

Aislamiento y purificación del virus X de la papa y clonación del gen de su cubierta proteica

Potato virus X isolation and purification and coat protein gene cloning

L. Duplat*; O. Acosta**; J. Peñaranda** Caro, M.**

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fue obtener clones del gen que codifica la cubierta proteica (CP) del virus X de la papa (PVX). Para lograrlo se estudió un aislamiento colombiano del PVX obtenido de muestras de plantas de papa recolectadas en el páramo de San Jorge (CORPOICA). Después de la inoculación sobre *Datura stramonium*, se tomó una lesión local producida sobre este hospedero y se inoculó sobre *Nicotiana tabacum*, de cuyo tejido se purificó el PVX. El RNA genómico extraído de las partículas virales purificadas presentó un tamaño de aproximadamente 6 Kb. La síntesis del cDNA, utilizando el primer 4DT/KPN, se evidenció mediante la incorporación de Digoxigenina. La amplificación por PCR del gen CP, a partir del cDNA sintetizado, se realizó utilizando el primer OX6 junto con el primer LK/pn, complementario a la secuencia del extremo 5' del primer 4DT/KPN. El producto de la amplificación presentó el tamaño esperado de aproximadamente 870 pb, en adición a otros productos de 600-123 pb. Estos fragmentos amplificados fueron clonados en el plásmido pMOSBlue. Los recombinantes fueron analizados en "minipreps", digiriendo el plásmido con Sma I y Hind III o utilizando el método de amplificación con PCR directamente de la colonia. Las colonias transformadas con el inserto apropiado fueron almacenadas en glicerol a -70 °C.

Palabras clave: Virus X de la papa, clonación, cubierta proteica, reacción en cadena de la polimerasa.

ABSTRACT

In this work we describe the construction of potato virus X coat protein (PVX-CP) gene clones from a colombian isolate. Virus was isolated from field potato plants cultured at páramo de San Jorge. PVX particles were purified from *Nicotiana tabacum* leaves infected with a local lesion taken from *Datura stramonium* plants. The genomic RNA present in the virus particles consisted of a single species of about 6 Kb. cDNA synthesis representing genomic RNA was followed by Digoxigenin incorporation after priming with oligonucleotide 4DT/KPN. PCR amplification of CP gene sequence was made by using oligonucleotides OX6 and L/Kpn. An expected fragment of 870 bp, besides some 600-123 bp fragments, was obtained after PCR. The blunt-ended fragments were cloned into the PCR cloning pMOSblue plasmid. The insert size of the selected recombinant cDNA clones was determined by restriction analysis of the plasmid DNA with Sma I and Hind III enzymes. Positive clones were also screened by direct colony PCR screening. The selected recombinant cDNA clones were stored in glycerol at -70 °C.

Key words: potato virus X, cloning, coat protein, polimerase chain reaction.

INTRODUCCIÓN

El virus X de la papa (PVX) es un miembro típico del grupo de los potexvirus (Mathews 1982); morfológicamente, es una barra flexuosa con simetría helicoidal. El genoma monopartito del PVX está compuesto por una molécula lineal de RNA de sentido positivo, compuesta

-
- 1 Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Cra. 7 No. 43-82, Bogotá, D.C., Colombia.
 - 2 Unidad de Bioquímica, Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490, Bogotá, D.C., Colombia.

por 6.435 nucleótidos en cepas europeas (PVX_{CP}), sin contar la cola de poli (A) (Huisman *et al.* 1988) y por 6432 nucleótidos en cepas suramericanas (PVX_{HB}) (Orman *et al.* 1990; Querci 1993). Este virus se encuentra encapsidado por una proteína de 29 KDa (Acosta *et al.* 1991) El extremo 5' tiene un nucleótido metilado llamado "CAP" (m⁷ G⁵ pppGp), mientras el extremo 3' presenta una cola de poli(A) (Peñaranda, 1996). En el genoma de las cepas estudiadas se reporta la presencia de cinco marcos de lectura abiertos para la traducción (ORF), los cuales son numerados de 1 a 5, comenzando por el extremo 5'. La proteína 166 KDa está codificada por el primer ORF, la proteína 25 KDa está codificada por el segundo ORF, las proteínas 12 KDa y 8 KDa están codificadas por el tercer y cuarto ORF, respectivamente (Seppänen *et al.* 1997; Beck, *et al.* 1991; Beck *et al.* 1994, Morozov *et al.* 1991). El último ORF codifica la proteína de la cubierta proteica (CP) (25KDa). Este virus se encuentra entre los que afectan los cultivos de papa. En sinergismo con otros virus ha causado pérdidas en la producción del tubérculo hasta en 61.2 % (Guerrero, 1978). Esto constituye un grave problema, teniendo en cuenta que la papa ocupa el cuarto lugar de importancia en los cultivos alimenticios mundiales (De Block, 1988; Acosta *et al.* 1994). Una buena parte de la tecnología transgénica incluye la transformación de plantas con genes (o sus versiones antisentido) (Beachy *et al.* 1990; Wilson 1993) derivados de los mismos patógenos, particularmente de virus que las infectan. Dentro de esta estrategia se han aislado genes o partes de genes que codifican la cubierta proteica del virus (CP), la replicasa y la proteasa. Particularmente se han obtenido plantas transgénicas de variedades comerciales de papa resistentes al PVX, virus Y de la papa (PVY) y el virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV) (revisado en Acosta *et al.* 1994). El objetivo principal de este trabajo fue obtener clones del gen que codifica la CP del PVX, con el propósito de ser utilizados en trabajos posteriores de transformación de plantas de *Solanum tuberosum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del virus

Se recolectaron 32 muestras de plantas de papa del páramo de San Jorge (CORPOICA), las cuales fueron guardadas a 4 °C con silica gel. Para la recolección de la muestra se tomó en cuenta que las plantas presentarían síntomas característicos de infección con el (PVX). La

presencia del PVX en las plantas de campo fue determinada mediante la prueba serológica de ELISA. El método de ELISA utilizado fue, esencialmente, el descrito por Clark y Bar-Joseph (1985).

Las alícuotas de los tejidos de papa positivas en la prueba de ELISA se utilizaron para propagar el PVX inicialmente en *Datura stramonium*, usada como planta filtro, antes de la inoculación en tabaco (*Nicotiana tabacum*). Posteriormente los extractos obtenidos de las lesiones locales individuales de la *Datura stramonium* fueron inoculados en plantas de tabaco libres de virus para la propagación sistémica del virus.

Purificación del virus

A partir de los resultados obtenidos con la prueba de ELISA, se escogieron las muestras positivas para PVX con el objeto de purificar el virus. Para la purificación del virus se utilizó como referencia el método descrito por Camacho *et al.* (1991). Se pesaron 50 g de las muestras positivas de las plantas de tabaco y se homogeneizaron en licuadora a 4 °C con *buffer* Na₂HPO₄ 0.1 M pH 8.0, ajustado con ácido cítrico al cual se le adicionó EDTA 10 mM, DIECA 0.5%; 2- ME 0.1%. El homogeneizado se filtró a través de dos capas de gasa y luego se clarificó con una mezcla compuesta por cloroformo, butanol, alcohol isoamílico al 20, 10 y 5% (V/V), respectivamente. Después, la fase acuosa se centrifugó a 20.000 g durante 25 minutos. El sobrenadante se sedimentó a 100,000 g durante 2.5 horas a través de un colchón de sacarosa al 30%. El virus precipitado se resuspendió en el mismo *buffer* seguido de una baja centrifugación a 12000 g durante 10 minutos. La suspensión viral se sometió a otro ciclo igual de sedimentación a través de un colchón de sacarosa al 30%. El virus purificado fue resuspendido finalmente en *buffer* NaH₂PO₄ 0.1 M, pH8.0, se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos. La suspensión del virus purificado se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm, se determinó el espectro de absorción entre 200-300 nm y se estableció la relación A 260/280. El virus purificado se almacenó a -70 °C.

Electroforesis de la proteína estructural del virus

Las proteínas virales fueron disociadas mediante la adición de un volumen de *buffer* de disociación 2X de Laemmli (1970), seguido de incubación en agua hirviendo durante 3 minutos. La proteína estructural fue analiza-

da en el sistema SDS-PAGE de Laemmli (1970), a través de un gel de concentración al 4% y un gel de separación del 12% de poliacrilamida. La proteína separada en el gel fue visualizada con azul de Coomassie. Se utilizó una mezcla de marcadores de peso molecular para proteínas que contenía albúmina bovina (68000), ovoalbúmina (45000), quimotripsina (25000) y β -lactoglobulina (18000).

Purificación del RNA genómico del PVX

Para la extracción del RNA genómico viral se partió del virus purificado y se utilizó el método del Trizol (Gibco BRL) (solución mono-básica de fenol e isotiocianato de guanidina) (Chomezynki y Sachi, 1987). El RNA genómico purificado se separó en una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %, en una cámara submarina Horizon 58 (Gibco BRL). La electroforesis se corrió a 100 voltios constantes durante 1 hora, se tiñó con bromuro de etidio (ETBr) (0.5 μ g/ml), durante 15 minutos y se visualizó en un transiluminador UV. El tamaño de las bandas formadas se calculó utilizando el marcador de peso molecular "escalera de RNA" (Gibco BRL) (MW 9.5, 7.5, 4.4, 2.4, 1.4 y 0.24 kb) y el método gráfico de Bozart y Harley (1976).

Obtención de cDNA de cadena sencilla a partir del RNA

Para sintetizar la primera cadena de cDNA se utilizó el "kit" SuperScript Choice System for cDNA Synthesis (Gibco BRL). A 1 μ l de RNA viral (1 μ g), se le agregó 1 μ l (10 mM) del primer 4DT/Kpn (Gibco BRL), 10mM(5'ATCCGCGG-GCCCATGGTACCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'), se dejó a 70 °C durante 10 minutos y luego a 20 °C durante 15 minutos. La mezcla se puso sobre hielo y después se le agregó un coctel compuesto de 6.25 μ l de mezcla de nucleósidos trifosfato (dNTP mix) (10 mM) (Boehringer-Mannheim) que contenía el análogo Digoxigenina, 1 μ l de RNAsin, 5 μ l de *buffer* de reacción de transcriptasa reversa 5X (10 mM Tris-HCl; 5 mM MgCl₂; pH 8,3), 10 μ l de KCl (250mM) y 2 μ l de la enzima transcriptasa reversa (RT) del virus de la leucemia murina Moloney (MMLV)-RT (200 Unid) y se incubó a 37 °C durante 1 hora. El cDNA de cadena sencilla sintetizado se almacenó a 4 °C. El cDNA se separó en una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % en una cámara submarina Horizon 58 (Gibco- BRL). La electroforesis se corrió a 60 V durante 1 hora. Además de la muestra se usaron como marcadores de referencia del funcionamiento de

la corrida electroforética fragmentos de fago λ digerido con Hind III (MW 23.1, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0 y 0.564 kpb) (Gibco BRL). El gel se coloreó con ETBr (0,5 μ g/ml) durante 20 minutos. Luego se observó en un transiluminador de UV.

Transferencia del cDNA

La transferencia electroforética del cDNA en el gel se realizó en una cámara de transferencia (Sigma- Aldrich Semi-Dry Blotter), como lo describe Sambrook *et al.* (1989). Una vez transferido y fijado el ácido nucleico a la membrana de nylon (Hybond Amersham) se procedió a hacer la detección del cDNA marcado con Digoxigenina, utilizando el "kit Dig-Sistem for nucleic acid labeling and detection" (Boehringer-Mannheim). Para el revelado la membrana seca se colocó en contacto con una película de rayos X en un *case-te* de exposición durante 45 minutos.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación del gen CP se realizó en una reacción que contenía 5 μ l de dNTPs (2 mM); 2,5 μ l de cada oligonucleotido (10 mM) [primer OX6 (Gibco BRL) (5' TTAGCGGTTAAGTTTCCA 3'); primer L/Kpn (Gibco BRL) (5'ATCCGCGGGCCCATCG- TACC3')]; 4,5 μ l de MgCl₂ (25 mM); 5 μ l de cDNA molde; 1 μ l Taq DNA polimerasa (2,5 U); 5 μ l de *buffer* de PCR 10X; 24,5 μ l H₂O; y una capa de aceite mineral. El programa del termociclador utilizado fue: 94°C durante 60 segundos; 25 ciclos de: 92°C durante 10 segundos; 50 °C durante 15 segundos; 72°C durante 30 segundos, seguido de 72°C durante 5 minutos. El producto de PCR se almacenó a 4°C. Para visualizar la banda del producto esperado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % utilizando una cámara Horizon 58 (Gibco BRL). La electroforesis se condujo a 55 v durante 1.5 horas, el gel se tiñó con ETBr (0,5 μ g/ml) durante 20 minutos y se visualizó en un transiluminador UV. El tamaño de los productos de PCR se calculó utilizando el marcador de peso molecular del genoma del fago λ Hind III (MW 23.1, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0 y 0.564 kpb) digerido con Gibco BRL. El tamaño de las bandas de DNA se calculó con relación a la movilidad del marcador de peso molecular.

Clonación del producto de PCR

La clonación del producto de PCR se llevó a cabo en el plásmido pMOS*Blue* que hace parte del "kit" de clonación de productos de la amplificación con extremos romos (Amersham). El plásmido de las colonias positivas fue purificado por "miniprep" y visualizado después de la electroforesis en un gel de agarosa al 1% en una cámara submarina Horizon 58 (Gibco-BRL) a 55 v durante 1.5 horas, junto con los marcadores de peso molecular Hind III (MW 23.1, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0 y 0.564 kpb) (Gibco BRL) y la escalera DNA 123 (MW 12.3, 11.07, 9.8, 7.38, 6.15, 4.92, 3.69, 2.46, 0.123, kpb) (Gibco BRL). El gel fue coloreado con ETBr (0.5 g/ml).

La digestión del plásmido para la liberación del fragmento fue hecho con las enzimas de restricción Sma I a una temperatura de 30 °C y Hind III a 37 °C durante toda la noche. Para verificar la presencia del fragmento esperado, se amplificó por PCR el fragmento directamente de la colonia bacteriana añadiendo los componentes de la siguiente forma: 27.5 µl de agua libre de nucleasas, 5 µl de mezcla de dNTPs 2 mM, 1 µl del primer Ox6 (10µM), 1 µl del primer L/Kpn (10µM), 5 µl de *buffer* de PCR10X, 0.5 µl Taq DNA polimerasa (2.5U), 2 µl de la muestra del lisado. El programa del termociclador fue el siguiente: 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 2 minutos, seguido de 72 °C durante 5 minutos. Los productos de la reacción se analizaron en un gel de agarosa al 1%, corrido en una cámara submarina Horizon (58 Gibco BRL) a 55 V durante 1.5 horas. El gel se tiñó con ETBr (0.5µg/ml) y se observó en un transiluminador de luz UV. Las bandas de la muestra se compararon con la escalera de DNA 123 (MW 12.3, 11.07, 9.8, 7.38, 6.15, 4.92, 3.69, 2.46, 0.123, kpb) (Gibco BRL). Las colonias que presentaron el fragmento esperado clonado se almacenaron en glicerol al 15 % a -70°C (Sambrook *et al.* 1989).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación del virus

De las 32 muestras de papa recogidas, provenientes del páramo San Jorge (CORPOICA), sólo cuatro de ellas fueron claramente positivas a la prueba de ELISA para PVX.

Propagación del virus

Con las muestras de papa positivas y aplicando la técnica de ELISA, se propagó el virus inicialmente en *Nicotiana tabacum*, y después fue reinoculado en *Datura stramonium*. Esta última planta presentó síntomas que aparecieron entre 15 y 20 días post inoculación (pi), los cuales se expresaron como manchas de color amarillo intenso en las hojas. Los síntomas que presentó la preparación de PVX en esta planta fueron similares a los descritos por Salazar (1982). Los síntomas en las plantas de *Nicotiana tabacum*, inoculadas con PVX, difirieron considerablemente. Estos síntomas empezaron a ser evidentes entre los 15 y 20 días pi y se caracterizaron por presentar zonas de color verde claro ó cloróticas en las hojas, zonas que predominaron dejando algunas áreas de color verde normal que daban la apariencia de mosaico en las hojas. Estos síntomas se evidenciaron primero en el ápice de la hoja y luego se extendieron hacia la base.

Purificación del PVX

Por el método de centrifugación diferencial, a partir de 50 g de material de *Nicotiana tabacum* infectado con PVX, se obtuvieron 4.0 mg de partícula viral total, dando un rendimiento similar al reportado por Camacho *et al.* (1989). Esta concentración se determinó por medición espectrofotométrica. El registro correspondiente al espectro de absorción del virus purificado mostró un perfil típico de nucleoproteína (figura 1) con un mínimo de absorbancia alrededor de 240 nm y un máximo a 260 nm. La relación de absorbancias 260 y 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀) fue igual a 1.06/0.883 = 1.20, lo cual indica que el virus obtenido fue de alta pureza, según los valores reportados en la literatura (Goodman *et al.* 1975). El virus almacenado a -70 °C conservó su capacidad infectiva, como lo demostró la aparición de síntomas en plantas de *Nicotiana tabacum*.

Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con SDS

La electroforesis en el sistema SDS-PAGE de la proteína del virus purificado reveló la presencia de una banda única de proteína de 29 KDa, correspondiente a la proteína de la cápside intacta del PVX (figura 2, carril 2). Este resultado concuerda con lo reportado (Peñaranda 1996; Acosta *et al.* 1991). En la muestra de tejido infectado se pudo observar una banda prominente que comigró con la

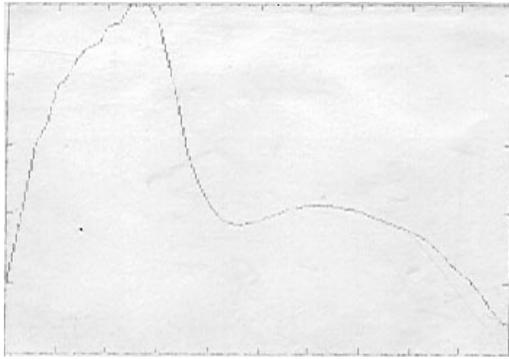


Figura 1. Barrido espectrofotométrico (200-300 nm) del PVX purificado.

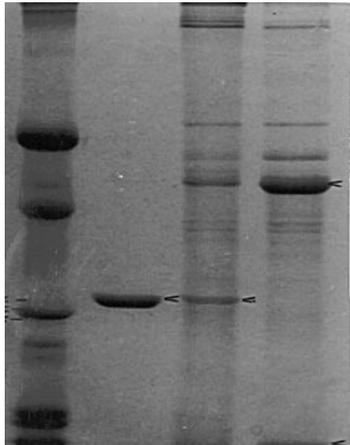


Figura 2. Electroforesis en SDS-PAGE de la proteína del virus purificado y de los extractos de plantas sana e infectada de *Nicotiana tabacum*, inoculada con extractos de *Datura stramonium*. Carril 1: Mezcla de marcadores de peso molecular; Albúmina (68000); Ovoalbúmina (45000); Quimotripsina (25000); β -Lactoglobulina (18000); Lisozi-
ma (14500); carril 2: 10 μ l de virus purificado; Carriles 3 y 4: 7 μ l de extracto de plantas infectada y sana respectivamente. La electroforesis se realizó con el sistema

proteína estructural intacta del PVX (figura 2 carril 3), esta misma banda estuvo ausente en el tejido sano de tabaco (figura 2 carril 4). Las proteínas restantes presentes en el tejido de tabaco fueron comunes a las plantas sana e infectada, incluida una banda prominente de 55 KDa que correspondería muy posiblemente a la proteína Ru-

bisco (Ribulosa bifosfato carboxilasa) presente en todas las plantas de tabaco y que está formada por dos tipos de subunidades de masa molecular relativa de 55 y 15 KDa (figura 2, carriles 3 y 4). La electroforesis del PVX purificado a partir de las plantas de *Nicotiana tabacum* inoculadas directamente con el extracto de las plantas de papa de campo, positivas a PVX, presentó una banda de proteína de 34 KDa, lo cual revela una posible contaminación con el virus PVY, cuya proteína estructural es de este tamaño (figura 3 carriles 3, 4, 5, 6); La banda de 29 KDa correspondería a la proteína de la cápside intacta del PVX, como lo reportaron Peñaranda (1996) y Acosta *et al.* (1991). Además se presentó una banda de menor tamaño que 27 KDa (figura 3 carriles 3, 4, 5, 6), que correspondería a la proteína Pi reportada por Koenig *et al.* (1978).

Extracción del RNA por el método del Trizol

Con el método del Trizol (Gibco-BRL), a partir de 100 μ l de virus purificado a una concentración de 4 mg/ml se obtuvieron 10 μ g totales de RNA, el cual se visualizó en un gel de agarosa al 1.2% y formaldehído al 25%. El análisis espectrofotométrico presentó un pico máximo de 252 nm y un pico mínimo de 225 nm (figura 4), mostrando un perfil típico de ácido ribonucleico. En el gel se eviden-

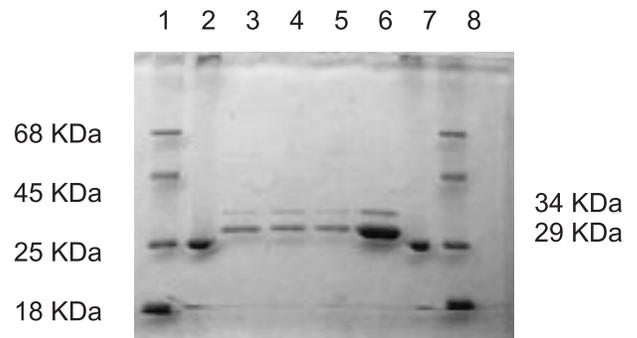


Figura 3. Electroforesis en SDS-PAGE del PVX purificado a partir de *Nicotiana tabacum* inoculada con extractos de tejido de plantas de papa positivas a PVX. Carriles 1 y 8: Mezcla de marcadores de peso molecular Albúmina (68000); Ovoalbúmina (45000); Quimotripsina (25000); β -Lactoglobulina (18000); carril 2 y 7: Quimotripsina (25000); carril 3: 5 μ l de virus purificado (PVX); carril 4: 7 μ l de virus purificado (PVX); carril 5: 8 μ l de virus purificado (PVX); carril 6: 10 ml de virus purificado (PVX).

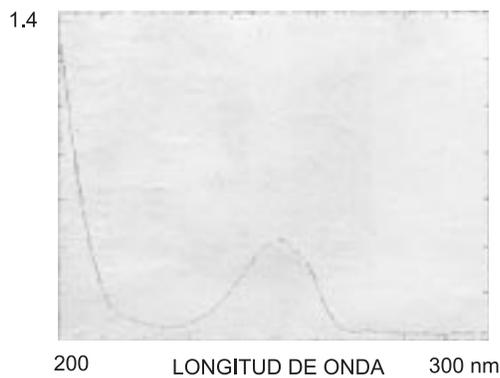


Figura 4. Barrido espectrofotométrico (200-300nm) del RNA del PVX extraído con Trizol.

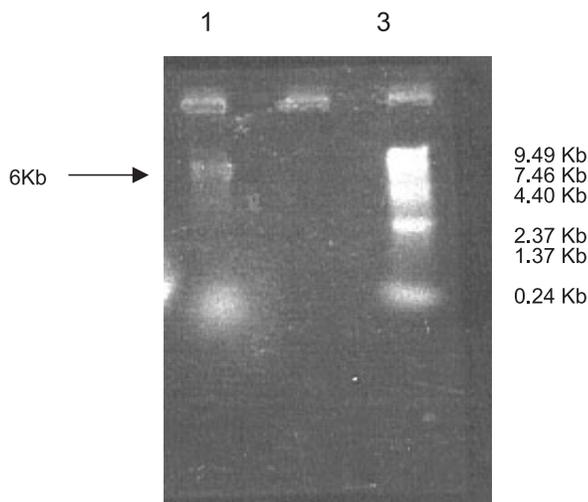


Figura 5. Electroforesis del RNA extraído con Trizol. Carril 1: 5 µg de RNA extraído con Trizol Carril 3: Marcador de peso molecular escalera de RNA (9.49-0.24 Kb) (Gibco BRL).

ció una banda única de 6 Kb (figura 5), correspondiente al RNA genómico del PVX, similar a lo que se reporta en la literatura (Huisman *et al.* 1988; Orman *et al.* 1990).

Obtención de cDNA a partir del RNA

El cDNA marcado con Digoxigenina, sintetizado sobre un molde de 1 µg de RNA genómico de PVX, al ser detectado por su impresión sobre una película de rayos X mostró

una señal con alguna dispersión en su tamaño (datos no mostrados), lo cual es indicativo de que el primer 4DT/Kpn se apareó eficientemente con el tramo de poli (A) del RNA genómico permitiendo su elongación para formar el correspondiente cDNA. Esta huella en la película de rayos X indica que el primer 4DT/Kpn fue elongado en longitudes variables.

En las amplificaciones de secuencias de cDNA por PCR, se obtuvo una banda clara correspondiente a un fragmento de aproximadamente 870 pb, el cual corresponde al tamaño esperado con los primers OX6 y LK/pn. Esto sugiere que los primers utilizados, diseñados con base en las secuencias del genoma de aislamientos europeos de PVX, se aparean con el genoma del aislamiento colombiano de PVX utilizado en este estudio. Es de esperarse que el primer LK/pn se complemente con la secuencia variable del primer 4DT/KPN contigua a la secuencia oligo d(T). El primer OX6 se aparearía con una secuencia más interna (5617-5636) en el genoma, localizada corriente arriba del ORF 5 que codifica para la CP del PVX.

En algunas muestras de RNA genómico de PVX se presentó, además del fragmento de aproximadamente 870 pb, una señal difusa en la región del gel que corresponde a tamaños menores de 500 pb (figura 6). En algunas de estas muestras, al ser analizadas en geles de agarosa más concentrados (2 %), se pudo observar bandas de aproximadamente 700, 600, 500, 300, y 123 (figura 7, carriles 3, 6, 7). Estas amplificaciones ocasionales en algunas muestras se podrían explicar como consecuencia de apareamientos no específicos del primer interno. Para probar esta hipótesis habría que secuenciar estos productos para determinar si son parte de la secuencia del gen de la CP del PVX. En algunos casos el fragmento de 870 pb, después de ser electro eluido del gel de agarosa, se utilizó como molde para reamplificar este producto, obteniéndose el producto esperado de 870 pb más otro adicional de 500 pb, ocasionalmente de mayor intensidad que el de 870 pb (figura 7, carril 4). Tanto el *background* difuso como los productos de PCR de menor tamaño que el 870 pb disminuyeron significativamente cuando en la mezcla de reacción de PCR disminuyó la concentración del molde (figura 8).

Clonación del producto amplificado en el plásmido pMosblue

Una vez corroborada la eficiencia de las células competentes para incorporar el plásmido de prueba, lo mismo que la eficiencia en la clonación del inserto control (control positivo) y la ausencia de crecimiento de las células

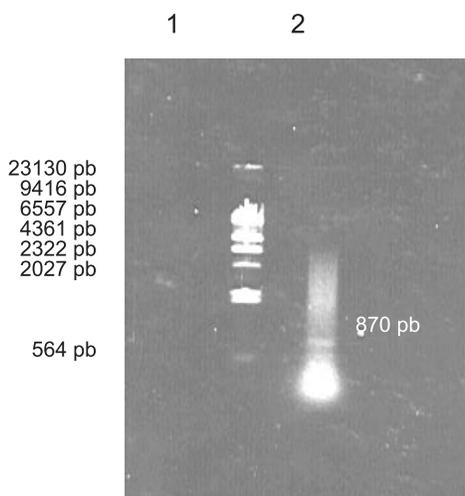


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto amplificado de cDNA de PVX por PCR con los primers OX6 y L/Kpn. Carril 1: λ Hind III, Carril 2: 5 μ l de producto PCR. del fragmento de 870 pb del PCR, Carril 6 y 7: 5 μ l de los productos de PCR, Carril 8: Escalera DNA 123.

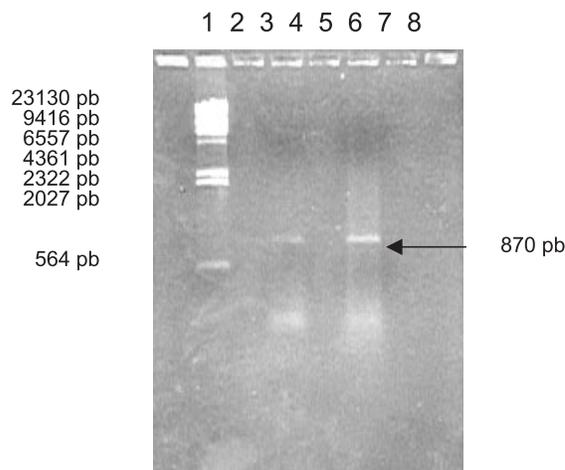


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del cDNA amplificado por PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular, Fago λ digerido con Hind III; Carril 3 y 5: 2 μ l y

que no han incorporado el inserto, se procedió a la clonación de los productos amplificados descritos anteriormente. La mayor eficiencia en la clonación se obtuvo con la relación inserto: vector 1:2.5 .

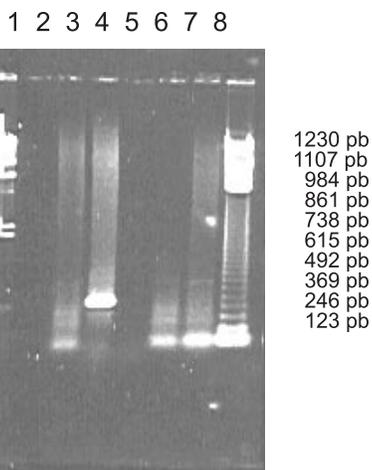


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de productos de cDNA amplificado por PCR. Carril 1: marcador de peso molecular λ Hind III; Carril 3: 5 μ l del producto PCR, Carril 4: 5 μ l del producto PCR reamplificado obtenido a partir de electroelución del gel de agarosa del fragmento de 870 pb del PCR, Carril 6 y 7: 5 μ l de los

En una prueba preliminar de clonación se obtuvieron aproximadamente 250 colonias blancas que contenían el inserto, y 30 colonias azules que contenían el plásmido recircularizado. Tanto el análisis electroforético de los plásmidos purificados (figura 9 A) como de los insertos liberados con Sma I y Hind III indicó que sólo el 5 % de los insertos tuvo un tamaño de alrededor de 600 y 500pb; el 95 % de los insertos estuvo representado por tamaños que fluctuaron entre 400 y 123 pb (figura 9 B). En esta primera clonación no se obtuvo el fragmento esperado de 870 pb, a pesar de que en el producto de la amplificación mezclado con el plásmido en la relación antes señalada, ese fragmento de 870 pb estaba presente, aunque en una concentración relativamente menor, en adición a los fragmentos de 600-123 pb.

Cuando se intentó clonar el fragmento de 870 pb purificado a partir del gel mediante electroelución, se hizo una reamplificación previa y se obtuvo un producto prominente de 500pb y otro producto de 870 pb. La clonación de estos fragmentos reamplificados después de haber sido electroeluidos fue negativa. Esto puede

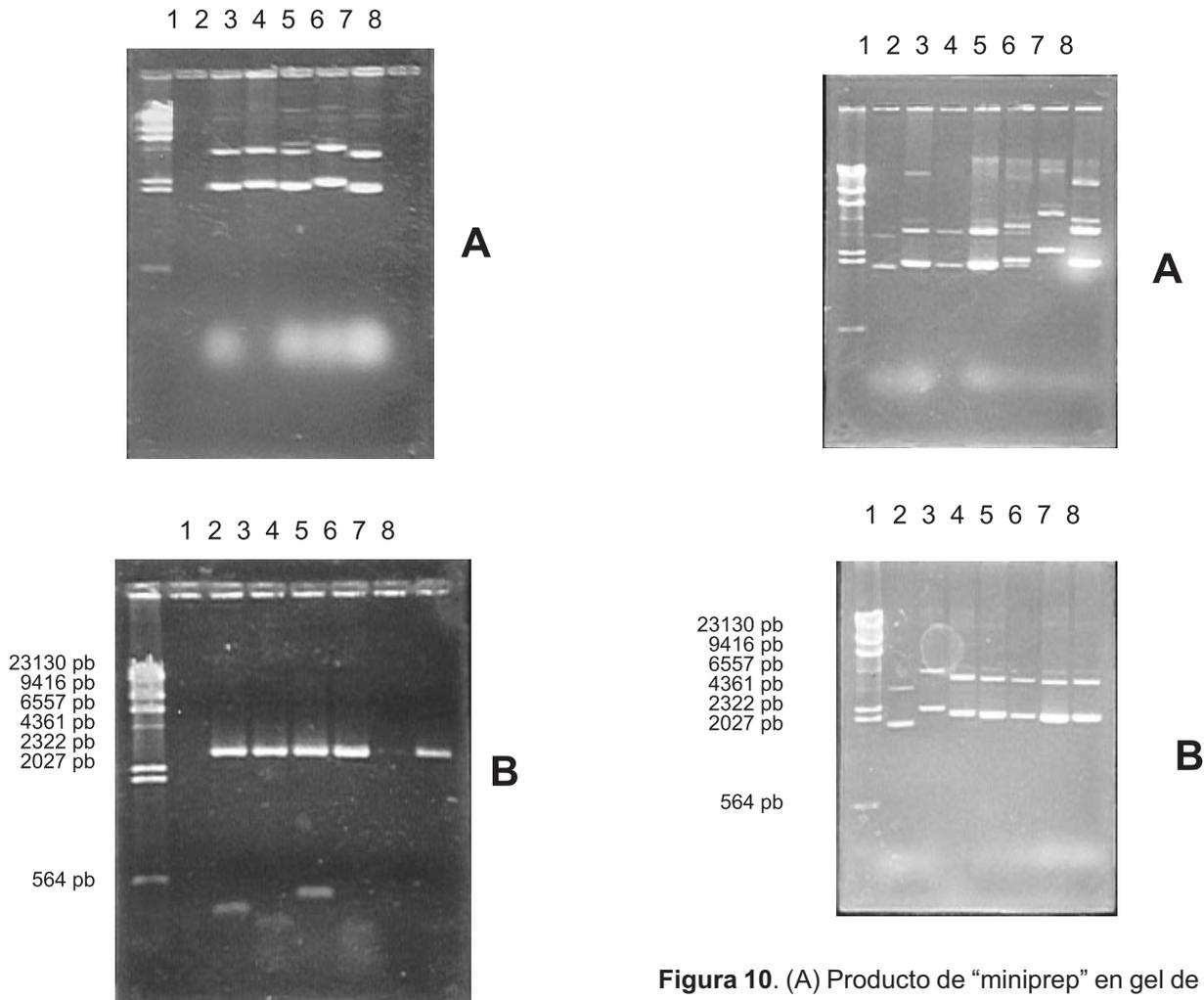


Figura 9. (A) Producto de la “miniprep” en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular λ Hind III; carril 3: 5 μ l del producto de la “miniprep” del plásmido prueba; carril 4: 5 μ l del producto de la “miniprep” del control positivo; carriles 4, 5, 6,: 5 μ l del producto de la “miniprep” A, B, C, respectivamente. (B). Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 3: Digestión del plásmido con el inserto control con SmaI y XbaI; carriles 4, 5, 6,: 5 μ l del producto de la digestión del plásmido con Sma I y Hind III de la “miniprep” A,B,C respectivamente; carril 8: Plásmido prueba digerido.

Figura 10. (A) Producto de “miniprep” en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador fago λ digerido con Hind III; carril 2: Muestra de “miniprep” del plásmido prueba; carril 3: “miniprep” del control positivo; carriles 4, 5, 6, 7, 8: 5 μ l de los productos de “miniprep” 2, 3, 4, 5, 6. (B) Carril 1: Marcador fago λ digerido con Hind III; carril 2: “miniprep” del plásmido prueba; carril 3, 4, 5, 6, 7, 8: “miniprep” 7, 8, 9, 10, 11, 12.

La clonación del fragmento esperado de 870 pb fue exitosa cuando el producto de amplificación presentó en el gel de agarosa una banda prominente del fragmento de 870 pb y sólo una leve señal difusa en la región correspondiente a tamaños inferiores a 600 pb. Parece que las cantidades relativas de los fragmentos en la mezcla y el plásmido vector son importantes en la proporción de insertos clonados. En este caso particular se obtuvieron alrededor de 50 colonias blancas y 10 azules, el análisis electroforético de los plásmidos purificados (figura 10) y los insertos liberados con las enzimas Sma I y Hind III

deberse en parte a la contaminación con agarosa, la cual se ha reportado como interferente en la clonación (Sambrook *et al.* 1989).

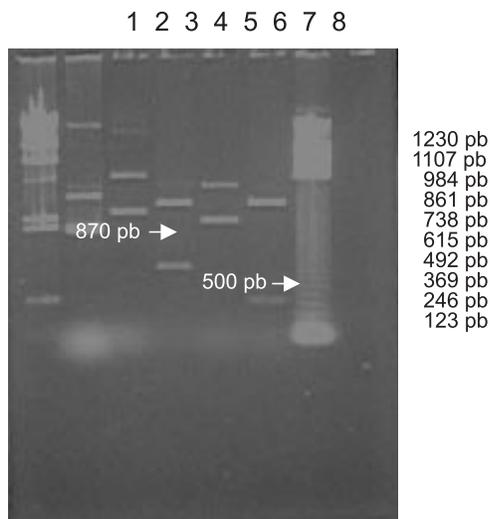


Figura 11. Producto de la digestión del plásmido con Sma I y Eco RI, en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular fago λ digerido con Hind III; carril 2: producto “miniprep” del plásmido prueba sin digerr; carril 3: producto “miniprep” 7 (A); carril 4: Producto de digestión de “miniprep” 7 (A); carril 5: Producto “miniprep” 3 (B); carril 6: Producto de digestión de “miniprep”; carril 7: Escalera DNA 123.

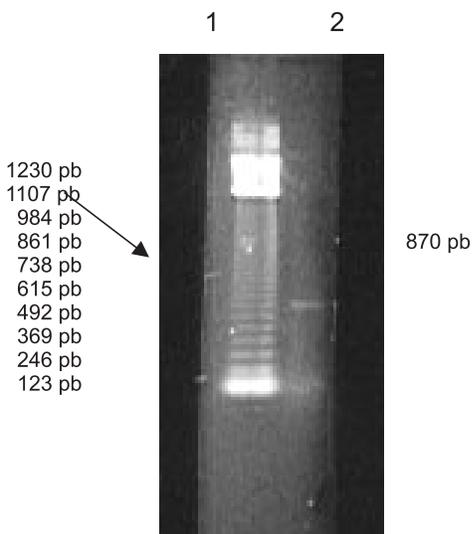


Figura 12. Amplificación del gen que codifica para la CP del PVX directamente a partir del clono bacteriano. Carril 1: Escalera DNA 123 (Gibco BRL); carril 2: Fragmento amplificado (870 pb).

mostró que el inserto de 870 pb (figura 11, carril 4) estuvo presente en el 60 % de las colonias blancas y los insertos de tamaños entre 600 y 123 pb (figura 11, carril 7) sólo estuvieron presentes en el 40 % de ellas.

Para verificar aún más la presencia del inserto en el plásmido de la colonia seleccionada y para comprobar la especificidad de los primers utilizados, se procedió a amplificar el fragmento de 870 pb a partir del DNA extraído de las células bacterianas mediante calentamiento en agua hirviendo. El resultado de esta amplificación muestra en el gel sólo el producto del tamaño esperado (figura 12).

CONCLUSIONES

El peso molecular de la proteína intacta de la cubierta (CP) del PVX en aislamientos colombianos analizados en electroforesis (SDS-PAGE) fue 29000 (Peñaranda, 1996; Acosta *et al.* 1991).

El RNA estimado, extraído del aislamiento colombiano de PVX, mostró un tamaño aproximado de 6Kb similar a lo reportado para cepas europeas (Huisman 1988) y suramericanas (Orman *et al.* 1990; Querci 1993).

El primer 4DT/KPN utilizado para la síntesis de la primera cadena de cDNA se apareó eficientemente con el tramo de poli (A), permitiendo la elongación del cDNA.

Con los primers OX6 y L/Kpn se logró la amplificación de un fragmento de aproximadamente 870 pb, correspondiente al gen de la CP del PVX, el cual está disponible para su utilización en programas de producción de plantas transgénicas de papa resistentes al PVX.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, O., Peñaranda, J. Camacho, N. de Luque, C. 1991. Two dimensional analysis of degradation products of potato virus X coat protein. *Phytopathology*. 81: 690.
- Acosta, O. Webster, K. 1994. *Proceedings of the first International workshop on transgenic technology in plants*. (O. Acosta and K.D Webster, eds). Universidad Nacional-Scottish Crop Research Institute. Editorial Científica, Bogotá. 20-29
- Beachy, R. N., Loesch-Fries, S. and Tumer, N. E. 1990. Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annual Review of Phytopathology*. 28. 451-474.
- Beck, D. , Guilford, P.J., Voot, D. M., Andersen, M. T. & Forster, R. L.S. 1991. Triple block proteins of clover mosaic potex-virus are required for transport. *Virology* 183:695-702.

- Beck, D.L., Van-Dolleweerd, C. J., Lough T-J., Balmori E., Voot, D. M. Andersen, M, O'Brien. I.E.W, and Foster. R.L.S. 1994. Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with a triple gene block. *Journal of General Virology*. 91: 10310-10314.
- Bozart, R.F. Harley, E. 1976. The electrophoretic mobility of double strand RNA in polyacrilamide gels as a function of molecular weight. *Biochem. Biophys. Acta*. 432:329-335.
- Clark, M. F. Bar-Joseph, M. 1985. *Plant virus enzyme immunosorbent Assays*. 51-85.
- Camacho, N., Peñaranda, J., Hernández, J. Cano, R, y Acosta, O. 1991. Curva de crecimiento del virus X de la papa en hojas de *Nicotiana tabacum* estimada con el método de Elisa, *Phytopathology*. 81, 691.
- Chomezynski, P., Sacchi, N. 1987. *Annals Biochemical*. 162:156.
- De Block, M 1988. Genotype independent leaf disc transformations of potato *Solanum tuberosum* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theoretical Applied Genetics*. 76: 767-774.
- Goodman, R. 1975. Reconstitution of potato virus X *in vitro*. II Characterization of the reconstituted product. *Virology*. 68:299-308.
- Guerrero, O. 1978. Evaluación de pérdidas ocasionadas en la variedad ICA- Puracé por los virus PVX, PVY, PLRV. Tesis (M. SC.) Universidad Nacional de Colombia. Instituto colombiano Agropecuario. Bogotá.
- Huisman Marianne, Linthorst, H. Bol, J. Cornelissen, B. 1988. The complete nucleotide sequence of potato virus x and its homologies at the amino acid level with varios plus-stranded RNA viruses. *Journal of General Virology*. 69:1789-1798.
- Koenig, R. Torrance. 1986 Antigenic analysis of potato virus X by means of monoclonal antibodies. *Journal of General Virology*. 67:2145-2151.
- Mathews, G. 1982. Classification and nomenclature of viruses. Ed. *Intervirol*. 157-256.
- Morozov. S. Yu., Miroshnichenko, N. A., Solovvey. A. G., Fedorkin, O. N., Zelenina, D. A., Lukasheva, L. I., Karasev. A. V., Dolja, V. V. Atebekov. J. G. 1991. Expression strategy of potato virus X triple gene block. *Journal of General Virology*. 72:2039-2042.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Orman, B. E., Celnik, R. M, Mandel, A. M., Torres, H. N. & Mentaberry, A. N. 1990. Complete cDNA sequence of a South American isolate of potato virus X. *Annals of Applied Biology*. 95: 93-103.
- Peñaranda, J. 1996. Biología molecular de virus. ED. eun (Editorial Universidad Nacional de Colombia). 203-298
- Querci, M. van der Vlugt, R. Goldbach and Salazar. L.F. 1993. RNA sequence of potato virus X strain HB. *Journal of General Virology*. 74: 2251-2255.
- Salazar, L. 1982. Manual de enfermedades virosas de la papa. Lima, Perú; Centro Internacional de la papa (250).
- Sambrook, J., Maniatis, T. Fritesch, E.F. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
- Seppänen, P. Puska, P. Honkanen, J. Tyulkina, L. Fedorkin, O. Morozov, Atabekov. Movement protein-derived resistance to triple gene block-containing plant viruses. *Journal of General Virology*. 78: 1241-1246.
- Wilson, T.M.A. 1993. Strategies to protect crop plants against viruses: Pathogen-derived resistance blossoms. *Proc. Acad. Sci. USA*. 90. 3134-3141.