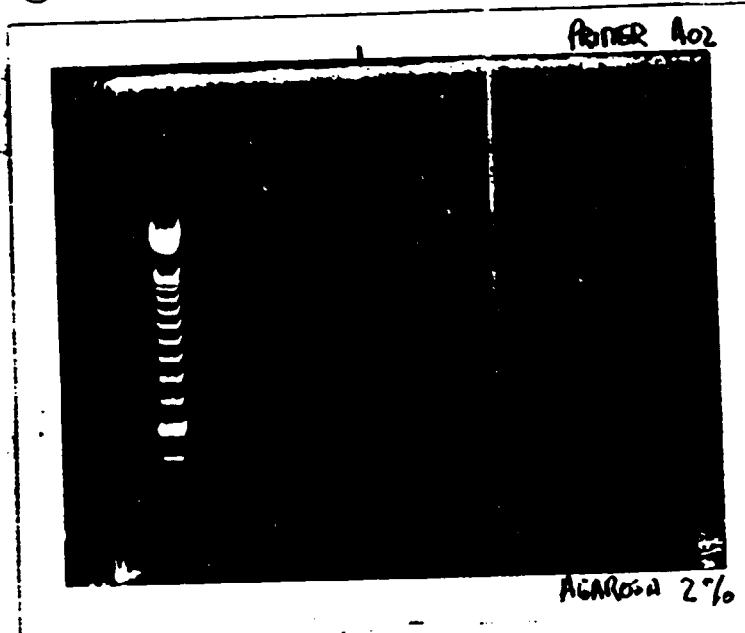


Fig (4)



FECHA: 11 - XI -

TIPO: "Lineas isogen"

ESPECIE: S. aca

CONSULTAR: ALF

ANG

HERR

ADN:

- 1) 14 SX 6
- 2) 14 SX 8
- 3) 14 SX 12
- 4) 38 RX 4
- 5) 35 RX 7
- 6) 35 RX 9

MARCADOR (WT):

"LADDER"

AGAROS:

2 %

MA CONDICIONES DE P.C.R.:

- 1) Temp. 94° .2'
- 36° .15"
- 72° .1'

2) N° CICLOS: 44

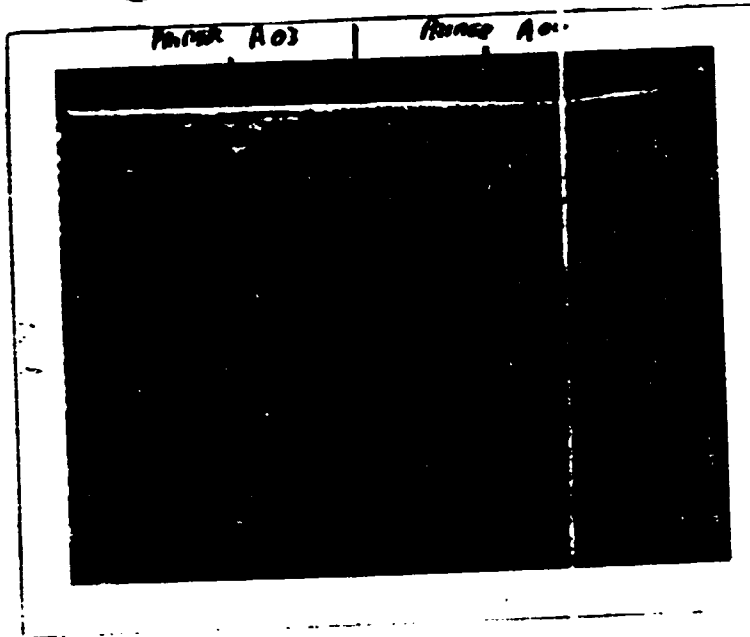
3) [ENZ], 1U / reacción

4) PRIMER:

DECAHERO

A-C

Fig ④



FECHA:

TIPO:

ESPEC:

CONSU:



ADN:

- 1) 14 SX 6
- 2) 14 SX 8
- 3) 14 SX 12
- 4) 35 RX 4
- 5) 35 RX 7
- 6) 35 RX 9

INDICADOR:

Λ / Hind III

ADN:

- 1) 14 SX 6
- 2) 14 SX 8
- 3) 14 SX 12
- 4) 35 RX 4
- 5) 35 RX 7
- 4) 35 RX 9

CONDICIONES DE P.C.R.:

- 1) TEMP. 94° 2'
- 36° 45'
- 72° 1'

2) N° c:

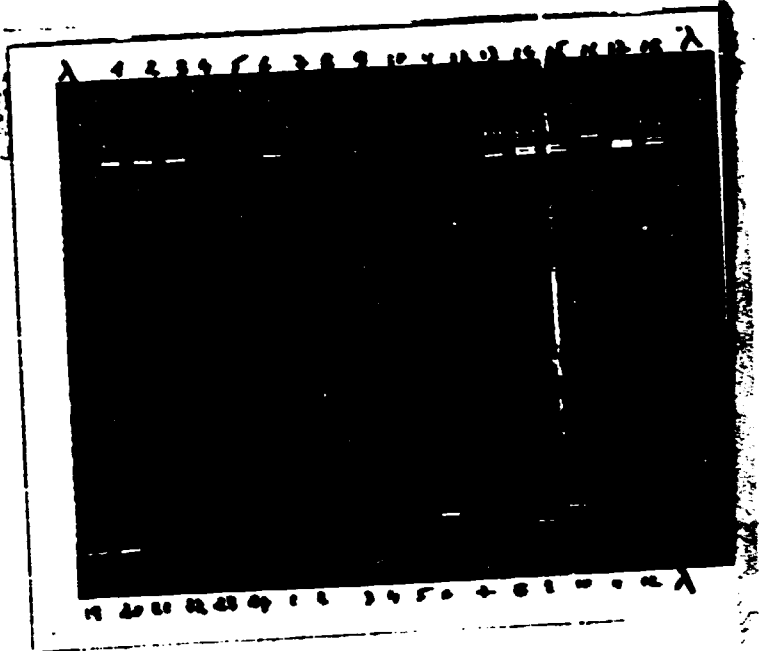
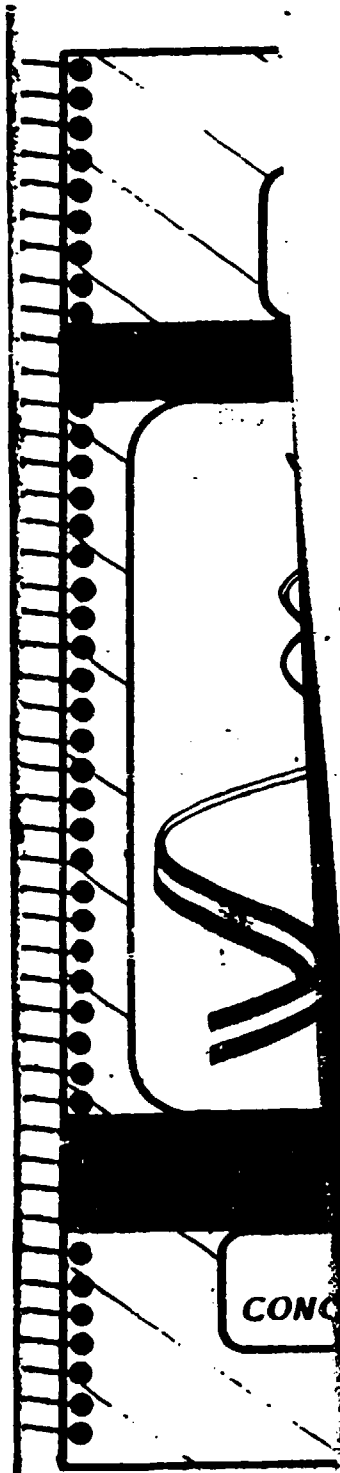
1) TEMP:

- 3) [enz.]:
- 5) [ADN]:

3) [enz] 1U / sección

4) PRIM:

DECAM:



ADN:

- | | |
|-------------|----------------------|
| 1) 14 5x 6 | 7) petunia |
| 2) 14 5x 8 | 8) espina de la cruz |
| 3) 14 5x 12 | 9) ginkgo biloba |
| 4) 35 2x 4 | |
| 5) 35 2x 7 | |
| 6) 35 2x 9 | |

CONDICIONES DE P. C. R:

- 1) TEMP: 94°
36°
72°

2) U°

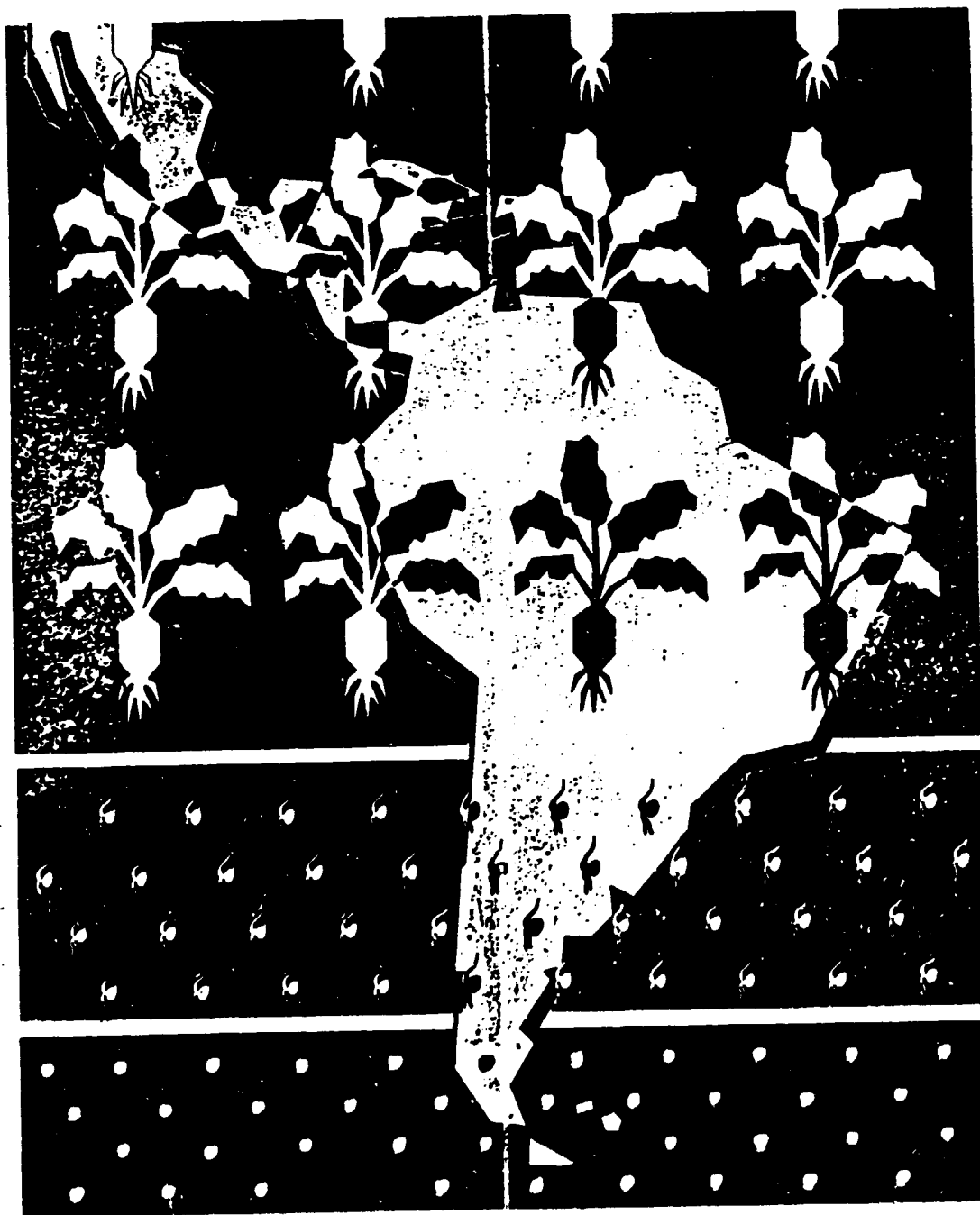
3) [enc.] : 1U / sección

4) P2
D5

5) [ADN]:

PRIMER	ADN	1)	2)	3)	4)	5)	6)
-05		1	1	1	1	1	1m'
-06		1	1	1	2	2	2m'
-07		2	2	2	1	1	1,1
-08		2	2	2	2	2	2,1

**II Simposio Latinoamericano sobre Recursos
Genéticos de Especies Hortícolas
XIV Congreso Argentino de Horticultura**



22 al 27 de Setiembre 1991 - Mar del Plata

A R G E N T I N A

UTILIZACION DE TECNICAS MOLECULARES BASADAS EN PCR PARA
EVALUACION DE DIVERSIDAD GENOMICA EN GERMOPLASMA
DE PAPA Y AJO

Capdevielle, F. (1); Martino, A. (2); Lago, H. (1); Bruzzoni, H. (2);
Clausen, A. (3); Latorre, L. (2); Ureta, A. (2) y M. Stoll (1)
(1) Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA)-
URUGUAY/ (2) Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente
Estable (IIBCE)-URUGUAY/ INTA-Balcarce-ARGENTINA

El manejo eficiente del germoplasma colectado presenta como limitante la dificultad existente para evaluar en forma directa la diversidad genómica a nivel de poblaciones y ecotipos incorporados a una colección (presencia de duplicados, reducción del número de accesiones y limitada regeneración de progenies intraespecíficas).

El presente trabajo analiza la utilización de polimorfismos a nivel de loci genómicos identificados por oligonucleótidos y amplificados por PCR (reacción en cadena de polimerasa de ADN), distribuidos aleatoriamente en los genomas analizados.

Se evaluaron 15 especies de *Solanum* L. tuberíferos provenientes de INTA-Balcarce, incluyendo variación a nivel subespecífico e intrapoblacional, y 20 ecotipos de ajo (*Allium sativum* L.) colectados en Uruguay.

Los resultados obtenidos son consistentes con la utilización del método de amplificación de "primers" al azar como estimadores de diversidad genética inter e intraespecífica. Los fragmentos amplificados en base a diferentes "primers"-evidenciados por electroforesis-fueron analizados como loci genómicos diferenciales utilizando el programa NTSYS, estimando los valores de agrupamiento para cada patrón de bandas.

Las aplicaciones del método en caracterización y manejo del germoplasma de papa y ajo son discutidas como aportes biotecnológicos en programas de mejoramiento y conservación de recursos fitogenéticos.

II - Genética Molecular, Microbiana y Mutagénesis (P)

INDUCCION DE LA ESCISION PRECISA DE Tn10 POR AGENTES MUTAGENICOS
Levy, M.², Pomposiello, P. y Nagel, R. CEFYBO, CONICET y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.

En este trabajo se observó que la radiación UV induce un aumento de hasta aproximadamente 100 veces en la frecuencia de escisión de Tn10, inserto en distintos genes de *Salmonella typhimurium* (*met*, *srl* ó *trp*). La introducción de la mutación *uvrB* (deficiente en la reparación por escisión) determina una aumentada frecuencia de escisión de Tn10 a muy bajas dosis de UV; ello permite concluir que la frecuencia de escisión, al igual que la de la mutación puntual, se correlaciona con la presencia de dímeros de pirimidinas inducidos por la radiación UV. No se evidenció efecto del plásmido *mut⁺* pKM101 sobre la frecuencia de escisión precisa, luego del tratamiento con UV.

La mitomicina C también induce un aumento en la escisión de Tn10, inserto en *srl* o *met*.

No se observó efecto inductor de UV o de mitomicina C sobre la escisión precisa de Tn10 en mutantes *recA⁻*.

Estos resultados permiten concluir que el procesamiento SOS, regulado por los genes *rec-lex*, está involucrado en la aumento de escisión precisa de Tn10.

COMPARACION DE SECUENCIAS DE VIRUS DE PAPA. PREDICION DE MUTABILIDAD EN GENES DE CAPSIDE INTEGRADOS AL DNA NUCLEAR POR TRANSFORMACION EXPERIMENTAL.

Stoll, M., Vignali, M., Bruzzone Ciovanelli, M. y L. Latorre.
División Citogenética, I.I.B.C.E. Montevideo, Uruguay.

PUM, PUV y PLNU, son patógenos comunes de los cultivos comerciales de papa. La integración de genes de cápside al cromosoma eucariótico y su expresión, ha demostrado ser una estrategia válida en la prevención de la infección. Resulta de interés estudiar el patrón esperable de mutabilidad tomando en consideración eventuales modificaciones que sufrirían estas secuencias en el compartimiento nuclear. En las plantas superiores el ADN está altamente metilado en los residuos de citosina, especialmente en el trinucleótido CpHpC. La fijación de mutaciones en estos sitios (transiciones C-T y A-G) por dominación de la 5-metilcitosina (5mC) ha sido considerada un factor importante en la mutación puntual, selección de codones y generación de pseudogenes.

La comparación de las secuencias del DNA 5' (gene de la cápside) de tres virus, PUM-C, PUM-2 y S-PUM, reveló un 72% de mutaciones en 711 bases. Se determinó la frecuencia y distribución de los sitios CpC y CpHpC para estimar el número de sitios de probable metilación.

Por dominación de los 5mC, estas secuencias podrían dar origen a un gran número de cambios aminocídicos y mutaciones silenciosas y la generación de varios codones "stop" in "frame". Por otro lado la distribución por dominios de las mutaciones esperables no coincide con la observada actualmente entre los tres genes. Desarrollamos un programa de "software" (SIPMII) que nos ayuda en la simulación de este tipo de mutaciones. Discutimos la importancia práctica de estos hechos en la producción y liberación al ambiente de vegetales transgénicos.

COMPARACION DE SECUENCIAS DE VIRUS DE PAPA. PREDICCIÓN DE MUTABILIDAD EN GENES DE CÁPSIDE INTEGRADOS AL DNA NUCLEAR POR TRANSFORMACION EXPERIMENTAL.

Stoll, M.; Vignali, M.; Bruzzoni Giovanelli, H. y L. Latorre.
División Citogenética, I.I.B.C.E.

PUV, PUV y PLRV, virus de ARN de hebra simple y cadena positiva, son patógenos comunes de los cultivos comerciales de papa. La integración de genes de cápside al cromosoma eucariótico y su expresión, ha demostrado ser una estrategia válida en la prevención de la infección. Por este motivo, resulta importante estudiar las posibilidades de predecir las modificaciones que sufrirían estos genes en el compartimiento nuclear. En las plantas superiores el ADN está altamente metilado en los residuos de citosina, especialmente en el trinucleótido CpNpG. La fijación de mutaciones en estos sitios (transiciones C-T y A-G) por deaminación de la 5-metilcitosina (5mC) ha sido considerada un factor importante en la mutación puntual, selección de codones y generación de pseudogenes.

La comparación de las secuencias del ORF 5 (gene de la cápside) de tres virus, PUV-C, PUV-3 y S-PUV, reveló un 23% de mutaciones en 711 bases. Se determinó la frecuencia y distribución de los sitios CpG y CpNpG para estimar el número de sitios de probable metilación y resultó ser, en promedio, de 143 C o G en posición CpG o CpNpG. Estos sitios muestran una mayor mutabilidad que el resto de la secuencia.

Según las reglas impuestas por la hipótesis de decaimiento por deaminación de las 5mC, postulamos que una vez integradas estas secuencias pueden dar origen a la aparición de un gran número de cambios aminoácidos y mutaciones silenciosas y la generación de varios codones "stop" in "frame". Por otro lado la distribución por dominios de las mutaciones esperables no coincide con la observada actualmente entre los tres genes. Desarrollamos un programa de "software" (SIMPUT) que nos ayuda en la simulación de este tipo de mutaciones.

Discutimos la importancia práctica de estos hechos en la producción y liberación al ambiente de vegetales transgénicos.

CARACTERIZACION DE SONDAS DE ADN QUE REVELEN POLIMORFISMOS INTRAESPECIFICOS.

Martino, A.; Bruzzoni Giovanelli, H.; Garcia, D.; Ureta, A.;
Latorre, L.; Musto, H. y M. Stoll.

Las aplicaciones en la genética vegetal de los sistemas de caracterización de genotipos basados en sondas de ADN, son múltiples y muy valiosas. Allí pueden utilizarse, por ejemplo, en la determinación del nivel de variabilidad genética presente en una colección de germoplasma (o "pool" génico), al inicio de un programa de selección, o en la identificación de líneas generadas en esos programas, especialmente en poblaciones segregantes de base genética estrecha (líneas isogénicas p.e.).

En esta comunicación reportamos las metodologías y resultados obtenidos en: 1) la obtención de sondas de ADN, copia única y multilocus; 2) el clonamiento de secuencias tipo hipervariables y 3) la utilización de oligonucleótidos al azar para la obtención de patrones específicos de bandeo. Con estos objetivos hemos trabajado en la estandarización de los procedimientos, a fin de lograr repetibilidad en el procesamiento de números elevados de muestras de ADN, para la obtención de señal en las hibridaciones sobre las transferencias de ADN.

Se describe también el desarrollo de un programa de computación (POLIMORF), para el procesamiento de los datos obtenidos en la búsqueda de estos polimorfismos en fragmentos de restricción.

POLIMORF, ES UN PROGRAMA DISEÑADO PARA ALMACENAR DATOS DE SONDAS, BLOTS E INDIVIDUOS. PERMITE UNA RAPIDA ADQUISICION DE DATOS, ASI COMO MANTENIMIENTO Y CONSULTAS INTERRELACIONADAS.

ACTUALMENTE MANEJA EL BANCO DE DATOS, SETANDO LA PARTE DESTINADA AL ANALISIS EN FASE DE PRUEBA.

ES DE MANEJO "USER FRIENDLY" Y AUTOEXPLICATIVO.

SE ENCUENTRA EN VERSION PARA ORDENADORES PC Y COMPATIBLES. LOS REQUERIMIENTOS DE DISCO DEPENDEN DIRECTAMENTE DEL VOLUMEN DE LOS DATOS ALMACENAR, CON UNA EXIGENCIA DE MEMORIA MINIMA DE 512 K.

TODOS LOS RESULTADOS DE CONSULTA SE PUEDEN VISUALIZAR POR PANTALLA O IMPRESORA.

IIBCE URUGUAY LL 26/07/90
 EDITAR OTRO GUARDAR BORRAR

MANTENIMIENTO DE SONDAS

NOMBRE : TG115
 NOTEBOOK Ref. :
 ESPECIE : TOMATE
 ORIGEN : TANKSLEY
 VECTOR : PUC8
 SITIO CLONAJE : PST1
 LIGAMIENTO :
 PESO MOLEC (pb) : 2500
 Nº COPIAS : 0
 FECHA ENTRADA : 09/05/90
 COMENTARIOS :
 Se observan 3 bandas por encima del plasmido linearizado Stock digerido 16/4/90.

Continúa editando el registro

Teclas: ESC=Volver PgUp=Sgte. PgDn=Ant. F1=Ayuda

IIBCE URUGUAY LL 26/07/90

CONSULTA DE SONDAS

Nombre	Notebook	Especie	Origen	Vector	SitioClon.	PesoM.	Entrada	Copl.	Lig
TG115	1	Tomate	Tankel	puc8	pet1	2500	09/05/90	0	
TG118	1	Tomate	Tankel	puc8	pet1	2500	01/06/90	0	
TG123	1	Tomate	Tankel	puc8	pet1	2100	01/06/90	0	
TG130	1	Tomate	Tankel	puc8	pet1	1700	09/05/90	0	
TG134	1	Tomate	Tankel	puc8	pet1	2500	09/05/90	0	
TG16	1	Tomate	Tankel	puc8	Ecor1	1900	01/06/90	0	
TG18	1	Tomate	Tankel	Puc8	Ecor1	1900	01/06/90	0	
TG20	1	Tomate	Tankel	Puc8	Pet1	2300	01/06/90	0	
TG22	1	Tomate	Tankel	Puc8	Pet1	2700	01/06/90	0	
TG23	1	Tomate	Tankel	puc8	pet1	2500	08/05/90	0	
TG24	1	Tomate	Tankel	puc8	Pet1	2500	07/06/90	0	
TG28	1	Tomate	Tankel	Puc8	Pet1	1800	01/06/90	0	
TG30	1	Tomate	Tankel	Puc8	Ecor1	2000	01/06/90	0	
TG31	1	Tomate	Tankel	Puc8	Pet1	2400	01/06/90	0	

ENTER para seguir

ESC=Volver

* STATCAD.DOC
 * MONTEVIDEO, 1991
 * leolat

El programa STATCAD realiza análisis de cadenas de bases de nucleótidos; desarrollado en Turbo C para ambiente MSDOS de la línea de equipos PC y compatibles.

Una vez cargada una cadena en memoria, (una ya previamente ingresada) desde un archivo en el disco o desde el teclado en el momento de ejecución; el usuario tiene la posibilidad de realizar diversos cálculos estadísticos.

Para realizar la carga de la cadena, el usuario tiene la posibilidad de elegir el tipo de archivo y su ubicación, así como también la posibilidad de trabajar con varias cadenas en memoria al mismo tiempo para agilizar el proceso, evitando los lentos accesos a disco, según el siguiente menú:

Archivos

```

Cargar archivos en memoria
Eliminar archivos de memoria
Ver directorios
Ver archivos en memoria
Modificar un Corte
  
```

Como en algunos casos es interesante realizar cálculos con segmentos de una cadena, también se incluyó una opción que permite delimitar el área de trabajo dentro de la cadena (Modificar un Corte), y opciones de manejo de las cadenas en memoria.

Para el manejo propiamente estadístico, se incluyen opciones de conteo y porcentaje de bases aisladas y de di y tri nucleótidos, según el siguiente menú.

Estadísticas

```

Bases
Pares
Codones por Marco
Totales por Codones
Aminoácidos por Marco
Totales por Aminoácidos
  
```

En la opción codones por marco, se visualizan las cantidades observadas, frecuencias observadas y esperadas para cada marco; así como también los valores de χ^2 y de Z; y en otra opción los totales por codón.

Ej:

ESTADÍSTICAS POR CODONES

```

ARCHIVO : CONS.DNA
TOTAL   : 55 (bases)
MARCO   : 1
  
```

CODON	CANTIDAD	OBSERVADO	ESPERADO	ESP. % LARGO	Z
AAA	0	0.0000	0.0049	0.0293	0.30
AAU	0	0.0000	0.001	0.0177	0.13
AAG	0	0.0000	0.0027	0.1785	0.42

En la opción de aminoácidos, se visualizan las cantidades observadas, frecuencias observadas y esperadas para cada marco; así como también los valores de χ^2 y de Z, y las cantidades encontradas de cada codón en particular con su RSCU; y en otra opción los totales por aminoácido.

EJ: ESTADÍSTICAS POR AMINOÁCIDOS

ARCHIVO : GBA.DNA
 TOTAL : 1348 (bases)
 MARCO : 1

AMINOÁCIDO : Ala CODONES : GCA-GCC-GCG-GCT

Cantidad : 17
 Observado : 0.0378
 Esperado : 0.0083
 Cantidad Esperada : 3.7148
 Z : 6.9215 *

CODON	CANTIDAD	RSCU
GCA	4	0.9412
GCC	6	1.4118
GCG	4	0.9412
GCT	3	0.7059

AMINOÁCIDO : Cys CODONES : TGC-TGT

MUTA.DOC
MONTEVIDEO, 1991
leolat

Programa utilizado para el análisis de secuencias en la predicción de estabilidad, desarrollado en Turbo Prolog para el sistema operativo MSDOS.

Basado fundamentalmente en los cambios CG → TG y CNG → TNG, permite un análisis completo de todas las tareas relacionadas con el tema; que van desde el simple conteo de dinucleótidos CG al análisis de la posible derivación de una cadena a otra dada.

El programa permite mantener interacción con el utilitario DNASIS, y trabajar con sus secuencias de salida.

Menu principal:

```
Estadísticas sobre una cadena
Derivaciones a partir de una cadena
Ver si una cadena deriva de otra
Derivaciones posibles con una regla
Correr el DNASIS
Dos Shell
Terminar
```

La opción 'Estadísticas sobre una cadena' permite obtener, un conteo de las posibles derivaciones de la cadena original, partiendo de las reglas de estabilidad expuestas arriba, además de un conteo expresado en valor absoluto y porcentaje de las apariciones de las bases nucleotídicas C y G, como se muestran en el ejemplo:

Simulador de Mutaciones

Estadísticas de una cadena

Cantidad de bases : 2347

Cantidad de CNG	: 15	(0.64	%)
Cantidad de CG	: 12	(0.51	%)
Cantidad de C y G en CNG	: 30	(1.28	%)
Cantidad de C y G en CG	: 24	(1.02	%)
Cantidad de C y G en CG y CNG	: 51	(2.17	%)
Cantidad de C en CG y CNG	: 26	(1.11	%)
Cantidad de G en CG y CNG	: 25	(1.07	%)

Cantidad de derivaciones terminales : 134217728

Cantidad de derivaciones en total : 3.5879011486E+12

Digite ESC para terminar V para ver la cadena I para imprimir

En esta opción, al igual que en otras siguientes, existe la posibilidad de tomar una cadena desde el directorio de datos del DNASIS, o ingresarla a mano, o simplemente tomar una previamente ingresada de un archivo ubicado en

Simulador de Mutaciones

```
ACTGTGCTTCGTACTG  
ACTGTGCTTTGTACTG  
ACTATGCTTTGTACTG  
ACTATGCTTTGTATTG
```

DIGITE UNA TECLA PARA CONTINUAR O ESC PARA FINALIZAR

La opción 'Ver si una cadena deriva de otra' permite controlar la relación existente entre dos cadenas del mismo largo, determinando si una es ancestral de la otra.

La opción 'Derivaciones posibles con una regla', realiza un análisis de derivación más restringido; usando de a una las reglas de sustitución a través del siguiente menú de opciones:

```
REGLA : CG -> CA  
REGLA : CG -> TG  
REGLA : CNG -> CNA  
REGLA : CNG -> TNG
```

La opción 'DOS Shell' permite visitar el DOS, para ejecutar comandos propios del sistema operativo, como copia o movimiento de archivos, para luego retomar al trabajo con el programa tras la ejecución de una orden EXIT.

NOTA: Este programa trabaja manteniendo los datos en los directorios correspondientes, (datos del programa DNASIS en C:\DNADATA); y el propio paquete de programas DNASIS en C:\DNASIS.

IMMUT.DOC
ONTEVIDEO, 1991
eolat

Programa utilizado para el analisis de secuencias en la preciccion de habilidad, desarrollado en Turbo Pascal para el sistema operativo MSDOS.

Programa para el analisis de cambios de bases nucleotidicas: permite la visualizacion de las sucesivas mutaciones, indicando los puntos de cambio en cada una de las derivaciones.

La salida de este programa se puede hacer a pantalla o impresora, siendo la unica limitacion el tamaño de la cadena, que debe ser como máximo, la del ancho máximo del dispositivo que representa la salida (por ej: en una pantalla, 80 caracteres).

Cadena a Analizar? -----> PANTALLA
.....1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8

gcctgatgc

3CCTGATGC
CGGACTACG

3CCTGATGC
CGGACTACG

4
ACCTGATGC
TGGACTACG

5
GTCTGATGC
CAGACTACG

5
GTCTGATGC
CAGACTACG

c] para finalizar OTRA para CONTINUAR con OTRA COMBINACION

- CORTA.DOC
- Montevideo, 1991
- leolat

Este programa, desarrollado en formato tipo comando para sistema operativo MSDOS filtra los datos de UNA SECUENCIA cualquiera agregándoles los caracteres especiales de avance de línea (LF) y retorno de carro (CR) cada 80 bases y dejando pasar solamente los identificadores de las bases nucleotídicas -A, C, G y T- ; transformando el archivo a un formato manejable por los programas STADEN y BIOSOS.

La ejecución del programa realiza en forma de comando permitiendo además la transferencia del archivo -conteniendo el gen- entre distintos dispositivos / directorios.

El programa incluye protección contra daño accidental de datos y es auto-explicativo; escrito en lenguaje Turbo Pascal, de reducido tamaño y fácilmente portable a otros sistemas.

Ej:

```
C:\> corta hvbihorg a:\dnasis\dnadata\hvbihorg.dna
```

```

      A         A
      .         .
      |         |
      |         |
      |         |
      |         |
      |         |
      |         |
      L         L
      archivo que contendrá la secuencia pura
      archivo que contiene la secuencia con comentarios

```

el cual dado el archivo que contiene.

	10	20	30	40	50	60
1	GAATTCGATG	AGTCATGICA	TGATCTATAA	GTGICAGTTC	ATCTTATCAT	CTCGGAGAAC
51	AATACAAAGC	TAGTTTTATA	AAAAACAGTC	TAGICTAGAA	GAACAGTCCA	CATGTAAGGC
121	TTTAAAAATC	GAGCATATCT	TAACAACCCA	CACACGATTG	CAACTTAGTC	CTACAAAAGT
181	TTGCCTTTC	TTGTTTCTCG	CTAGCAACCT	ATACAAGGTT	CCAAAATCGT	TTGCAGAAGT

lo transforma en:

```

GAATTCGATGAGTCATGTCATGATCTATAAGTGTGAGTTCATCTTATCATCTCGGAGAACAATACAAAGC
TAGTTTTATAAAAAACAGTCTAGTCTAGAAGAACAGTCCACATGTAAGGCTTTAAAAATCGAGCATATCT
TAACAACCCACACACGATTGCAACTTAGTCCTACAAAAGTTTTGCCTTTCTTGTCTCGCTAGCAACCT
ATACAAGGTTCCAAAATCGTTTGCAGAAGT

```

en formato reconocible para trabajar con los programas STADEN y BIOSOS.


```

FT misc_feature 262..295
FT /note="put. regulatory region".
FT repeat_region 275..292
FT /note="imp. direct repeat"
FT misc_feature 426..435
FT /note="put. regulatory region. CATC-box"
FT promoter 485..492
FT /note="put. TATA-box"
FT precursor_RNA 513..1579
FT /note="put. primary transcript"
FT CDS 564..1442
FT /note="precursor"
FT CDS 564..620
FT /note="put. signal peptide (aa -19 to -1)"
FT CDS 621..1442
FT /note="mature B1 hordein (aa 1-274)"
FT misc_feature 1499..1504
FT /note="pot. polyadenylation signal"
FT misc_feature 1556..1561
FT /note="pot. polyadenylation signal"
FT misc_feature 1567..1572
FT /note="pot. polyadenylation signal"
FT polyA_site 1579..1579
FT /note="put. polyadenylation site"

```

SO Sequence 2900 BP; 938 A; 763 C; 495 G; 704 T; 0 other;

```

          10          20          30          40          50          60
1 GAATTCGATG AGTCATGTCA TGATCTATAA GGTTCAGTTC ATCTTATCAT CTCGGAGAA
61 AATACAAAGC TAGTTTTATA AAAAACAGTC TAGTCTAGAA GAACAGTCCA CATGTAAGG
121 TTTAAAAATC GAGCATATCT TAACAACCCA CACACGATTG CAACTTAGTC CTACAAAAG
181 TTTGCCITTC TTGTTTCTCG CTAGCAACCT ATACAAGGTT CAAAATCGT TTGCAGAAG

```

lo transforma en:

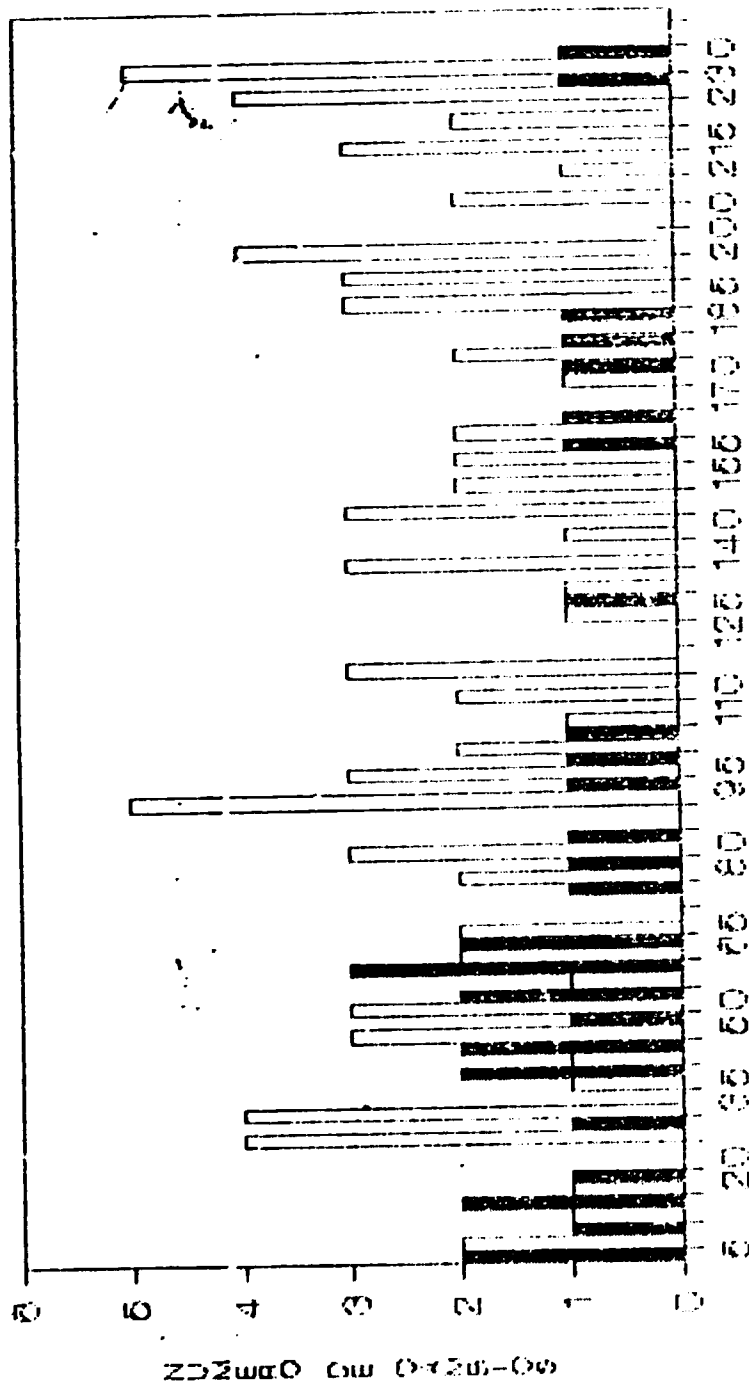
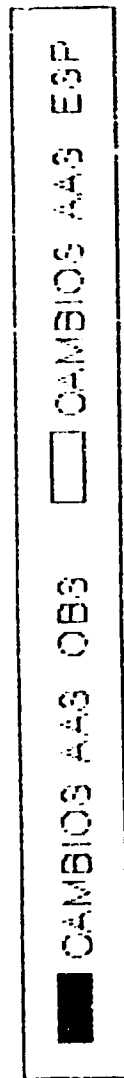
```

GAATTCGATGAGTCATGTCATGATCTATAAGTGTTCAGTTCATCTTATCATCTCGGAGAACAATACAAAGC
TAGTTTTATAAAAAACAGTCTAGTCTAGAAGAAGTCCACATGTAAGGCTTTAAAAATCGAGCATATCT
TAACAACCCACACACGATTGCAACTTAGTCTACAAAAGTTTTGCCITTTCTTGTCTCGCTAGCAACCT
ATACAAGGTTCCAAAATCGTTTGCAGAAGT

```

e. formato reconocible para trabajar con el paquete DNASIS.

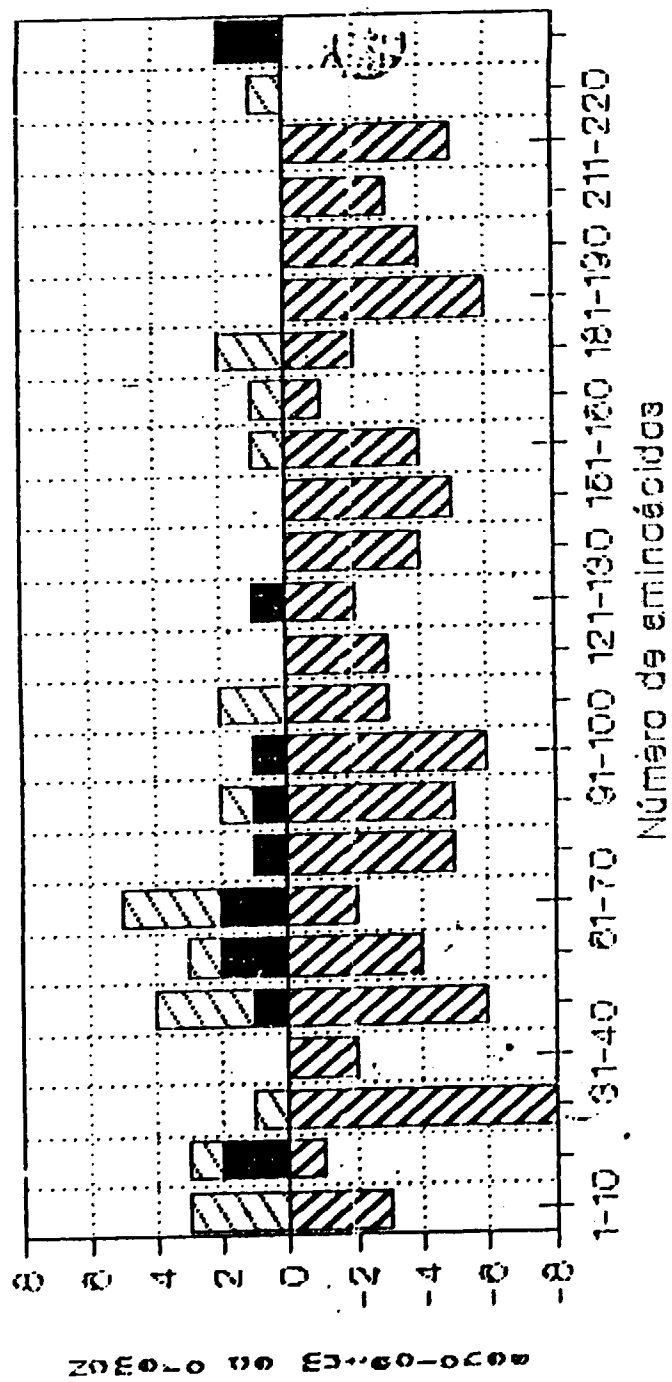
NUMERO DE CAMBIOS DE BASES Y CODONES OBSERVADOS Y ESPERADOS



INTERVALO CONSIDERADO (EN TRIPLETES)

punto - 5 bases

COMPARACION DE CAMBIOS AMINOACIDICOS ESPERADOS Y OBSERVADOS



Mut.Obs.No en CG-CNG
 Mut.Obs. en CG-CNG
 Mut.Esp. en CG-CNG
 Mut.Obs.No en CG-CNG