



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

19328

PROGRAMA REGIONAL DE BIC'TECNOLOGIA PARA
AMERICA LATINA Y EL CARIBE
PNUD/UNESCO/ONUDI
RLA/83/003

Contrato No. 88/63

Proyecto: Resistance to virosis in potato development
of potato plants bearing resistance to potato virus
PVX, PVV, PVS and PRLV by combined molecular and
in vitro plant culture techniques

Primer Año de Actividades

País: Ecuador

Segundo Informe Técnico (Final)

RESISTENCIA A VIROSIS EN PAPA, DESARROLLO DE PLANTAS DE PAPA
RESISTENTES A VIRUS PVX, PVY, Y PLRV POR TECNICAS MOLECULARES
COMBINADAS CON EL CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS.

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL
DEL ECUADOR

INFORME DE PRIMER AÑO

La Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador, desarrolla una parte del proyecto de biotecnología denominado "RESISTENCIA A VIROSIS EN PAPA, DESARROLLO DE PLANTAS DE PAPA RESISTENTES A VIRUS PVX, PVY Y PLRV, POR TECNICAS MOLECULARES COMBINADAS CON EL CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS"; en el que participan Argentina, Chile, Cuba, Mexico, y Uruguay.

En lo pertinente durante el primer año de ejecución del proyecto, le correspondió a Ecuador según el Plan de Operaciones, igual que a Chile, realizar la búsqueda y selección de cultivares con alta frecuencia de regeneración, a partir de callo y cultivo de suspensiones celulares.

Para este fin fueron asignados U.S.\$ 15.000,00 de los fondos aportados por ONUDI para cubrir rubros de materiales, equipo, capacitación; debiendo aportar el CONACYT un monto de contrapartida para cubrir los costos de personal.

La ejecución de los trabajos, se inició con la suscripción del convenio entre UNODI y la Universidad Central, en 1989, habiendo se transferido posteriormente la cantidad de U.S.\$ 9.000,00 como aporte inicial.

DESCRIPCION DEL PROCESO

Fueron seleccionadas cinco variedades de papa comercial en Ecuador, las mismas que integran la Colección Internacional del CIP y son producto de selección realizada por el INIAP en el país. (cuadro 1).

Estas variedades cubren el mayor porcentaje de la demanda interna para el consumo humano 505.000 TM/año del Ecuador (46 Kg/per capita); y registran entre sus problemas, ataques de enfermedades como Phytophthora, Alternaria, etc. además de virosis; siendo esta última un factor de alta incidencia dado que el campesinado cultiva también otros cultivares poco seleccionados altamente contaminados, muy susceptibles a enfermedades, por lo que el material sanitariamente idóneo entregado por el INIAP y los centros de multiplicación de semilla certificada, rápidamente es recontaminado.

Las variedades en estudio fueron : Maria, Chola, Santa Catalina, Gabriela y Esperanza, procedentes en unos casos de *S. tuberosum*, en otros de andigenum o híbridos de variedades de ambas especies, según el cuadro 1; con 48 cromosomas en su genoma, su ciclo varia entre 150 y 180 días con rendimientos que van entre las 40 y las 50 TM/Ha.

Los explantes fueron tratados con alcohol 70 % durante 1 minuto, para luego sumergir en hipoclorito de sodio, dos tiempos y tres concentraciones, (30, 50 % x 10, 15 y 20 minutos); se dieron lavados en agua DE luego del tratamiento con alcohol y cuatro lavados en agua destilada estéril para eliminar el hipoclorito

Los tratamientos consistieron en pruebas iniciales de contaminación, siembra de explantes procedentes de láminas foliares y medula de tubérculo. Los explantes fueron cultivados en tubos de ensayo 2x20 cm en unos casos y frascos de 8x15 cm en otros.

Así también una repetición fue cultivada en la obscuridad y otra con iluminación (16/8) usando lámparas fluorescentes de 40 W. (2500 lux). La temperatura del cuarto de cultivo tuvo una media de 25 °C debido a un mal sistema de ventilación. Los tubos contenían 10 ml. de medio y los frascos 25 ml.

Los medios utilizados fueron cinco formulaciones (cuadro 2), a partir del medio básico Murashige & Skoog (1962) suplementados con 2-4,D y BAP en concentraciones variables. se utilizó el medio

RESULTADOS

Del cuadro 3 se desprende que en la primera etapa de evaluación de medios versus variedades, para todas las variedades se obtuvo callo entre los días 8 y 20 con una mayor frecuencia entre los 9 y 10 días ; correspondiendo la mayor frecuencia, a la variedad Maria que hasta los 10 días produjo callo en el 60% de los explantes (fig. 1)

Como al mismo tiempo se evaluaron cinco formulaciones de medio, en un arreglo factorial 5 x 5, se encontró que de entre ellos, el medio "1" fue eficiente para cuatro variedades, excepto chola, destacándose la combinación medio 1 vs. var. Maria. (cuadro 3)

Los niveles de contaminación fungosa aunque igual que la bacteriana dependen mayormente de los cuidados en el manipuleo del material y los tratamientos de aséptica, estuvieron estrechamente relacionados con la eficiencia del medio para generar callo, al punto que los explantes cultivados en medio 1 fueron los mas afectados.

La segunda etapa en la que se trató exclusivamente la variedad Maria cultivada en el medio 1 mostró los resultados según el cuadro 4 y fig. 2, en donde se puede observar incremento en la elongación de los brotes, número de nudos y hojas, creciente en función del tiempo, lo que demuestra que es posible conseguir

Buena regeneración de plantas a partir de células en esta variedad.
Una repetición del proceso con fines de comprobación en la variedad Maria del medio I fue realizada, pero variando el tipo de explante; de esta manera según muestra el cuadro 4 en todos los casos se consiguió formación de callo el mismo que al momento se encuentra en etapa de emergencia de los embriones somáticos con un promedio de 5 en ambiente iluminado y 7 en ambiente obscuro; esto último a partir de los explantes de médula de tubérculo.

COMENTARIOS SOBRE LOS RESULTADOS

Según varios autores, la influencia que los compuestos químicos ejercen sobre el genoma celular cuando éste se encuentra sobreexponido, determina la presencia de variaciones génicas al azar; así también, se explican algunos resultados con plantas en donde la variación afectó al genoma extracromosómico, induciendo en el mayor de los casos, expresiones de resistencias.

Siendo estos resultados ligados al campo de las probabilidades, los que buscaríamos al someter a segmentos de tejido de papa y cultivarlos en medios que estimulan la dediferenciación de tejidos, dando origen al apareamiento de callo, es de esperarse que de entre las células así producidas, sean estimuladas para dar origen a embriones somáticos, los mismos que al crecer, producirán plantas con su ADN extracromosómico modificado.

Las experiencias desarrolladas, motivo de este informe permitir-
on además de seleccionar una variedad más operable para el
cultivo de tejidos de papa en Ecuador, ajustar la metodología
por la que se llegó desde el aislamiento de segmentos de hoja,
tallo aéreo y médula de tubérculo, producir callo como tejido
dediferenciado y posteriormente inducir la embriogénesis, y la
regeneración completa de la planta, completándose de esta manera
el ciclo motivo de trabajo en la primera etapa del proyecto que
busca modificar el genoma en papa, buscando resistencia a viros-
is.

De hecho a partir de la concepción teórica del proceso metodoló-
gico para conseguir variación somaclonal, al momento ya existe la
probabilidad de haber conseguido el objetivo, pero ser necesario
realizar evaluaciones al respecto. Prueba de lo expresado se
tiene cuando se observan algunas alteraciones fenotípicas en
algunas de las plantitas regeneradas.

VARIACION TEMPORAL EN PAPA

Continúa de la página anterior

VARIANTE	PERIODO (Años)	VALOR MÍNIMO	SEMI-INDICE (%)	EFECTOS
Guatemala	2000-2000	100	40	Glucosa y Chola. Múltiplos.
El Salvador	2000-2000	100-170	50	Chola y Florida. Múltiplos y Tubercula.
Honduras	2000-2000	100	40	Florida y Florida.
Chola	1990-2000	100-100	45	Tubercula y Múltiplos.
Santa Elizabet	2000-2000	100-100	50	Florida y Florida.

Cuadro N. 1

VARIACION DIFERENCIAL EN PAGA
 Diferencia porcentual en los salarios de los

empleados de la industria de la construcción en el país

Año	Industria de la construcción (CII) - Salarios de los empleados de la industria								
	Salarios 1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979
1	10	1	0.9	0.9					
Imodif.	10	3	2.0	1.0				0.4	100
2	10	5		0.9	0.9				
3	10	2	1.0	1.0					
4	10	6	1.7	1.2					
5	10	5				0.2	2.0		

Usado únicamente para comparar el índice para el sector de la construcción de edificios.
 5.0 para todos los años, excepto para Imodif que es igual a 100.

Cuadro N. 2

VARIACION SOMACLONAL EN PAPA

Porcentaje de cambio de caracteres heredables en la descendencia

VARIACION	VALOR		CONTINGENCIA	
	HEREDABLE	NO HEREDABLE	HEREDABLE	NO HEREDABLE
Chola	1	3	20	10
	2	11	17	5
	3	4	27	5
	4	10	22	13
	5	12	20	5
Morón	1	10	22	13
	2	9	25	5
	3	12	20	5
	4	13	17	5
	5	13	17	5
Santo Catalina	1	9	25	15
	2	12	20	11
	3	11	20	10
	4	15	20	5
Gibraltara	1	15	30	5
	2	17	30	2
	3	14	20	4
	4	10	25	10
Huerfana	1	14	25	15
	2	12	25	8
	3	10	25	5
	4	9	20	10
	5	20	15	7

Cuadro N. 3

EMERGENCIAS SOMÁTICAS EN PAPA
 (en los plejados)

Días	Estado de los plejados			Temperatura
	Normal	Disturbios	Completos	
20	.	.	.	0.1 0.2
30	.	.	.	0.3 0.4
40	.	.	.	0.5 0.6
50	.	.	.	0.7 0.8
60	.	.	.	1.0 1.2 0.3
70	.	.	.	1.4 1.7 3.0
80	.	.	.	1.8 1.9 0.2
100	.	.	.	2.7 1.3 1.0

Cuadro N. 4

VARIACION SOMACLONAL EN PAPA
 Cultivos de papa en las zonas de cultivo de la zona

PLANTIO	Medio Básico HS (1962) agregados:		
	GRASA mg/l	UREA mg/l	AGUA DE CUBO mg/l
1	0.5	1.0	20
2	0.5	1.0	30

EMBRIONES EN BROTAION (Torpedo)
 Proporción por el plantío de tubérculo

DIAS	CULTIVO EN	
	100	0.500
100	5	7

Cuadro N. 5

Figura N. 1

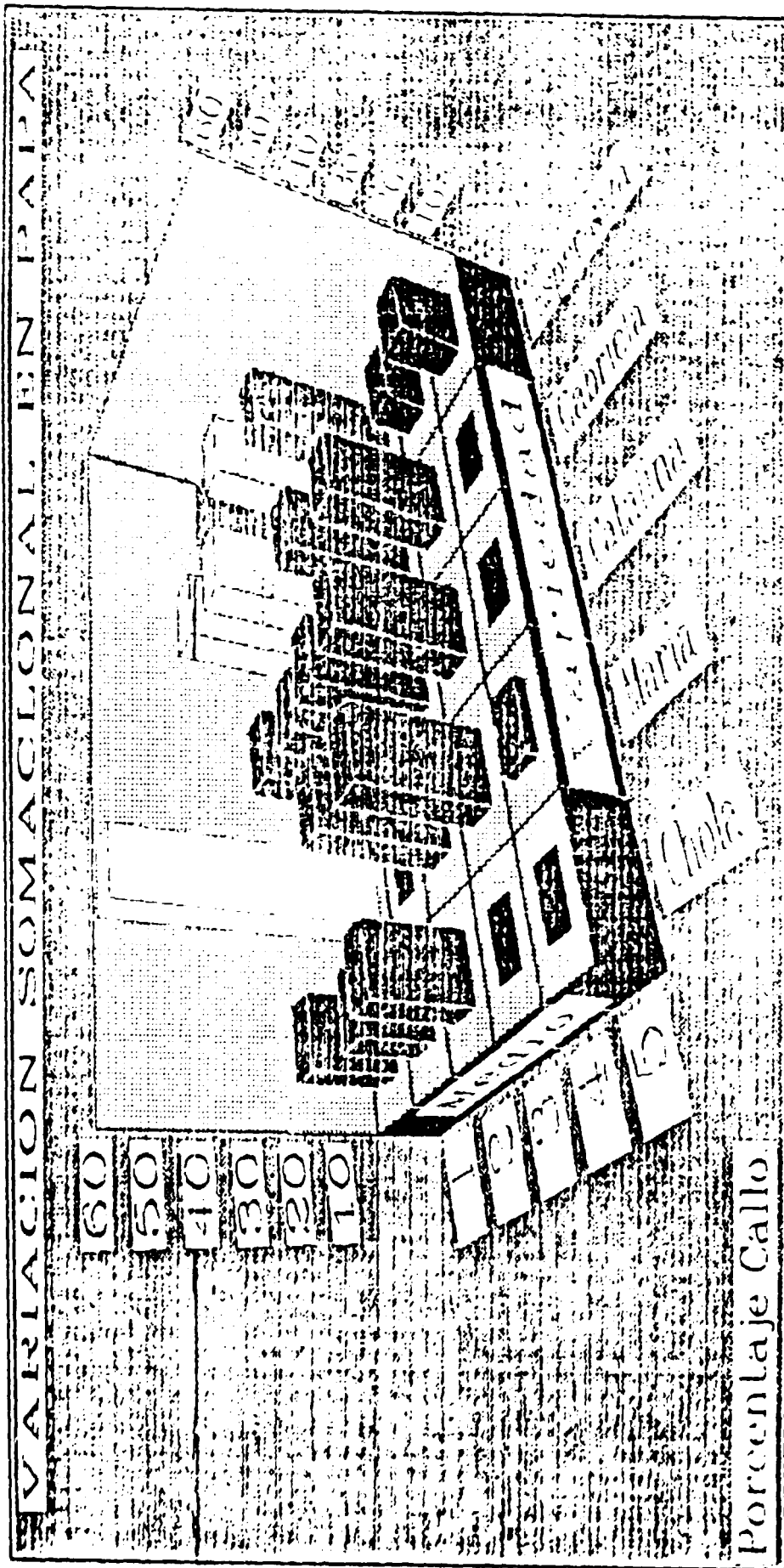
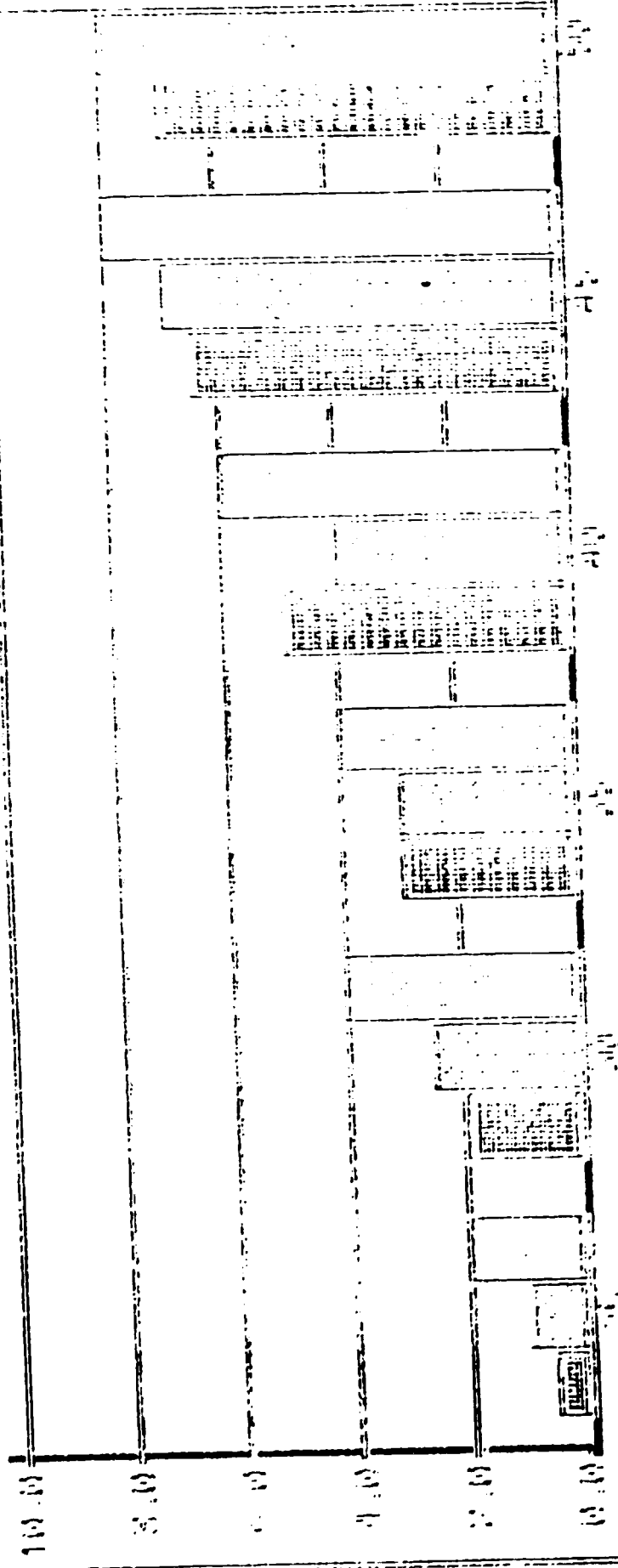


FIGURA N. 2

BROTIES VAN HEMIBIOGUNGUIS DE PAPA

VERVOLG VAN DE BROODEN VAN DE PAPA



11 11 1922

11 11 1922

HITLER'S (S.M.)



RESISTENCIA A VIROSIS EN PAPA. DESARROLLO EN PLANTAS DE PAPA.
RESISTENTES A VIRUS PVX, PVY Y PLRV. POR TECNICAS MOLECULARES
COMBINADAS CON EL CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL
DEL ECUADOR

La Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador, desarrolla una parte del proyecto de Biotecnología denominado resistencia a Virosis en papa, desarrollado en plantas de papa, resistentes a Virus PVX, PVY y PLRV, por Técnicas moleculares, combinadas con el cultivo IN VITRO.

OBJETIVOS

- 1.- Evaluar el material fitogenético disponible en busca de plantas resistentes a virosis.
- 2.- Inducir resistencia a virosis usando las técnicas del cultivo IN VITRO, para evaluar la Variación Somaclonal y Genética.
- 3.- Inducir como consecuencia resistencia a la planta, frente a la presencia de virus.

La ejecución del trabajo se realizó con la suscripción del convenio entre UNAH y la Universidad Central del Ecuador.

En la primera etapa de desarrollo de la actividad se realizó la selección y cultivo de papas en cultivo in vitro, para la inducción de resistencia a la virosis.

Se seleccionó cinco variedades de papa comercial, las cuales cubren el mayor porcentaje de la demanda nacional, para el consumo humano. estas variedades presentan entre sus problemas el ataque de virosis, siendo este un factor de alta incidencia en la baja producción. lo cual afecta el aspecto económico de los productores de papa.

Realizado la investigación de las cinco variedades, se seleccionó a la variedad MAKIA, por su alta frecuencia de regeneración de callo en el 60% de los explantes, como la recomendable para continuar con la investigación, y cumplir con los fines propuestos.

Selecionada la variedad de papa "MAKIA", se continuó la investigación de acuerdo a lo programado en el proyecto, se realizó nuevas pruebas de medios para inducción a callo.

DESCRIPCION DEL PROCESO

SUBETAPA 2 AÑO 1

Los explantes seleccionados para inducción a callo fueron segmentos de hoja de 1 cm aproximadamente, cultivados en frascos de 625 ml, con 20 ml de medio de cultivo por frasco. Luego de la siembra los explantes fueron cultivados con una iluminación de 16 horas y 8 de oscuridad, usando lámparas fluorescentes blancas de 40 w en 120 cm, con una temperatura media en el cuarto de cultivo de 25 ± 2°C.

Los medios utilizados fueron cinco formulaciones (cuadro 1), a partir del medio básico de MURASHIGE & SKOOG (1962), suplementado con 2,4-D y BAP, en concentraciones variables. Se utilizó el medio sólido agregando agar 0.7%, la sucrosa fue añadida en la concentración de 30 g/l, el pH ajustado a 6.0.

Los callos obtenidos fueron seleccionados de acuerdo a su consistencia, seleccionando en un estado intermedio entre callos friables y compactos para cultivar en medios para inducción a embriogénesis.

epiteles 77

En esta etapa fueron seleccionados cuatro formulaciones (cuadro 4), a partir del medio básico de MURASHIGE & SKOOG (1962), suplementado con ANA y ZEATINA en concentraciones variables, se utilizó en medio sólido agregando agar 0.7%, la sucrosa fue añadida en una concentración de 30 g/l. Como sustancia orgánica se utilizó agua de coco en una concentración de 100 ml/l, el pH fue ajustado a 6.0.

RESULTADOS

Del cuadro 2, fig 1 se desprende que en todos los medios se obtuvo callos a los 10 días, con mayor porcentaje del 98% en el medio 1, mientras que el medio 2, se obtuvo apenas el 10%.

Al realizar la observación a los 30 días después de la siembra, en el medio 5, el 100% de los explantes indujo callo, mientras que el medio 2 en donde el balance entre Auxinas y Citoquininas fue igual, el porcentaje de inducción a callo fue en el 60%.

El cuadro 3 hace referencia a la consistencia y color del callo, alcanzando en todos los medios, a los 30 días una consistencia semifríasida con con el mayor porcentaje en el M1, con 95%, mientras que M2 alcanzó el 60%.

El color del callo en el M1, M3, M4 fue verde oscuro con el 100%, en M2 el 80%.

Del cuadro 5, fig 2 se observa el desarrollo de los brotes en los diferentes medios de prueba, así los medios 1 y 4 presentan un promedio de 5 brotes por callo del 90% de los callos formados, el medio 3 presentó el mayor promedio con 6 brotes por callo del 70% de los callos formados.

Los brotes obtenidos en los medios M3 y M4 presentan una variante en el color de las hojas, tomando una coloración blanca semejante a plantas albinas, estas fueron sembradas en medio de micropropagación (control 6), para posteriores pruebas de aclimatación.

COMENTARIOS DE LOS RESULTADOS

Es bien conocido en la actualidad que la variabilidad genética puede ocurrir en el cultivo de tejidos sin que haya habido la aplicación de un agente mutagénico físico o químico conocido.

El contenido hormonal agregado a los medios de cultivo, pueden generar variabilidad natural, esto se explica en los resultados de la investigación, en donde los brotes cultivados en los medios de prueba mostraron una variación en el color de las plantitas obtenidas, para lo cual será necesario evaluar para resistencia inculando en subcultivo.

??
0

CUADRO 1

*Como sabe que
hay "Variación somaclonal"*

~~VARIACION SOMACLONAL EN PAPA VARIEDAD MARIA~~

~~MEIOS DE PRUEBA PARA INDUCCION A CALLO~~

COMPONENTES

MEDIOS	AUXINAS 2,4-D (mg/l)	CITOKUININAS BAP (mg/l)
M1	1.5	1.0
M2	1.5	1.5
M3	2.0	1.5
M4	2.5	2.0
M5	3.0	1.5

MS (1967)

SUCROSA 3% 1/1

AGAR 0.7 %

pH 6.0

CUADRO 2

~~VARIACION SOMACLONAL DE PAPA VARIEDAD MARIA~~

~~PORCENTAJE DE FORMACION DE CALLO EN
CINCO MEDIOS VS DIAS~~

MEDIOS	DIAS		
	20	25	30
	%	%	%
M1	50	70	95
M2	10	35	60
M3	40	75	95
M4	60	80	95
M5	35	60	100

CUADRO 3

~~VARIACION SOCIAcional~~ PAPA VARIEDAD MARIA

CONSISTENCIA Y COLOR DEL CALLO

MEDIOS	30 DIAS	
	SEMIFRIABLE	VERDE OSCURO (2.5GY 5/4)
	%	%
M1	95	100
M2	60	80
M3	90	100
M4	90	100
M5	85	90

* Se utilizó la tabla de colores de MUNSSELL.

CUADRO 4

VARIACION SOMACLONAL EN PAPA VARIEDAD MARIA

MEDIOS DE PRUEBA PARA EMERIOGENESIS SOMATICA

COMPONENTES

MEDIOS	AUXINAC ANA(mg/l)	CITOKININAS ZEATINA(mg/l)
M1	1.5	0.5
M2	1.0	1.0
M3	2.0	1.0
M4	2.0	1.5

MS (1963)

SUCROSA 30 g/l

AGAR 0.7%

pH 6.0

CUADRO 5

VARIACION SOMACLONAL EN PAPA VARIEDAD MARIA

NUMERO DE BROTES POR CALLO VS MEDIOS

MEDIOS	N DE BROTES	% DE CALLOS
M1	5	90
M2	3	50
M3	6	90
M4	5	80

& Datos promedios tomados a los 45 días después de la siembra.

CUADRO 6

MEDIO PARA MICROPROPAGACION

SUBCULTIVO DE LOS BROTES PROCEDENTES DE CALLO

MEDIO	AG3 (mg/l)	PaCa (mg/l)
M1	0.25	2.0

M1 (1962)
 SUCROSA 30 g/l
 AGAR 0.7 %
 pH 6.0

Variación somaclonal en papa: Var Maria
PORCENTAJE DE CALLOS POR MEDIO

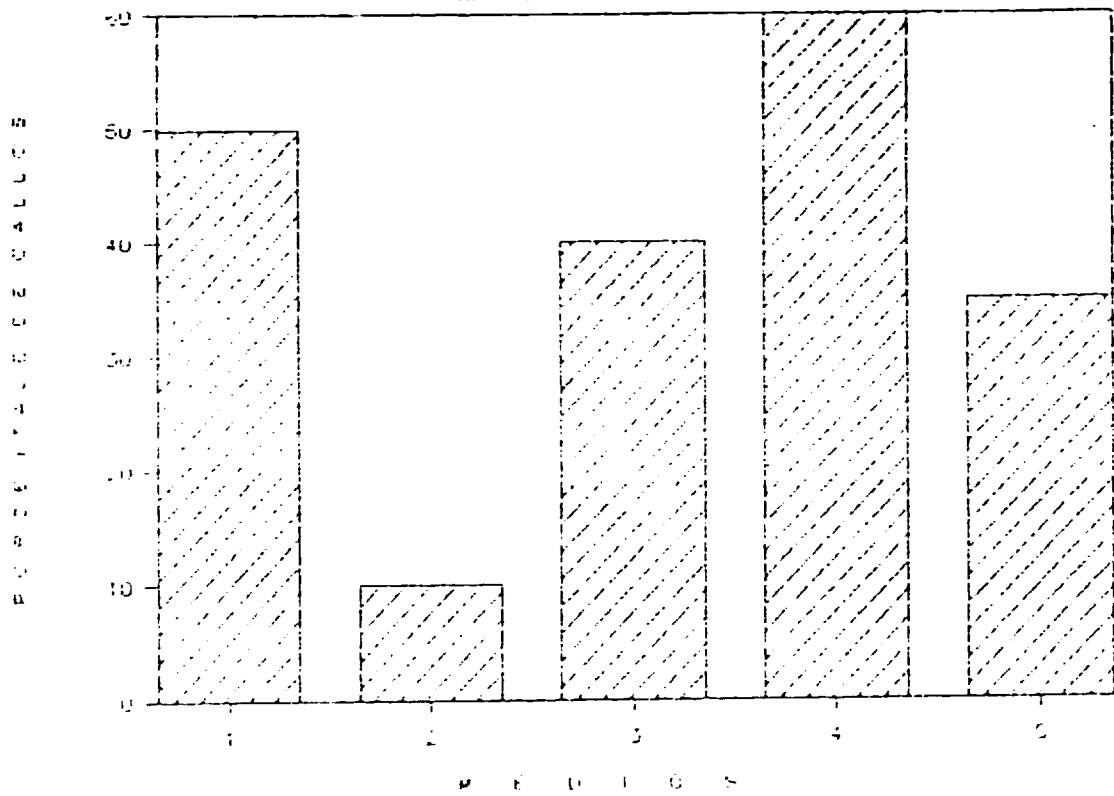


Fig. 1