



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

PROYECTO: 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

PNUD/UNESCO/ONUDI DP/RLA 83/003

PARTICIPANTES:

ELIZABETH HUBERT S.
CRISTINA THEODULOZ L.
JULIO SAEZ V.
FERNANDO POBLETE C.
LAB. BIOQUIMICA VEGETAL
UNIVERSIDAD DE TALCA

ENRIQUE GONZALEZ V.
CLAUDIO VASQUEZ G.
LAB. BIOLOGIA MOLECULAR

ANDRES CONTRERAS M.
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

COORDINADOR: LUIS MEZA-BASSO
PROGRAMA DE BIOLOGIA VEGETAL
UNIVERSIDAD DE TALCA - CHILE

A. TAREAS A REALIZAR

A. Coordinar en Chile las actividades del proyecto específico, llevando a cabo las actividades listadas a continuación:

1. Caracterización de al menos tres genotipos de variedades locales de papa obtenidos de cultivares o banco de germoplasma con resistencia a los virus PVX y PVY, registrando la reacción específica de resistencia y la concentración de los virus.
2. Infección *in vitro* de protoplastos de papa obtenidos de genotipos sensibles y de dos genotipos resistentes a PVX. Análisis de la replicación viral por el método de ELISA, hibridación molecular e inmunofluorescencia.
3. Purificación y clonaje molecular de los genomas de PVX y PVY.
4. Purificación y clonado molecular del genoma de PVS
5. Selección de clones cDNA viral con características especiales para su análisis con objeto de identificar secuencias que puedan ser utilizadas para confeccionar genes de resistencia.
6. Búsqueda y selección de claves de cDNA codificantes para la proteína de cápside de PVS.
7. Puesta a punto de las técnicas de transformación de papa de interés para Chile.

B. Intercambiar información con los laboratorios de los otros países participantes.

C. DESCRIPCION DE LOS TRABAJOS REALIZADOS Y DEL AVANCE LOGRADO

BUSQUEDA DE GENES DE RESISTENCIA A VIRUS PVX, PVY Y PVS EN COLECCIONES DE BANCOS DE GERMOPLASMA Y CULTIVARES DE PAPAS LOCALES

La muestra analizada corresponde a 532 clones pertenecientes a la colección chilota del banco de germoplasma chileno de papa. Esta colección se encuentra a disposición de los investigadores en el Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Universidad Austral de Chile.

En primera instancia, el análisis de sensibilidad y/o potencial resistencia a los virus PVX y PVY se realizó en 211 clones de esta colección. Para tal efecto, se utilizaron plantas indicadoras; *Gomphrena globosa* para el virus PVX y *Nicotiana tabacum* para el virus PVY. Los respectivos virus fueron gentilmente proporcionados por el Dr. Gastón Apablaza, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.

C.1. DETERMINACION DE SENSIBILIDAD MEDIANTE EL USO DE PLANTAS INDICADORAS

Inoculación de *Nicotiana tabacum*

Se extrajo la savia de las hojas de cada uno de los clones frotándolas sobre papel lija. El jugo vegetal obtenido, se aplicó frotando suavemente con una mota de algodón a cada una de las hojas de la planta indicadora, tratada previamente con carborum. Luego de este procedimiento, la hoja inoculada fue lavada con agua destilada.

Inoculación de *Gomphrena globosa*

La inoculación de *G. globosa* se realizó siguiendo la metodología utilizada en *N. tabacum*. Esta vez la inoculación se realizó en varias hojas lo que permitió el análisis de varios clones de papa a la vez usando una planta indicadora única.

Análisis de las plantas inoculadas.

Luego de 10 a 15 días post-inoculación, se determinó positiva la reacción por la aparición de síntomas de necrosis o mosaico. El virus X produjo en *G. globosa* lesiones locales necróticas con borde rojizo y no se hizo sistémico. A diferencia de lo ocurrido en *N. tabacum* donde el virus PVYN produjo un mosaico sistémico. Esta metodología permitió encontrar lo resumido en la tabla 1 de la página siguiente.

De acuerdo a estos resultados, se seleccionaron algunos clones representativos con propiedades de sensibilidad o resistencia potencial a los virus PVX y PVY.

TABLA 1

	Nº clones
Resistencia Potencial a PVX y PVY	58
Sensibles a PVX	34
Sensibles a PVY	75
Sensibles a PVX y PVY	44

C.2 ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS PARA DETECCION DE LA ENFERMEDAD VIRAL

C.2.a. Purificación de los virus PVX y PVY

Los virus PVX y PVY se mantuvieron y aislaron a partir de tejido foliar de la planta indicadora *N. tabacum* (White Burley). La purificación de PVX se realizó homogenizando el tejido foliar en un tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4), 0,1% ácido tioglicólico, éter/CCl₄ 1:4. Luego fue centrifugado a 3.800 x g por 20 min. y el sobrenadante ultracentrifugado a 80.000 x g. El protocolo de purificación para PVY se realizó homogenizando tejido foliar infectado (100 g) en tampón borato de sodio 0,1 M pH 8,0, EDTA 0.05 M y ácido ascórbico 0,3%. El material fue ultracentrifugado en un colchón de sacarosa (10-40%) y el contenido, fraccionado en un colector convencional, conservándose aquellas fracciones con una razón A₂₆₀/A₂₈₀ cercana a 2. En el caso de PVY se trabajó con dos cepas: PVY^o y PVY^N.

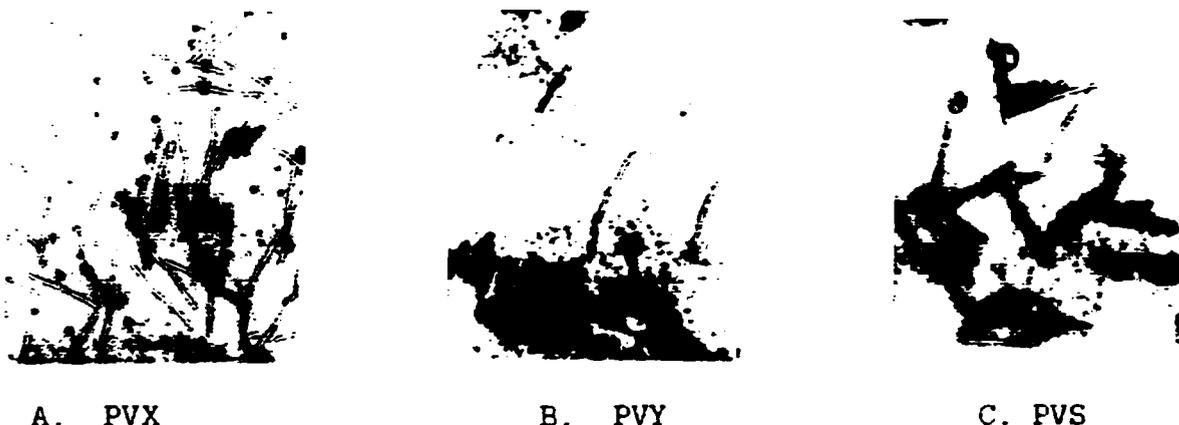
C.2.b. Purificación del virus PVS

Los viriones de PVS fueron purificados a partir de hojas de *Chenopodium quinoa* infectadas. Este material fue gentilmente cedido por el Dr. E. Hopp. El procedimiento utilizó 80 g de hojas. La homogeneización se efectuó por molienda con N₂ líquido. El polvo fue resuspendido en 200 ml de tampón fosfato 0,1 M (pH 8,0), 0,15% 2-mercapto etanol y 10% etanol. El homogeneizado fue filtrado a través de gasa estéril y centrifugado a 5.000 x g durante 20 min.. Los viriones del sobrenadante fueron precipitados mediante la adición de triton-X100 al 1% y PEG-8.000 al 4%. La suspensión se mantuvo con agitación a 4°C por 60 min. El precipitado fue sedimentado por centrifugación a 5.000 x g durante 10 min. y posteriormente resuspendido en 20 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 8,0) y 2 mM EDTA, (tampón B) Las partículas no suspendidas fueron eliminadas por centrifugación a 10.000 x g durante 20 min. El sobrenadante fue aplicado a tubos de centrifuga (rotor Beckmann SW-28) y fraccionado a través de un gradiente de sacarosa del 10 al 40%. La ultracentrifugación fue realizada a 100.000 x g durante 60 min. El gradiente fue fraccionado, determinándose la A₂₆₀ y A₂₈₀ para cada fracción. Las fracciones conteniendo el virus fueron reunidas y centrifugadas por 90 min. a 160 k x g a fin de sedimentar los viriones purificados. El sedimento fue resuspendido en 1 ml de tampón B.

C.2.c. Microscopía electrónica de los virus

El grado de pureza de las preparaciones virales fue analizado por M.E. (Phillips modelo EM 300) por tinción negativa. Las microfotografías de la figura 1 (paneles A, B, C) se muestran a continuación:

Figura 1



A. PVX

B. PVY

C. PVS

C.2.d. Preparación de antisueros contra PVX, PVY y PVS

Los anticuerpos contra cada uno de los virus fueron desarrollados en conejo, inyectando subcutáneamente 0,2 mg de cada partícula viral en 10 mM NaCl y 3 ml de coadyuvante de Freund completo, seguido por dos inyecciones separadas por 10 días de los virus con coadyuvante incompleto. A fin de decidir el día del sangramiento, el título del suero fue seguido por la técnica de Outchterlony.

Los antisueros fueron purificados adicionalmente mediante cromatografía en una columna de DEAE-celulosa en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,4. Se aplicaron 6 ml de antisero cada vez y luego de lavar la columna con el buffer de equilibrio, la muestra fue eluida mediante un gradiente lineal de NaCl entre 0 y 0.1 M. Se colectaron fracciones de aprox. 6 ml y se reunieron aquellas que mediante análisis electroforético e inmunodots contenían la fracción IgG anti-viral. El perfil se muestra en la figura 2 (Página 5).

C.2.e. Montaje de DAS-ELISA y determinación del rango de sensibilidad.

El protocolo empleado corresponde básicamente al descrito por Clarck y Adams (1977). Las fracciones IgG tuvieron títulos superiores a 1:2000, pudiéndose detectar entre 5 y 10 ng de antígeno.

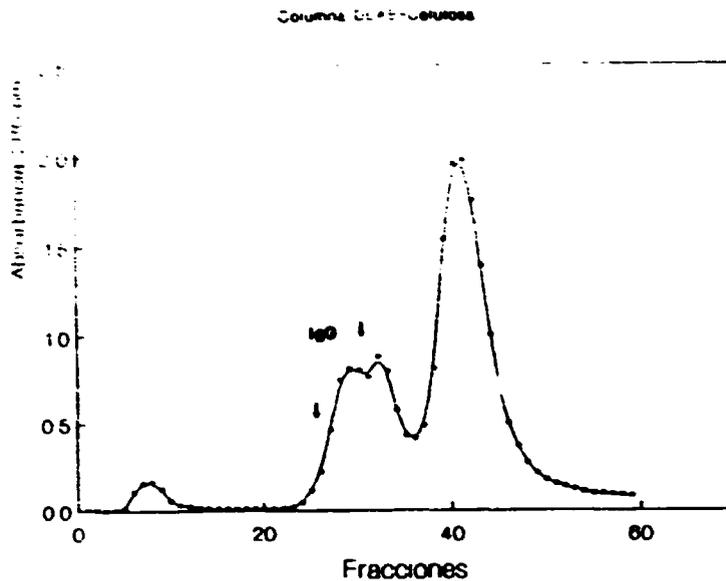


Figura 2: Purificación de la fracción IgG anti proteína viral. Las fracciones seleccionadas se encuentran entre flechas

C.2.f. Western blotting

Las proteínas de las cápsides fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente, transferidas a papel de nitrocelulosa de acuerdo al método descrito por de Tsang et al, 1983. La transferencia se efectuó a 75 mA usando como tampón 0,025 M Tris base, 0,192 M glicina, 0,1% SDS y 20% metanol a pH 8,5. Luego de 10 horas de transferencia, el papel de nitrocelulosa fue removido de la superficie del gel y fue procesado por inmunodetección del antígeno, empleando anticuerpos contra las proteínas de la cápside de cada virus en particular. La señal fue amplificada empleando como segundo anticuerpo la fracción anti IgG de conejo crecida en cabra y conjugada a fosfatasa alcalina.

C.2.g. Infección *in vitro* de protoplastos de papa

g.1 Micropropagación del material

Fuente de explantes:

Se trabajaron diversos clones con características potenciales de resistencia a PVX y PVY, seleccionados de acuerdo a lo descrito en C.1. Los explantes se obtuvieron a partir de yemas de tubérculos de papa para los clones 58, 40, 70, 82, 296, 57, 282, 297, 62, 1, 4 y 34. Los tubérculos fueron mantenidos previamente a temperatura ambiente y en oscuridad para inducir la brotación.

La desinfección superficial de las yemas se realizó de la siguiente manera: 1. lavado con agua corriente; 2. enjuague con hipoclorito de sodio al 30% durante 5 a 10 minutos; 3. enjuague con etanol al 70% durante 1 minuto; 4. enjuague tres veces con agua destilada estéril.

g.2 Protocolo para obtención de protoplastos

1. Se seleccionaron plantas micropropagadas de variedades susceptibles y potencialmente resistentes. 2. De cada plántula se subcultivaron el ápice y segmentos nodales en los medios de cultivo para micropropagación precisados en Anexo 1 y el tejido foliar se utilizó para la obtención de los protoplastos. 3. Las hojas fueron depositadas en una placa petri conteniendo aproximadamente 10 ml del medio de digestión enzimático descrito en el Anexo 2. El raquis fue eliminado y la lámina cortada con un bisturí para permitir una mejor penetración enzimática. 4. El material así obtenido fué colocado en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 30 ml del medio de digestión enzimático e incubado en oscuridad y agitación durante la noche. 5. El material digerido fue filtrado a través de un filtro de 50 μ m de tamaño de poro en un vaso de precipitado de 100 ml. Se tomó la precaución de que el filtrado escurriera por las paredes del vaso con el fin de no dañar los protoplastos. 6. El filtrado se centrifugó a 100 x g durante 15 minutos a 4°C. 7. Se descartó el sobrenadante y los protoplastos precipitados fueron resuspendidos en 30 ml de manitol 0,4 M. Se centrifugó a 100 x g por 15 minutos y se descartó el sobrenadante dejando los protoplastos en un mínimo volumen. 8. Se tomó una alícuota de la suspensión de protoplastos obtenidos y se realizó el recuento utilizando una cámara de Neubauer. Una preparación tipo se muestra en la figura 3.

(*) Los medios de micropropagación y digestión enzimática se detallan en Anexo 1 y 2.

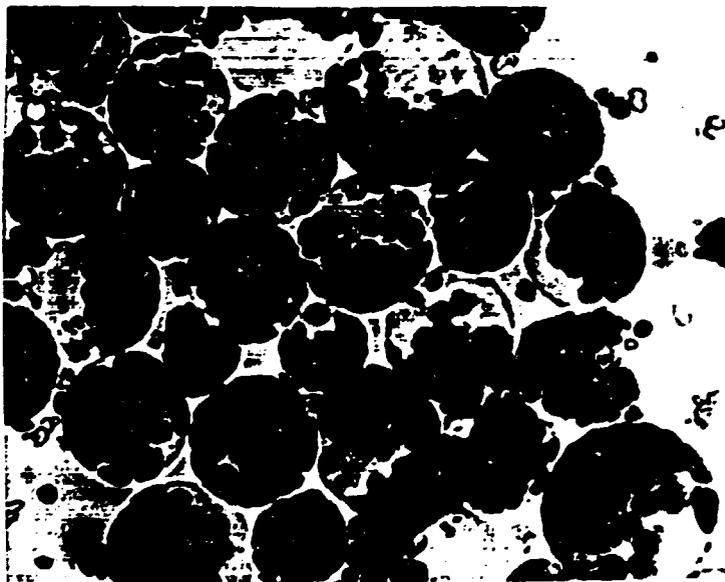


Figura 3: Protoplastos aislados de papa

g.3. Protocolo para la infección viral

La infección con virus PVX se llevó a cabo incubando durante 1,5 minutos los protoplastos en un tubo de centrifuga de 15 ml conteniendo PEG-6000 al 25%, CaCl_2 3 mM y virus en una proporción de 30 ng PVX por cada 300 protoplastos por μ l de solución. Los controles fueron sometidos al mismo procedimiento, excepto que éstos no fueron

infectados. Se centrifugó a 100 x g durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y los protoplastos fueron lavados mediante centrifugación 2 veces con manitol 0,4 M y CaCl₂ 1 mM con aproximadamente 15 ml, descartando el sobrenadante cada vez y finalmente se sometieron a un lavado con manitol 0,4 M. Se centrifugó y se dejó en mínimo volumen. Se realizó el recuento utilizando una cámara de Neubauer. Se tomaron alícuotas de los protoplastos post-infección y se incubaron durante 0, 20 y 40 horas en exceso de medio A (descrito en Anexo 2) a 21°C con iluminación constante. Una vez transcurridos los tiempos de incubación los tubos conteniendo los protoplastos fueron guardados en el congelador.

g.4 Seguimiento de la infección viral
Protocolo para DAS-ELISA (Técnica de biotina-estreptavidina).

Para la realización de esta técnica se utilizaron los antisueros policlonales obtenidos en el laboratorio.

1. Las muestras correspondientes a los diferentes tiempos de incubación post-infección (0, 20 y 40 horas) y controles fueron descongelados y centrifugados a 100 x g durante 1,5 minutos. Se descartó el exceso de medio A y se tomó una alícuota para el test de ELISA.
2. A cada una de las alícuotas se les agregó tampón BEV (buffer de extracción de los virus) en cantidad suficiente para completar un volumen final de 200 ul.
3. Para sensibilizar la placa se agregaron 200 ul de Ig Anti PVX en tampón Coating y se dejó durante la noche a 4°C.
4. Se realizaron 3 lavados durante 5 minutos con tampón PBS-Tween.
5. Se bloquearon los sitios no específicos con tampón PBS-Tween-Leche durante 30 minutos a 37°C.
6. Idem 4.
7. Se agregaron las alícuotas de protoplastos a cada pocillo sensibilizado previamente. Se incubó durante 60 minutos a 37°C.
8. Idem 4.
9. Se adicionó el segundo anticuerpo (Anti Rabbit IgG biotinilado) a una concentración de 2,5 ug/ml en tampón PBS-Tween-leche y se incubó durante 60 minutos a 37°C.
10. Idem 4.
11. Se agregó la estreptavidina a una concentración de 2,5 ug/ml en tampón PBS-Tween y se incubó entre 15-30 minutos a 37°C.
12. Idem 4.
13. Se adicionó la enzima peroxidasa biotinilada en tampón PBS-Tween a una dilución de 1:2000 y se incubó entre 15-30 minutos a 37°C.
14. Idem 4.
15. Se agregó el sustrato y se esperó el desarrollo de color (10-15 minutos).
16. La densidad óptica fue determinada a 492 nm en un lector de ELISA Labsystems Uniskan I.

g.5. Resultados de los experimentos de infección *in vitro*

De acuerdo a los protocolos descritos en C.2.g (1-4) fueron aislados protoplastos e infectados a partir de diversos clones. La cantidad de proteína viral de PVX en los protoplastos, en los controles así como en los diferentes tiempos de incubación post-infección, fue determinada mediante el test de ELISA utilizando una curva de calibración. Un ejemplo de estos experimentos corresponde a la infección *in vitro* con el virus PVX a diferentes concentraciones. El test de ELISA entregó los siguientes resultados:

	Hrs. post-infección	ng Virus protoplasto x 1000
Clon 70	0	0,8
	20	1,2
	40	5,0
Clon 297	0	0,6
	20	0,9
	40	3,0
Clon 58	0	0,69
	20	0,57
	40	0,67
Clon 4	0	0,03
	10	0,08
	20	0,98
	30	1,96
	40	2,47

La figura 4 representa la aparición de proteína viral expresada en ng de PVX por protoplasto a través del tiempo. De acuerdo a la gráfica se observa que en el clon 58 la cantidad de proteína viral se mantiene aproximadamente constante versus el tiempo con respecto al tiempo 0 de infección. Por otra parte el comportamiento de los clones 70, 297 y 4 es relativamente similar notándose una misma tendencia en el aumento de la cantidad de proteína viral. Este aumento se hace más significativo a partir de las 20 hrs. post-infección. De acuerdo a los resultados se podría esperar que el clon 58 presenta un mayor grado de resistencia contra el virus PVX a diferencia de los restantes clones analizados.

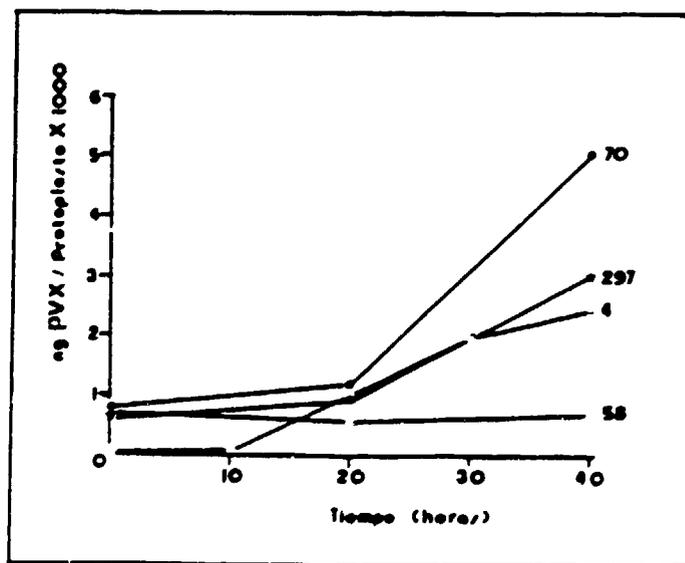


Figura 4: Virus PVX, infección *in vitro*

C.3. SCREENING FINAL DEL ESTADO FITOSANITARIO DE LA COLECCION CHILOTA

Se determinó el estado fitosanitario para los virus PVX, PVY y PVS en 530 clones de la Colección Chilota del Banco de Germoplasma de Papa de la Universidad Austral de Chile. Para llevar a cabo estos ensayos se utilizó la técnica de NCM-ELISA. La replicación y purificación de los tres virus se efectuó en nuestro Laboratorio, obteniéndose anticuerpos policlonales específicos para PVX y PVS. En tanto que los anticuerpos contra PVY no fue lo suficientemente específica por lo que se utilizó una preparación cedida por el Dr. Luis Salazar, Laboratorio de Virología, Centro Internacional de la Papa.

C.3.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

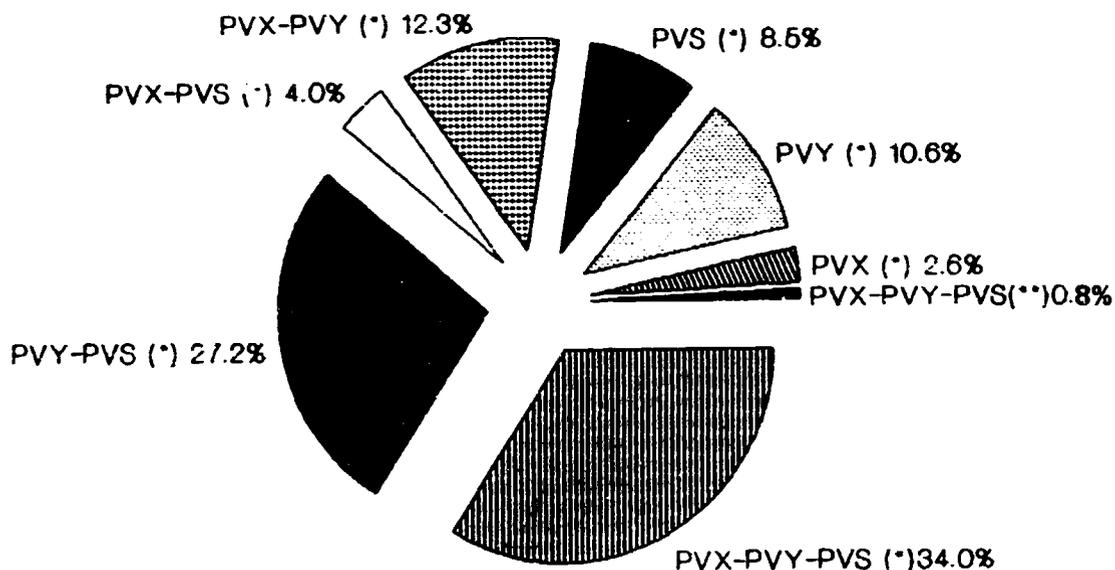
Se colectaron e identificaron en bolsas plásticas hojas provenientes de las zonas, basal, media y apical de cada uno de los clones crecidos en invernadero. Se cortaron discos de 1 cm de diámetro de cada hoja y se maceraron en presencia de 3 ml de tampón de extracción (TBS-EDTA) que contiene 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 20 mM EDTA y 0.02 % NaNa

C.3.2. PROTOCOLO PARA NCM-ELISA.

Se aplicó 30 ul de savia vegetal de cada una de las muestras en una membrana de nitrocelulosa 12 x 8 cm. Se agregaron 25 ml de tampón TBS-leche (2.0 % leche descremada) a manera de bloquear los sitios libres de la membrana y se incubó por 60 minutos. Posteriormente, se descartó esta solución y se agregó, en dilución apropiada, 25 ml de solución de los anticuerpos específicos, en TBS-leche. Se incubó con agitación durante la noche. Después, se lavó la membrana 3 veces durante 5 minutos con T-TBS (TBS-0.05 % Tween). Se adicionaron 25 ml de Anti-IgG conejo conjugado a fosfatasa alcalina, diluido 1:1000 en tampón TBS-leche y se incubó 60 min.. Se lavó la membrana tres veces durante 5 min. con tampón T-TBS. Finalmente, se agregaron 20 ml de sustrato de la fosfatasa alcalina (2 mg de NBT, 1 mg de BCIP en 20 ml de tampón 0,1 M Tris pH 9.5, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂ y 0.2 % NaNa) y se esperó entre 15 y 30 minutos para visualizar la reacción.

El análisis de 530 clones permitió encontrar que un del total de la colección el 2,8 % se encuentra infectado solo por PVX, el 10,6 % solo infectado con el PVS, el 8,5 % solo infectado con PVY y 6 clones simultaneamente sanos a PVX, PVY y PVS. La expresión gráfica de estos resultados se encuentra a continuación en la figuras 5. Cabe señalar que para determinar la sanidad de cada uno de los clones, se realizaron dos ensayos con un intervalo de 1 mes aproximadamente. El análisis fitosanitario de los 530 clones se repitió en la temporada 1991, manteniéndose en una gran proporción (> 96 %) los resultados obtenidos en la temporada 1990. El resultado de cada uno de las entradas del banco de germoplasma chileno de papa se detalla en el listado del Anexo 3.

FITOSANIDAD A LOS VIRUS PVX, PVY Y PVS.



(*) Infectadas (**) Sanas
 Total de plantas analizadas : 530
 Técnica utilizada : NCM-ELISA

Figura 5. Relación porcentual del análisis fitosanitario mediante NCM-ELISA. Porcentajes con respecto a los virus PVX, PVY y PVS. (*) plantas infectadas (**) plantas sanas.

C.4. INFECCION FORZADA DE LOS CLONES A NIVEL DE PLANTA

Cuatro de los seis clones que mostraron sanidad a los virus PVX, PVY y PVS analizados por NCM-ELISA y plantas indicadoras fueron forzados mecánicamente a la infección con preparaciones de los tres virus purificados. El ensayo se prolongó por 30 días, analizando muestras de tejido foliar cada 10 días.

Luego de la inoculación con los 3 virus individuales y más precisamente luego de 10 días, algunas plantas mostraron síntomas claros de enfermedad viral (mosaico clorótico y defoliación), mientras que las plantas controles permanecieron asintomáticas. La fotografía de la figura 6 de la página 11 muestra el daño producido por la infección forzada con PVX. La planta de la derecha corresponde al control sin infectar.



Figura 6: Plantas infectadas (A) y control (B) con PVX.

La detección de PVX y PVS se realizó mediante el ensayo de NCM-ELISA, DAS-ELISA y western blot, en tanto que para la detección de PVY se empleó la técnica NASH. La razón de este cambio de técnica se debió a que los anticuerpos policlonales obtenidos en el laboratorio no fueron lo suficientemente específicos para asegurar un resultado confiable.

Las fotografías de la figura 7 y la tabla 2 de la página 12 muestran el resultado del ensayo NCM-ELISA de los clones inoculados con PVX and PVS. Luego de la inoculación, el virus PVX fue detectado en todos los clones ensayados. Sin embargo, en la figura 8 (Panel A) en el clon 315 se aprecia una disminución de la señal de infección a los 30 días (t_3) en comparación a lo que ocurre en a los 10 días (t_1) y veinte días (t_2). Este resultado podría ser explicado aduciendo una degradación de la proteína viral. Un resultado similar fue observado por el Dr. Esteban Hopp al infectar protoplastos *in vitro* con PVX. (Informe semestral proyecto "Resistencia a virosis en papa, 1989 p.1-23). Maat da una explicación diferente a la disminución de la concentración viral, diciendo que la planta enferma deja de constituir un habitat adecuado para la multiplicación del virus (Maat, D.Z. 1989. Purificación de los virus. In: J.A. de Bokx (ed.) Virosis de la papa y de la semilla de papa. Wageningen, Netherlands, p. 65-78). Por otra parte, la multiplicación viral en los otros clones en cambio es ascendente.

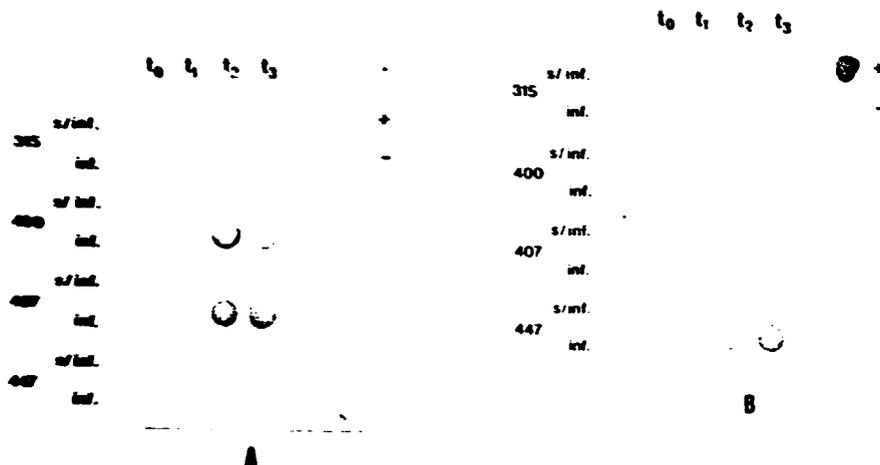


Figura 7. Análisis NCM-ELISA. Infección forzada el virus FVX (Panel A) y PVS (Panel B).

TABLA 2.

Clon	PVX				PVS			
	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃
315-UA-1553	-	+	+	-	-	-	-	-
400-CON-921	-	+	+	+	+	-	-	-
407-CON-928	-	+	+	+	-	+	+	+
447-CON-993	-	+	+	+	-	+	+	+

t₀: tiempo 0; t₁, t₂, y t₃: muestras tomadas a los 10, 20 y 30 días luego de la inoculación, respectivamente.

Con respecto a los clones inoculados con PVS, el clon 400 presenta una señal positiva al tiempo t₀. Sin embargo, no se detectó ninguna evidencia de enfermedad a los tiempos posteriores. Este resultado podría ser atribuido a una infección localizada sin el desarrollo de la enfermedad sistémica, debido probable mente a la activación de mecanismos de resistencia. El clon 315 parece ser resistente a PVS, dado a que a la reacción negativa en el test de NCM-ELISA, en tanto que los clones 407 y 447 parecen ser sensibles a esta enfermedad viral.

La fotografía de la figura 8 muestra el resultado obtenido a través del análisis DAS-ELISA para los cuatro clones inoculados con PVX. Como se aprecia, cada uno de los clones presenta un aumento de la concentración de la proteína viral versus el tiempo. Esta tendencia fue observada hasta el tiempo t_2 , sin embargo, al tiempo t_3 existe una disminución que es más marcada en el clon 400. Estos resultados se correlacionan con exactitud con los obtenidos a través del ensayo NCM-ELISA, lo que indica por lo tanto que los cuatro clones serían sensibles a PVX.

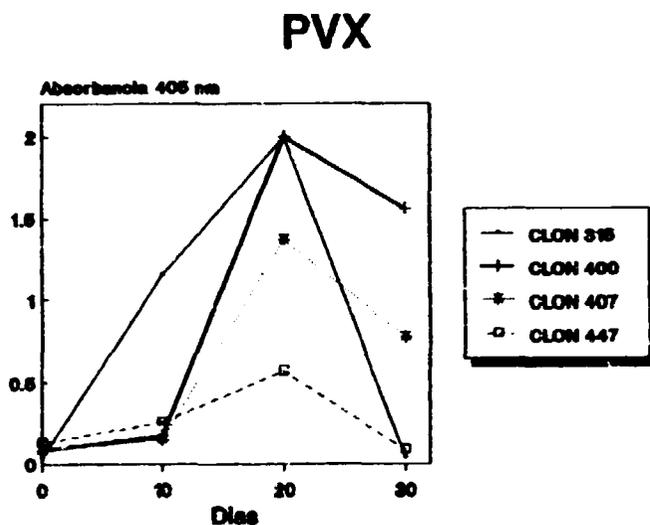


Figura 8. Aparición de la proteína de la cápside del virus PVX a través del tiempo en los clones inoculados. La determinación fue realizada mediante DAS-ELISA. Los tiempos de análisis corresponden a los de la Tabla 2.

En lo relativo a la infección con PVS, la fotografía de la figura 9 de la página siguiente muestra que los clones 407 y 447 presentan un aumento de la concentración de la proteína viral versus el tiempo posterior a la inoculación. Por otra parte, el clon 315 y el 400 muestran una concentración viral constante, sugiriendo la existencia de una capacidad para inhibir la replicación viral. Estos resultados confirman lo obtenido a través del ensayo NCM-ELISA. Todos los clones alcanzaron la máxima concentración de la proteína viral al tiempo t_2 . Luego de este tiempo, la concentración viral decreció significativamente. Este comportamiento ha sido observado en experimentos de laboratorio y de campo por Singh, quién informó descensos de hasta un 70% en la concentración de PVS en el tiempo (Singh, R.P. et al. Can. J. Plant Sci. 69: 1347-1352).

PVS

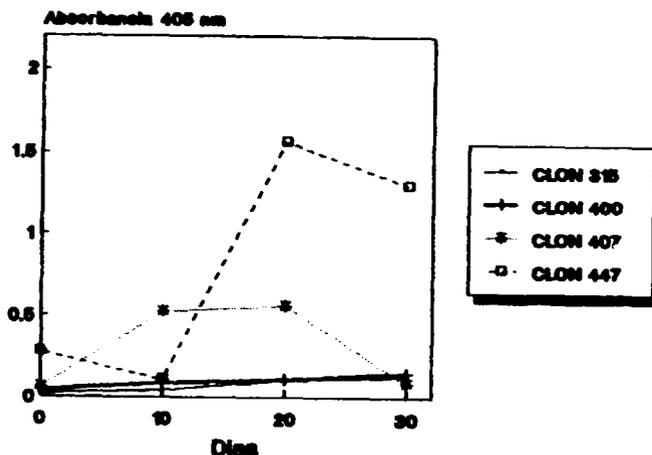


Figura 9. Aparición de la proteína de la cápside del virus PVS a través del tiempo en los clones inoculados. La determinación fue realizada mediante DAS-ELISA. Los tiempos de análisis corresponden a los de la Tabla 2.

Un tercer tipo de análisis se realizó con los cuatro clones en estudio y éste se refiere al análisis western. La Table 3, resume estos resultados, encontrándose una excelente correlación con respecto a los análisis NCM-ELISA y DAS-ELISA

TABLE 3

Análisis Western blot de los clones inoculados con PVX y PVS

Clon	PVX				PVS			
	to	t1	t2	t3	to	t1	t2	t3
315-UA-1553	-	+	+	-	-	-	-	-
400-CON-921	-	-	+	+	+	-	-	-
407-CON-928	-	-	+	+	-	+	+	+
447-CON-993	-	-	+	+	-	+	+	+

to: tiempo 0; t1, t2, y t3: muestras tomadas a los 10, 20 y 30 días luego de la inoculación, respectivamente.

Las fotografías de las figuras 10 y 11 corresponden a membranas de nitocelulosa reveladas por el procedimiento descrito anteriormente utilizando anticuerpos contra la proteína de la cápside

proteína de la cápside de PVX. La primera de éstas expresa el resultado de la transferencia de extractos celulares de los clones 315 y 400. En tanto que la figura 11 corresponde al análisis de los clones 407 y 447.

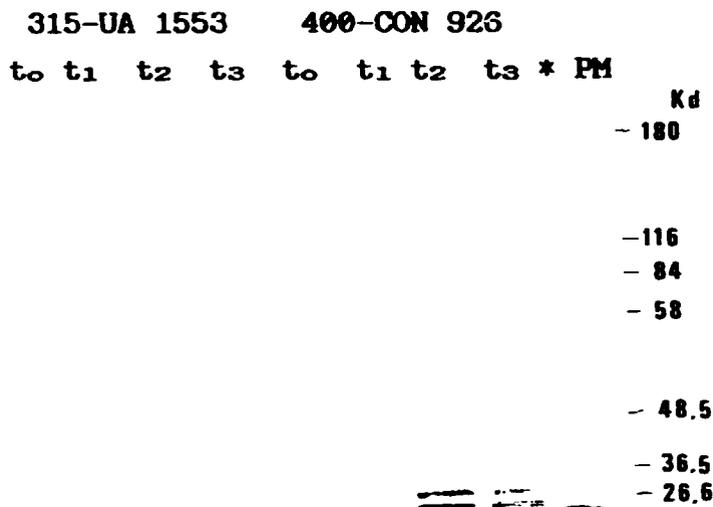


Figura 10. Western blot de los clones 315 y 400 inoculados con PVX. Los tiempos de análisis corresponden a lo de la Tabla 2. (*) virus PVX purificado.

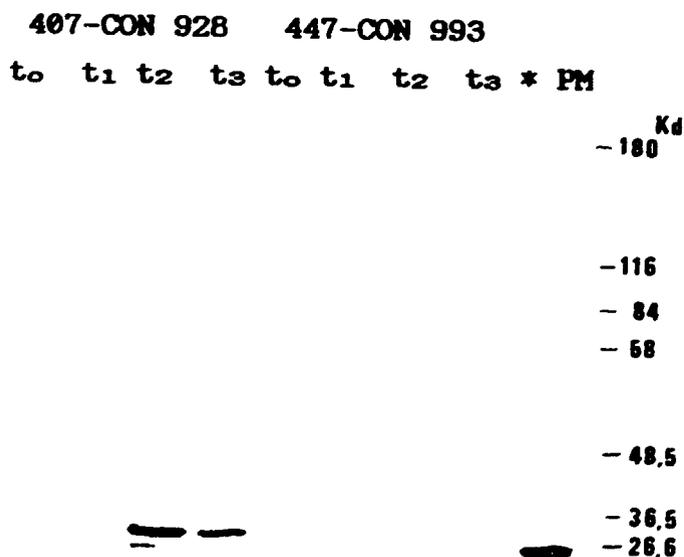


Figura 11. Western blot de los clones 407 y 447 inoculados con PVX. Los tiempos de análisis corresponden a lo de la Tabla 2. (*) virus PVX purificado.

Las fotografías de las figuras 12 y 13 corresponden a membranas de nitocelulosa reveladas por el procedimiento descrito anteriormente, esta vez utilizando anticuerpos contra la proteína de la cápside de PVS. La figura 12 da cuenta del resultado de la transferencia de extractos celulares de los clones 315 y 400 y la figura 13 corresponde al análisis de los clones 407 y 447.

315-UA 1553 400-CON 926
 t₀ t₁ t₂ t₃ t₀ t₁ t₂ t₃ & PM

Kd
 -180

 -116
 - 84
 - 58

 - 48.5
 - 36.5

 - 26.6

Figura 12. Western blot de los clones 315 y 400 inoculados con PVS. Los tiempos de análisis corresponden a lo de la Tabla 2. (*) virus PVS purificado.

407-CON 928 447-CON 993
 t₀ t₁ t₂ t₃ t₀ t₁ t₂ t₃ & PM

Kd
 -180

 -116
 - 84
 - 58

 - 48.5
 - 38.5
 - 26.6

Figura 13. Western blot de los clones 315 y 400 inoculados con PVS. Los tiempos de análisis corresponden a lo de la Tabla 2. (*) virus PVS purificado.

C.5. Detección de PVY mediante hibridación molecular

C.5.1. Obtención del vector que contiene clonado el fragmento para la detección de PVX y PVY.

La sonda para la detección de los virus PVX y PVY fueron gentilmente proporcionadas por el Dr. Alejandro Mentaberry del Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, Bs. Aires, Argentina.

La cepa de *E. coli* JM 107 con el vector Bluescript M 13+ conteniendo un fragmento de alrededor de 750 pb de la cápside del virus PVY fue cultivada en medio Terrific broth (triptona 12 gr, extracto de levadura 24 gr, glicerol 4 ml y agua destilada csp 1 l). Una vez esterilizado, se agregó ampicilina a una concentración final de 60 ug/ml y se ajustó el pH adicionando 100 ml de una solución fosfato diácido de potasio 0,17 M, fosfato dibásico de potasio 0,72 M. Previo al cultivo, un preinóculo de esta cepa fué cultivado en 2 ml de medio Luria-Bertani y ampicilina a una concentración final de 60 ug/ml. El cultivo se mantuvo en un agitador orbital a 200 rpm durante la noche a 28°C. Las células fueron cosechadas por centrifugación y el DNA del plásmido fue obtenido mediante el procedimiento de lisis alcalina. Una preparación tipo se muestra en la fotografía de la figura 14.



Figura 14. Obtención del plásmido Bluescript con inserto de PVY. Gel de agarosa al 1% en tampón TBE. Carril 1: plásmido bluescript no recombinante. Carril 2 y 3: preparaciones de plásmido Bluescript con inserto PVY, carril 2: 10 uL, carril 3: 5 uL.

C.5.2. Sulfonación de la sonda.

El plásmido conteniendo la sonda fué diluído a 0,5 mg/ml y luego denaturado por calentamiento a 100°C por 10 min y enfriamiento rápido en hielo. Se siguieron a continuación las indicaciones del proveedor del kit de sulfonación (Sigma Chemical Co.).

C.5.3. Preparación de las muestras para la prueba de NASH.

Se colectaron muestras de las partes apical y media en bolsas plásticas. Se cortó y maceró discos foliares de aproximadamente 1 cm de diámetro. La maceración se efectuó mecánicamente utilizando 1 en tampón TBS suplementado con 20 mM EDTA por cada disco. Se tomó 500 uL de este extracto en un tubo de microcentrífuga y se agregó un volumen de tampón 20 X SSC (0,3 M citrato de sodio, pH 7,0, 3 M cloruro de sodio) suplementado con formaldehído al 18,5 % concentración final. Posteriormente, se adicionó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó por 10 min y se sembró 20 ul de la fase acuosa superior sobre una membrana de nitrocelulosa previamente tratada con 10 X SCC. La siembra se realizó con un equipo de multifiltro al vacío. El RNA viral se fijó a la membrana. horneándola por 2 horas al vacío.

C.5.4. Detección de los virus mediante NASH.

La hibridación molecular se efectuó de acuerdo a Sambrook (Sambrook et al, 1989 Molecular Cloning. A laboratory manual) en tanto que la visualización de la reacción se realizó según las indicaciones del proveedor, Sigma Chemical Co.

C.5.5. Análisis de resistencia a PVY

En relación al estudio de fuentes de resistencia al virus PVY se utilizaron los mismos 4 clones empleados para la inoculación forzada con PVX y PVS. El resultado de este análisis se muestra en la fotografía de la figura 15, en la cual se aprecia que la hibridación

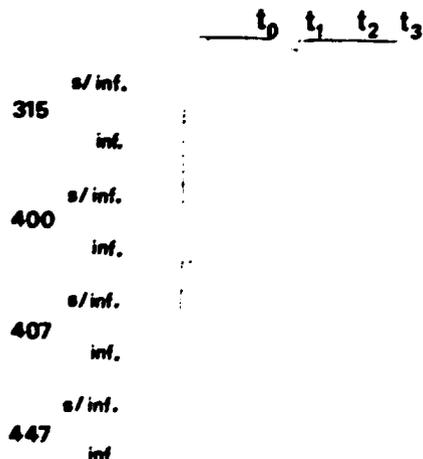


Figura 15: Análisis de resistencia al virus PVY por hibridación de ácidos nucleicos realizado sobre los 4 clones en estudio. Los tiempos t_1 , t_2 y t_3 posteriores a la inoculación corresponden a los de la tabla 2.

con la sonda sulfonada no detectó presencia de PVY en los clones ensayados. Solo dieron reacción positiva un extracto de planta sensible infectada con PVY y la preparación viral en sí. Esta última proveyó la fuente de los virus utilizados en la inoculación forzada. La fotografía correspondiente muestra la membrana de nitrocelulosa una vez finalizado el ensayo.

Resumiendo, el análisis de fitosanidad de la colección chilota que permitió la selección de los 4 cuatro clones que mostraron sanidad a los virus PVX, PVY y PVS simultaneamente. Estos 4 clones fueron inoculados con los tres virus individualmente y el resultado de la búsqueda de fuentes de resistencia se resume en la tabla 4.

TABLA 4

CLON	SENSIBILIDAD	RESISTENCIA
315-UA-1553	PVX	PVY y PVS
400-CON-921	PVX	PVY y PVS
407-CON-928	PVX y PVS	PVY
447-CON-993	PVX y PVS	PVY

C.6. PURIFICACION DEL RNA GENOMICO DE PVS (gRNA).

Se procesaron 500 ul de la resuspensión anterior a fin extraer el gRNA. Para cumplir este objetivo se adicionaron 500 ul de fenol saturado en caliente (70°C). Se mantuvo la mezcla durante 5 min. a esa temperatura y las fases fueron separadas por centrifugación. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo repitiéndose el tratamiento anterior. La fase acuosa fue mezclada con un volumen de CHCl₃/alcohol isoamílico (24:1) para extraer los restos de fenol y la fase acuosa fue precipitada por la adición de 3 volúmenes de etanol absoluto y mantenida a -70°C por 30 min. El RNA fue sedimentado por centrifugación y resuspendidos en 200 ul de agua estéril. El gRNA fue precipitado (dos veces) por la adición de 2 volúmenes de acetato de sodio 4,5 M (pH 5,2) y mantenido a -70°C por 3 Hrs. Luego de la sedimentación el gRNA fue colectado por centrifugación y resuspendido en 10 ul de agua estéril (con una concentración final de 0,5 grs/l).

C.5.c SINTESIS DEL DNA COMPLEMENTARIO (cDNA) AL gRNA

El gRNA obtenido en la etapa anterior fue utilizado como molde para la síntesis del cDNA. Se empleó el kit de síntesis de cDNA de Amersham y se siguieron las indicaciones del proveedor. Brevemente, para sintetizar la primera cadena se emplearon 2,5 ug de gRNA como molde. La mezcla de síntesis (20 ul) contenía inhibidor placentario de RNasa a fin de evitar la degradación del molde, una

mezcla de los desoxirribonucleótidos, ^{32}P -dCTP y oligo dT como partidor. La transcriptasa reversa utilizada (2 U) provenía del virus de la mieloblastosis de aves. Luego de incubar 40 min. a 42°C , una alícuota de 2 μl fue analizada por electroforesis en gel de agarosa alcalino. El gel fue posteriormente secado al vacío y autoradiografiado. El resultado confirma la eficiencia de la síntesis de la primera cadena del cDNA. Se procedió entonces a sintetizar la segunda hebra. La mezcla de reacción de la etapa previa fue diluida 5 veces y se le adicionó RNasa H (1 U) y DNA polimerasa de *E. coli* (2 U). La nueva mezcla fue incubada durante 1 hora a 60°C y 1 hora a 22°C . Posteriormente, se agregó DNA polimerasa de T_4 (1 U) incubándose por 30 min. a 37°C . El cDNA obtenido fue precipitado por adición de 3 volúmenes de etanol absoluto y mantenido a -70°C durante 2 horas. Luego de colectar el cDNA por centrifugación, el sedimento fue resuspendido en un volumen final de 20 μl (aprox. 50 ng/ μl). Una fracción de la suspensión (5 μl) fue analizada en un gel de agarosa 1%.

C.7. CLONAMIENTO MOLECULAR DE cDNA DEL VIRUS PVS.

Con el fin de amplificar el cDNA sintetizado y disponer de suficiente material para la construcción de sondas moleculares, el cDNA obtenido en la etapa anterior fue clonado usando como vector el plasmidio pUC-12. Experimentalmente, se procedió como sigue: 5 μg de pUC-12 fueron linearizados mediante digestión con la endonucleasa SmaI que genera extremos romos. El cDNA sintetizado anteriormente fue tratado con nucleasa S₁ a fin de asegurar que sus extremos no posean segmentos de hebra simple. Se preparó una mezcla de ligación conteniendo 1 μg del vector lineal, 2 μg cDNA, ATP, 1 mM, tampón ligasa 5X (proveído por BRL, Inc.) y 5 U de ligasa de T_4 , en un volumen final de 50 μl . Se incubó durante 16 hrs a 8°C . Esta mezcla de ligación fue utilizada para transformar células competentes de *E. coli* JM 107 según el procedimiento descrito por Chung y cols. (PNAS 86:2172-2175, 1989). Tras sembrar las bacterias transformadas en placas Luria-agar conteniendo ampicilina (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), IPTG 0,1 mM, X-gal 0,01%, se detectó la presencia de colonias recombinantes conteniendo plasmidios híbridos entre el pUC-12 y el cDNA de PVY.

C.8. PUESTA A PUNTO TECNICAS DE TRANSFORMACION DE PAPA

Al respecto, se utilizaron dos protocolos: uno de los cuáles se basa en la técnica de los discos foliares descrita por Herrera-Estrella y Simpson (1988) y el otro utiliza como fuente de explantes, segmentos nodales (Jordán, M., comunicación personal).

En ambos casos se trabajó con la variedad Desireé de amplio consumo en el país. El agente transformante utilizado correspondió a una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el plasmidio pG 2260 (p Esc 4) 160390 con genes de resistencia a rifampicina y kanamicina, gentilmente cedido por el Dr. Herrera-Estrella, CINVESTAV, México.

C.8.1. MICROPROPAGACION:

Los explantes se obtuvieron a partir de yemas del tubérculo, éstos fueron mantenidos previamente a temperatura ambiente y luz difusa para inducir la brotación. La desinfección superficial de las yemas se realizó de la siguiente manera: lavado con agua potable, luego enjuague con hipoclorito de sodio al 30% durante 5 a 10 minutos. Posteriormente se realizó un enjuague con etanol al 70% durante 1 minuto y finalmente se realizaron tres lavados con agua destilada estéril.

Las yemas obtenidas fueron micropropagadas en el siguiente medio de cultivo:

Murashige-Skoog + 2 mg/l pantotenato de Ca + 0.1 mg/l ácido giberélico

C.8.2. TECNICA DE LOS DISCOS FOLIARES

Se inocularon 3 ml de medio A (4.5 g KH_2PO_4 , 10.5 g K_2HPO_4 , 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g Citrato de Sodio x 2 H_2O , 0.2 g MgSO_4 x 7 H_2O , 0.2 g Glucosa por Lt ajustado a pH 5.9) con la cepa de *A. tumefaciens* y se incubó a 28°C durante la noche. Se agregaron 20 ml de medio K₃ (se describe en Anexo 4) conteniendo 0.2 M de sacarosa, sin antibióticos ni hormonas a una placa petri estéril. Luego se colocaron las hojas sobre el medio K₃, teniendo la precaución de poner el haz de la hoja en contacto con el medio. De estas hojas se cortaron discos, de aproximadamente 1 cm de diámetro con ayuda de un sacabocado estéril. Se adicionaron 5 ml de medio K₃ a una cápsula petri pequeña y se colocaron 5 discos foliares. Posteriormente, se agregaron 50 uL del cultivo de *A. tumefaciens* realizado el día anterior. Se sellaron las placas petri con parafilm y se incubaron en una cámara de cultivo a 25°C, con fotoperíodo de 16 hrs. luz, durante dos días. Transcurrido ese tiempo, se adicionó 200 ug/ml de claforan (cefotaxima, Hoechst). Finalmente, se sembraron los discos de hojas en el medio de regeneración (SIM) conteniendo 100 ug/ml de rifampicina y 50 ug/ml de kanamicina. El medio SIM se describe en Anexo 4.

RESUMEN DE ACTIVIDADES CUMPLIDAS

1. En primera instancia, la búsqueda de posibles fuentes de resistencia a los virus PVX, PVY y PVS implicó el análisis del estado fitosanitario de 532 clones pertenecientes al jardín chilote del banco de germoplasma de la Universidad Austral de Chile. El barrido fue parcialmente empleando plantas indicadoras y posteriormente, mediante la técnica de NCM-ELISA. Se constató que un 99,2 % de los clones está infectado con al menos uno de los tres virus analizados (PVX, PVY, PVS) en tanto que un 0.8 % presentó sanidad simultánea a estos virus. Se trabajó a continuación, siempre a nivel de planta, forzando la infección a través de medios mecánicos, encontrando al menos dos clones con resistencia múltiple a los virus PVS y PVY. Actividad cumplida.

2. Los clones seleccionados en 1., aparentemente resistentes a PVX, fueron analizados mediante infección *in vitro*. Se seleccionaron plantas micropropagadas de variedades susceptibles y resistentes. De cada plántula se subcultivaron el ápice y segmentos nodales y las hojas se utilizaron para la obtención de protoplastos, los que fueron infectados. La replicación viral fue seguida por la aparición de la proteína viral lo que permitió evaluar el grado de resistencia o sensibilidad a nivel celular. Actividad cumplida.

3. Esta actividad fue descontinuada por acuerdo con el Coordinador.

4. Purificación y clonaje molecular del genoma del virus PVS. Los viriones de PVS fueron purificados a partir de hojas de *Chenopodium quinoa* infectadas con el virus. Luego se procedió a la purificación del RNA genómico de PVS (gRNA), el que se utilizó como molde para la síntesis del cDNA. El cDNA doble hebra sintetizado fue clonado usando como vector el plasmidio pUC-12. Actividad cumplida.

5 y 6. Las actividades comprometidas N° 5 y 6 se detuvieron por la falta de reactivos.

7. Puesta a punto de técnicas de transformación. Para realizar este trabajo se utilizaron dos protocolos: uno, la técnica de discos foliares descrita por Herrera-Estrella y Simpson (1988) y dos, el protocolo que utiliza como fuente de explantes, segmentos nodales (Jordán, M.). En ambos casos se trabajó con la variedad Desireé previamente cultivada *in vitro*. La infección se realizó con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el plásmido pG 2260 (p Esc 4) 160390 con genes de resistencia a rifampicina y kanamicina; puesto a disposición por el Dr. Herrera-Estrella, el CINVESTAV, México. Los explantes se obtuvieron a partir de yemas de tubérculos de papa. A partir de los discos de hojas no se obtuvo regeneración alguna. En el caso de los segmentos nodales, con ambos protocolos se obtuvo regeneración de vástagos en un 70%. Se obtuvo material que creció, formó brotes y raíces en presencia de rifampicina (100 ug/ml) y kanamicina (50 ug/ml).

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- Sáez J., Theoduloz C., Hubert E., Vizcarra G., Parra C., Contreras A., Meza L. Análisis cuantitativo de resistencia a virosis en cultivares de papa. Séptima reunión nacional de la papa. (ACHIPA). Valdivia, Chile, 1990.
- Sáez J., Theoduloz C., Contreras A., Poblete F., González E., Hubert E. Búsqueda de resistencia genotípica a los virus PVX, PVY y PVS en *Solanum tuberosum* L. 33 a. Reunión anual de la Sociedad de Biología de Chile y Sociedades afiliadas. Punta de Tralca, Chile, 1990.
- Theoduloz C., Sáez-Vásquez J., Poblete F., Hubert E., Contreras A., Meza-Basso L. Técnicas de diagnóstico y búsqueda de resistencia a enfermedades virales en papa. 42º Congreso de la Sociedad Agronómica de Chile. Chillán, Chile, 1991.
- Theoduloz C., Sáez-Vásquez J., Poblete F., Hubert E., Contreras A., Hubert E. Germoplasma chileno de papa con resistencia a los virus PVY y PVS. 35 a. Reunión anual de la Sociedad de Biología de Chile y Sociedades afiliadas. Puyehue, Chile, 1992.

PUBLICACIONES

- Theoduloz C., Sáez-Vásquez J., Poblete F., Contreras A., Hubert E., Meza-Basso L. The incidence of potato viruses X, Y and S in the Chilota potato collection. (en prensa). American Potato Journal. 1992.
- Sáez-Vásquez J., Theoduloz C., Poblete F., Contreras A., Meza-Basso L., Hubert E. Chilean potato germplasm bearing resistance to potato viruses Y and S. (enviado). American Potato Journal. 1992.
- Contreras A., Alberdi M., Andrade N., Bohm L., Ciampi L., Fuentealba J., Meza L., Romero M., Seemann P. Recolección, mantención, evaluación y uso potencial de la papa nativa de Chile y parientes relacionados. Simiente. 62 (2). 61-72. 1992.

TESIS DE GRADO

- Poblete F. Búsqueda de fuentes de resistencia a los virus PVX, PVY y PVS en el jardín chilote del banco de germoplasma chileno de papa. Tesis de grado para optar al grado de Licenciado en Bioquímica. Universidad Austral de Chile. 69 pp. 1992.

ANEXO 1

Medios de cultivo:

Las yemas obtenidas fueron micropropagadas en los siguientes medios de cultivo:

- LRa : MS + 1 mg/l BAP + 0,01 mg/l ANA + 0,1 mg/l AG₃
- LRa* : MS + 1 mg/l BAP + 0,01 mg/l ANA + 0,5 mg/l AG₃
- P₁ : MS + 0,4 mg/l BAP
- P₂ : MS + 1 mg/l 2iP
- P₃ : MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l AIA + 10 mg/l GA₃
- P₄ : MS + 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l GA₃ + 2 mg/l Pantotenato de Ca

Abreviaturas: BAP, 6-benzilaminopurina; ANA, ácido naftaleno acético; AG₃, ácido giberélico; 2iP, N-isopentenilaminopurina; AIA, ácido indol acético; 2,4-D, Acido 2,4-diclorofenoxiacético; MS, Medio basal de Murashige-Skoog (1962)

A) Inorgánicos	mg/L	B) Orgánicos	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650	Mio-inositol	100
KNO ₃	1900	Glicina	2
CaCl ₂ x2H ₂ O	440	Acido nicotínico	0,5
MgSO ₄ x7H ₂ O	370	Piridoxina X HCl	0,5
KH ₂ PO ₄	170	Tiamina X HCl	0,1
Na ₂ xEDTA	37,3	Sacarosa	30.000
FeSO ₄ x7H ₂ O	27,8	Agar	7.000
H ₃ BO ₃	6,2		
MnSO ₄ x4H ₂ O	22,3		
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6		
KI	0,83		
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,25		
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,025		
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,025		

También fué utilizado el medio MP (Mason et al, 1987).

A) Inorgánicos	mg/L	B) Orgánicos	mg/L
NH ₄ NO ₃	536	Sacarosa	10.000
KNO ₃	2690	Agar	7.000
Ca(NC ₃) ₂	300		
MgSO ₄ x7H ₂ O	419		
KH ₂ PO ₄	274		
Na ₂ xEDTA	37		
FeSO ₄ x2H ₂ O	28		
KCL	350		
H ₃ BO ₃	6,3		
MnSO ₄ xH ₂ O	22,3		
ZnSO ₄ x7H ₂ O	8,6		
KI	0,83		
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,25		
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,025		
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,025		

ANEXO 1..... Continuación

El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5,8 con NaOH 0,1 M y esterilizados en autoclave a 1 Atm. y 121°C durante 20 minutos. Los sub-cultivos se realizaron cada 7 a 8 días. La temperatura de la cámara de crecimiento se mantuvo entre 26-28°C y el fotoperíodo en 16 horas de luz y 8 de oscuridad. La mejor respuesta en cuanto a número de brotes, tamaño y número de hojas se obtuvo utilizando el medio LRa*.

ANEXO 2:

Obtención de protoplastos

Medio de digestión

COMPUESTOS: expresados en mg por litro

A) Inorgánicos

KNO ₃	2500
NaH ₂ PO ₄	150
CaCl ₂ x2H ₂ O	750
MgSO ₄ x7H ₂ O	250
FeSO ₄ x2H ₂ O	28
Na ₂ EDTAx2H ₂ O	37

B) Orgánicos

Manitol	73.000
ANA	1
2,4-D	0,2
BAP	1

Las enzimas fueron agregadas al momento de usar y posteriormente el medio se esterilizó por filtración.

Macerczima	0,3 %
Celulasa	0,3 %

MEDIO A

COMPUESTOS: expresados en mg por litro

A) Inorgánicos

KNO ₃	2500
NaH ₂ PO ₄	150
CaCl ₂ x2H ₂ O	750
MgSO ₄ x7H ₂ O	250
FeSO ₄ x2H ₂ O	28
Na ₂ EDTAx2H ₂ O	37
H ₃ BO ₃	3
MnSO ₄ x1H ₂ O	10
ZnSO ₄ x7H ₂ O	2
KI	0,75
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,025

B) Orgánicos

Glucosa	1.500
Inositol	5.000
Manitol	50.000
ANA	1
2,4-D	0,2
BAP	1

ANEXO Nº3

Resultados in extenso del análisis fitosanitario del Jardín Chilote del Banco de Germoplasma Chileno de Papa.

			VIRUS						VIRUS		
Identificación	PVX	PVY	PVS	Identificación	PVX	PVY	PVS				
1 UA 1016	-	+	+	51 UA 1170-A	+	+	+				
2 UA 1116	+	+	+	52 UA 1170-B	+	-	+				
3 UA 1692	-	+	+	53 UA 1028	-	+	+				
4 UA 1005	-	-	+	54 UA 1534	-	+	+				
5 UA 1009	+	+	+	55 UA 1024	-	+	+				
6 UA 1545	+	-	-	56 UA 1121	-	+	-				
7 UA 1587	+	+	-	57 UA 1503	-	+	+				
8 UA 1193	+	+	-	58 UA 1514	-	-	+				
9 UA 1358				59 UA 1593-A	-	+	-				
10 UA 1519	+	+	+	60 UA 1567-A	-	+	+				
11 UA 1690	+	+	-	61 UA 1069-A	-	+	-				
12 UA 1264	-	+	+	62 UA 1143	+	+	+				
13 UA 1236	+	-	-	63 UA 1186	+	+	+				
14 UA 1550-A	-	+	+	64 UA 1515	-	+	+				
15 UA 1284	+		+	65 UA 1078-A	-	+	+				
16 UA 1364	-	+	+	66 UA 1075	-	+	+				
17 UA 1252	-	+	+	67 UA 1053	-	+	+				
18 UA 1144	-	-	+	68 UA 1120	-	+	+				
19 UA 1171	-	-	+	69 UA 1258	+	-	-				
20 UA 1113	-	-	+	70 UA 1557	-	-	+				
21 UA 1594-A	-	+	+	71 UA 1381	+	+	+				
22 UA 1225	-	+	-	72 UA 1296	-	+	+				
23 UA 1229	+	-	+	73 UA 1190	-	+	+				
24 UA 1600	+	-	+	74 UA 1142	+	+	+				
25 UA 1045	-	+	+	75 UA 1290	-	-	+				
26 UA 1141	-	+	+	76 UA 1164	-	+	-				
27 UA 1547	+	+	+	77 UA 1398	-	-	-				
28 UA 1582	-	-	+	78 UA 1329	-	-	+				
29 UA 1601-A	+	+	+	79 UA 1186-B	-	+	+				
30 UA 1335	+	-	+	80 UA 1210	-	+	-				
31 UA 1399	-	-	+	81 UA 1228	+	+	+				
32 UA 1581	-	-	+	82 UA 1233-A	-	+	+				
33 UA 1560	-	-	+	83 UA 1233-B	-	-	+				
34 UA 1592	-	-	+	84 UA 1395	+	-	+				
35 UA 1049	-	-	+	85 UA 1400	+	-	+				
36 UA 1551-A	-	+	-	86 UA 1606							
37 UA 1565	-	+	+	87 UA 1270	-	-	+				
38 UA 1135	-	-	+	88 UA 1198	+	+	+				
39 UA 1138	-	+	+	89 UA 1098	+	-	-				
40 UA 1263	-	+	+	90 UA 1103	+	+	+				
41 UA 1294	+	-	+	91 UA 1101	+	-	-				
42 UA 1392	+	+	+	92 UA 1306	-	+	+				
43 UA 1146	-	+	-	93 UA 1221	+	+	+				
44 UA 1224	-	+	-	94 UA 1224-A	-	+	+				
45 UA 1375-A	-	+	+	95 UA 1298	-	+	+				
46 UA 1388	-	+	+	96 UA 1595-A	+	+	+				
47 UA 1054	-	+	+	97 UA 1065-A	-	+	+				
48 UA 1153	-	+	+	98 UA 1359	+	-	-				
49 UA 1021	-	-	+	99 UA 1357	-	+	+				
50 UA 1373-A	-	+	+	100 UA 1019	-	+	+				

Identificación	VIRUS			Identificación	VIRUS		
	PVX	PVY	PVS		PVX	PVY	PVS
101 UA 1022	-	+	+	151 UA 1155	+	+	+
102 UA 1002	+	+	+	152 UA 1063	+	+	+
103 UA 1206	-	+	-	153 UA 1311	+	+	-
104 UA 1620	-	+	+	154 UA 1166	+	+	+
105 UA 1148	+	+	+	155 UA 1030	-	+	+
106 UA 1200	-	+	+	156 UA 1351	+	+	+
107 UA 1023	-	+	+	157 UA 1050	+	-	-
108 UA 1204	+	+	-	158 UA 1059	-	-	+
109 UA 1018	-	+	-	159 UA 1042	-	+	-
110 UA 1037	+	+	-	160 UA 1295	-	+	-
111 UA 1291	-	+	+	161 UA 1071	-	+	+
112 UA 1356	-	+	-	162 UA 1340	-	+	-
113 UA 1349	-	+	+	163 UA 1156	-	+	+
114 UA 1003	+	+	+	164 UA 1332	-	+	+
115 UA 1020	-	-	+	165 UA 1248	+	+	+
116 UA 1001	-	+	+	166 UA 1345	-	+	+
117 UA 1007	-	-	+	167 UA 1330	-	-	+
118 UA 1279	-	+	+	168 UA 1628	-	-	+
119 UA 1238	+	+	+	169 UA 1147	+	-	-
120 UA 1006	-	+	+	170 UA 1366	-	-	+
121 UA 1013	-	+	+	171 UA 1161	+	-	-
122 UA 1034	-	+	+	172 UA 1637	-	+	+
123 UA 1371	-	+	+	173 UA 1350	-	+	-
124 UA 1014	-	+	+	174 UA 1163	-	+	-
125 UA 1025	-	+	+	175 UA 1328	-	+	+
126 UA 1027	-	+	+	176 UA 1084	+	+	+
127 UA 1127	+	-	-	177 UA 1079	-	+	+
128 UA 1068	-	-	+	178 UA 1255	+	+	+
129 UA 1152	+	+	-	179 UA 1067	-	-	+
130 UA 1029	+	+	+	180 UA 1308	+	-	+
131 UA 1313	+	+	+	181 UA 1191	-	+	-
132 UA 1031	-	+	-	182 UA 1397	-	+	-
133 UA 1035	-	+	+	183 UA 1072	+	-	+
134 UA 1627	+	+	+	184 UA 1354	-	-	+
135 UA 1352	+	+	-	185 UA 1275	-	+	+
136 UA 1499	-	+	-	186 UA 1384	+	-	+
137 UA 1691				187 UA 1500	+	+	+
138 UA 1517	-	+	+	188 UA 1520	-	+	+
139 UA 1039	-	+	+	189 UA 1080	-	+	+
140 UA 1629	-	-	+	190 UA 1535	-	+	+
141 UA 1355	-	+	+	191 UA 1341	-	+	+
142 UA 1513	+	+	+	192 UA 1076	-	-	+
143 UA 1368	+	+	+	193 UA 1633	+	+	+
144 UA 1032	+	+	+	194 UA 1377	+	+	+
145 UA 1374	-	+	+	195 UA 1082	-	+	+
146 UA 1061-A	+	+	+	196 UA 1149	+	+	-
147 UA 1061-B	-	+	+	197 UA 1266	+	+	-
148 UA 1216	-	+	-	198 UA 1336	+	+	-
149 UA 1338	-	+	+	199 UA 1393	+	+	-
150 UA 1373-B	-	+	+	200 UA 1243	+	+	+

Identificación	VIRUS			Identificación	VIRUS		
	PVX	PVY	PVS		PVX	PVY	PVS
201 UA 1391	+	+	+	251 UA 1543	-	+	-
202 UA 1268	+	+	+	252 UA 1609	+	+	+
203 UA 1509	+	+	+	253 UA 1540	+	+	+
204 UA 1167	+	-	+	254 UA 1620	+	+	+
205 UA 1110	-	+	-	255 UA 1605	-	+	+
206 UA 1215	+	+	+	256 UA 1599	+	+	-
207 UA 1056	+	+	+	257 UA 1566	+	+	-
208 UA 1283	+	+	+	258 UA 1537	+	-	-
209 UA 1175	+	+	+	259 UA 1572	-	-	+
210 UA 1099-A	-	+	+	260 UA 1550	-	+	+
211 UA 1092	+	-	-	261 UA 1584	+	+	+
212 UA 1093	-	+	+	262 UA 1598	-	+	-
213 UA 1097	+	+	+	263 UA 1558-A	+	+	+
214 UA 1281	+	+	+	264 UA 1558-B	-	+	+
215 UA 1105	+	+	+	265 UA 1655	-	+	-
216 UA 1094	+	+	+	266 UA 1639	+	+	+
218 UA 1157	+	+	-	267 UA 1430-B	-	+	-
219 UA 1091	+	+	+	268 UA 1625	+	+	+
220 UA 1099-B	-	+	+	269 UA 1664	-	+	-
221 UA 1340	+	+	+	270 UA 1675	-	+	-
222 UA 1201-A	+	+	-	271 UA 1672	+	+	+
223 UA 1498	+	+	+	272 UA 1632	-	+	-
224 UA 1201-B	+	+	+	273 UA 1674	-	+	+
225 UA 1680	+	+	+	274 UA 1661	-	+	+
226 UA 1283	-	+	+	275 UA 1370	-	+	+
227 UA 1168	-	+	+	276 UA 1390	+	+	+
228 UA 1064	-	+	+	277 UA 1109	-	+	+
229 UA 1244	+	+	+	278 UA 1203	+	+	+
230 UA 1375	+	+	-	279 UA 1432	+	+	+
231 UA S/N	+	+	+	280 UA 1104	+	+	-
232 UA 1594	+	+	+	281 UA 1512	-	-	+
233 UA 1610	-	+	-	282 UA 1302	+	+	-
234 UA 1622	+	+	+	283 UA 1352	-	+	+
235 UA 1601-B	-	+	-	284 UA 1618	-	+	-
236 UA 1595-B	+	+	-	285 UA 1633	+	+	-
237 UA 1545-B	-	+	-	286 UA 1661	+	+	+
238 UA 1580	-	+	+	287 UA 1666	+	+	-
239 UA 1576	+	+	+	288 UA 1593-B	+	+	+
240 UA 1583	+	+	+	289 UA 1644	+	+	+
241 UA 1553	-	+	+	290 UA 1656	+	+	-
242 UA 1611	+	+	+	291 UA 1652	-	+	+
243 UA 1617	+	+	+	292 UA 1642	+	+	-
244 UA 1591	-	+	+	293 UA 1209	+	+	+
245 UA 1563	+	-	+	294 UA 1586	+	+	+
246 UA 1590	-	+	+	295 UA 1668	-	+	+
247 UA 1557	-	+	+	296 UA 1634	+	+	+
248 UA 1589	-	+	+	297 UA 1370	-	+	+
249 UA 1585	-	+	-	298 UA 1362	+	+	+
250 UA 1613	-	+	-	299 UA 1077	+	+	+
				300 UA 1659	+	+	-

Identificación	VIRUS			Identificación	VIRUS		
	PVX	PVY	PVS		PVX	PVY	PVS
301 UA 1549	-	+	+	351 CON 828	+	+	+
302 UA 1641	-	+	+	352 CON 829	-	+	+
303 UA 1482	-	+	-	353 CON 830	-	+	-
304 UA 1645-A	-	+	+	354 CON 831	-	+	+
305 UA 1410-B	-	+	-	355 CON 832	+	+	+
306 UA 1673	+	+	-	360 CON 881	-	+	+
308 UA 1551	-	+	-	361 CON 882	-	+	+
309 UA 1642	-	+	-	362 CON 883	-	+	+
310 UA 1645-B	-	+	+	363 CON 884	+	+	+
312 UA 1663	+	+	-	364 CON 885	+	-	-
313 UA 1650	-	+	-	365 CON 886	+	+	-
314 UA 1545-C	+	+	+	366 CON 887	-	-	+
315 UA 1553	-	-	-	367 CON 888	-	+	+
316 UA 1548	+	+	+	368 CON 889	+	+	+
317 UA 1559	-	+	+	369 CON 890	+	-	+
318 UA 1639	+	+	+	370 CON 891	+	+	+
319 UA 1671	+	+	+	371 CON 892	+	+	+
320 UA 1594-B	+	-	+	372 CON 893	+	+	+
321 UA 1653	+	+	+	373 CON 894	-	-	+
322 UA 1625	-	+	+	374 CON 895	+	+	-
324 UA 1635	+	+	+	375 CON 896	+	+	+
325 UA 1567-B	+	+	+	376 CON 897	+	+	-
326 UA 1601-C	+	-	-	377 CON 898	-	+	-
327 UA 1678-B	+	+	+	378 CON 899	-	-	+
328 UA 1662-A	-	+	-	379 CON 900	-	-	+
329 UA 1591	-	-	+	380 CON 901	+	-	+
330 UA 1619	+	+	+	381 CON 902	+	+	+
331 CON 755	+	+	+	382 CON 903	-	-	+
332 UA 1662-B	+	-	-	383 CON 904	-	+	+
333 CON 756	+	+	-	384 CON 905	+	+	+
334 CON 757	+	-	+	385 CON 906			
335 CON 783	-	+	+	386 CON 907	+	+	+
336 CON 784	+	+	+	387 CON 908	-	+	+
337 CON 785	-	-	+	388 CON 909	-	+	+
338 CON 786	-	+	+	389 CON 910	+	+	+
339 CON 788	+	+	+	390 CON 911	+	+	+
340 CON 789	+	+	+	391 CON 912	+	+	+
341 CON 790	+	+	+	392 CON 913	+	+	+
342 CON 791	-	-	+	393 CON 914	-	+	+
343 CON 792	-	-	+	394 CON 915			
344 CON 821	+	+	+	395 CON 916	+	+	+
345 CON 822	+	-	+	396 CON 917			
346 CON 823	+	+	+	397 CON 918	-	+	+
347 CON 824	-	-	+	398 CON 919	-	+	+
348 CON 825	+	+	+	399 CON 920	-	+	+
349 CON 826	+	+	+	400 CON 921	-	-	-
350 CON 827	+	-	+				

Identificación	VIRUS			Identificación	VIRUS		
	PVX	PVY	PVS		PVX	PVY	PVS
401 CON 922				451 CON 997	+	+	+
402 CON 923	+	-	+	452 CON 998	-	+	+
403 CON 924	+	+	+	453 CON 999	+	+	+
404 CON 925	-	-	+	454 CON 1000	+	+	+
405 CON 926				455 CON 1001	+	+	-
406 CON 927				456 CON 1002	+	+	-
407 CON 928	-	-	-	457 CON 1003	+	+	+
408 CON 929	+	+	-	458 CON 1004	-	+	+
409 CON 930	+	+	+	459 CON 1005	-	+	+
410 CON 931	+	+	-	460 CON 1006	-	+	+
411 CON 932	-	+	+	461 CON 1007	-	+	-
412 CON 958	+	+	+	462 CON 1008	-	+	-
413 CON 959	+	+	+	463 CON 1009	+	+	+
414 CON 960	+	+	+	464 CON 1010	+	+	+
415 CON 961	-	+	+	465 CON 1011	-	+	+
416 CON 962	+	+	+	466 CON 1012	+	+	-
417 CON 963	+	+	+	467 CON 1013	+	+	+
418 CON 964	+	+	+	468 CON 1014	+	+	-
419 CON 965	+	+	-	469 CON 1015	-	+	+
420 CON 966	+	+	+	470 CON 1016	+	+	+
421 CON 967	+	+	-	471 CON 1017	+	+	+
422 CON 968	-	+	-	472 CON 1018	+	+	+
423 CON 969	-	+	-	473 CON 1019	+	+	+
424 CON 970				474 CON 1020	+	+	-
425 CON 971	+	+	+	475 CON 1021	-	+	+
426 CON 972	+	+	-	476 CON 1022	+	+	+
427 CON 973	-	+	-	477 CON 1023	-	+	-
428 CON 974	-	-	-	478 CON 1024	+	+	+
429 CON 975	+	+	-	479 CON 1025	+	+	+
430 CON 976	-	+	+	480 CON 1026	-	+	+
431 CON 977	-	+	+	481 CON 1027	+	+	+
432 CON 978	-	+	+	482 CON 1028	-	+	+
433 CON 979	+	+	-	483 CON 1029	-	+	+
434 CON 980				484 CON 1030	+	-	+
435 CON 981	+	+	-	485 CON 1031	+	+	+
436 CON 982	+	+	+	486 CON 1032	+	+	-
437 CON 983	+	+	+	487 CON 1033	+	+	-
438 CON 984	+	+	+	488 CON 1034	-	+	+
439 CON 985	+	+	+	489 CON 1035	+	+	-
440 CON 986	+	+	-	490 CON 1036	+	+	+
441 CON 987	+	+	+	491 CON 1037	-	+	+
442 CON 988	-	+	-	492 CON 1038	+	+	-
443 CON 989	-	-	+	493 CON 1039	+	+	-
444 CON 990	-	-	+	494 CON 1040	+	+	-
445 CON 991	+	+	+	495 CON 1041	+	+	+
446 CON 992	+	+	-	496 CON 1042	+	+	+
447 CON 993	-	-	-	497 CON 1043	+	+	+
448 CON 994	-	+	+	498 CON 1044			
449 CON 995	-	+	+	499 CON 1045	+	+	+
450 CON 996	-	+	+	500 CON 1046	+	+	+

Identificación	VIRUS			Identificación	VIRUS		
	PVX	PVY	PVS		PVX	PVY	PVS
501 CON 1047	+	+	-	526 CON 1094	+	+	-
502 CON 1048	+	+	+	527 CON 1095	+	+	+
503 CON 1049	-	+	+	528 CON 1096	+	+	+
504 CON 1050	+	+	+	529 CON 1097	-	+	+
505 CON 1051	+	+	+	530 CON 1098	+	+	+
506 CON 1052	+	+	+	531 CON 1099	+	+	+
507 CON 1053	-	-	+	532 CON 1100	+	+	+
508 CON 1076	-	+	-	533 CON 1101	+	+	-
509 CON 1077	-	+	+	534 CON 1102	+	+	+
510 CON 1078	-	+	-	535 CON 1103	+	+	-
511 CON 1079	+	+	+	536 CON 1104	+	+	-
512 CON 1080	+	+	-	537 CON 1105	-	+	+
513 CON 1081	-	+	-	538 CON 1106	+	+	-
514 CON 1082	-	+	+	539 CON 1107	+	+	+
515 CON 1083	+	+	+	540 CON 1108	+	+	-
516 CON 1084	+	+	+	541 CON 1109	+	+	-
517 CON 1085	+	+	-	542 CON 1110	+	+	+
518 CON 1086	+	+	+	543 CON 1111	+	+	+
519 CON 1087	+	+	+	544 CON 1112	+	+	+
520 CON 1088	+	+	-	545 CON 1113	+	+	+
521 CON 1089	+	+	-	546 CON 1114	+	+	+
522 CON 1090	+	+	+	547 CON 1115	+	+	+
523 CON 1091	+	+	+	548 CON 1123	+	+	+
524 CON 1092	+	+	-	549 CON S/N	-	+	+
525 CON 1093	+	+	+	550 CON S/N	-	+	-

ANEXO 4

Medio K3

Medio de regeneración: medio SIM

Medio K3

Compuestos: expresados en mg por litro, pH 5,6

A) Inorgánicos

NH ₄ NO ₃	250
KNO ₃	2500
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	900
MgSO ₄ x 2 H ₂ O	250
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	150
(NH ₄) ₂ SO ₄	134
CaHPO ₄ x H ₂ O	50
H ₃ BO ₃	3
MnSO ₄ x H ₂ O	10
ZnSO ₄ x 4 H ₂ O	2
KI	0,75
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,25
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA	37,2
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27,8

B) Orgánicos

Mio-Inositol	100
Sacarosa	137000
Xilosa	250
Acido nicotínico	1
Piridoxina	1
Tiamina	10
Acido naftalen acético	0,1
Cinetina	0,2

Medio de regeneración

Compuestos: expresados en mg por litro, pH 5,7

Sales de Murashige-Skoog + Glicina	2,0
Acido nicotínico	0,5
Piridoxina	0,5
Mio-Inositol	100
Tiamina	0,4
Sacarosa	1,0 %
Agar	0,8 %

DETALLE DE LOS INSUMOS APORTADOS POR EL PROGRAMA

PERIODO 1: A LA FIRMA DEL CONTRATO

MONTO APROBADO : US \$ 9,400

1. ORDEN DE COMPRA : N°186/89 FECHA 19/06/89, AGITADOR ORBITAL
LAB-LINE INSTRUMENTS INC. VALOR US \$ 3,825
RECEPCION INSTRUMENTO FECHA: 25/09/89
APLICACION: CULTIVO DE BACTERIAS Y SUSPENSIONES CELULARES VEGETALES
2. ORDEN DE COMPRA : N° 187/89 FECHA : 19/06/89, POSICIONADOR DE
CUBETAS Y CONTROL DE TEMPERATURA DE UN ESPECTROFOTOMETRO
SHIMADZU 160 A
SHIMADZU CORPORATION VALOR US \$ 3,992
RECEPCION INSTRUMENTO FECHA: 07/09/89
APLICACION: REGISTRO DE DENSIDAD OPTICA CON UN SISTEMA MULTIPLE
DE CUBETAS Y CONTROL DE TEMPERATURA
3. ORDEN DE COMPRA LOCAL : N° 312/89 FECHA 08/89, CAMARA FOTOGRAFICA
NIKON FM-2 CON LENTE MICRO NIKKON 55 MM.
REIFSCHNEIDER S.A.C.I. VALOR: \$ 262.121 (US \$ 989)
RECEPCION INSTRUMENTO FECHA 26/07/89
APLICACION: IMPLEMENTACION DE UN LABORATORIO FOTOGRAFICO
4. GASTOS MISCELANEOS US \$ 500 (*)

PERIODO 2: SEPTIEMBRE 8 - NOVIEMBRE 30, 1989

MONTO APROBADO : US \$ 4,400

MONTO RECIBIDO: US \$ 4,000 (GASTOS MISCELANEOS) (*)

APLICACION: Esta suma fue recibida para financiar gastos miscelaneos que incluyen: viaje a Argentina del Dr. Enrique Gonzalez al laboratorio del coordinador del proyecto, Dr. Esteban Hopp, viáticos, viajes nacionales, reactivos, comunicaciones, servicios de microscopía electrónica, etc.

PERIODO 3: DICIEMBRE 10, 1989 - MARZO 30, 1990

MONTO RECIBIDO: US \$ 6,306 (GASTOS MISCELANEOS) ()**

APLICACION: Esta suma fue recibida para financiar gastos misceláneos que incluyen: viaje a Perú de la Dra. Elizabeth Hubert al laboratorio de Virología el Centro Internacional de la Papa viáticos, viajes nacionales, reactivos, comunicaciones, servicios de microscopía electrónica, gastos de desaduanamiento.

Rendición Insumos Aportados..... Continuación

PERIODO 4: 1990-1991
MONTO APROBADO : US \$ 5,000

- 1. ORDEN DE COMPRA : N° 50/92 FECHA : MARZO, 1992, REACTIVOS Y MATERIAL FUNGIBLE
 COLE PALMER INTERNACIONAL CO. VALOR US \$ 2,320
 RECEPCION MATERIAL FECHA: SEPTIEMBRE, 1992

- 2. ORDEN DE COMPRA : N° 51/92 FECHA : MARZO, 1992, MATERIAL FUNGIBLE Y BIBLIOGRAFICO VALOR US \$ 2,292.20
 SIGMA CHEMICAL CO.
 RECEPCION MATERIAL FECHA: SEPTIEMBRE, 1992

(*) Gastos misceláneos rendidos conjuntamente en Noviembre 1989
() Rendición adjunta al Informe final**