



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50<sup>th</sup> 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](mailto:publications@unido.org) for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at [www.unido.org](http://www.unido.org)

19157

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

Contrato No. 90/92

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

Segundo Año de Actividades

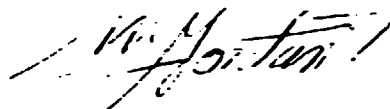
País: Chile (U. Católica de Chile)

Segundo Informe Técnico (Final)

SEGUNDO INFORME TECNICO PROYECTO: " RESISTANCE TO VIROSIS IN  
POTATO DEVELOPMENT OF POTATO PLANTS BEARING RESISTANCE TO  
POTATO VIRUS PVX, PVY AND PLRV BY COMBINED MOLECULAR AND  
IN VITRO PLANT CULTURE TECHNIQUES". (MAYO 1991).

ONU DI PROJECT " REGIONAL PROGRAMME OF BIOTECHNOLOGY FOR  
LATIN AMERICA AND THE CARIBBEAN"

DR. MIGUEL JORDAN, CONTRACT N° 90/92 - 2° INFORME



DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P. UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE  
CASILLA 114-D  
FAX: 2225515  
SANTIAGO  
CHILE

A : COORDINADOR TECNICO, DR. RODOLFO QUINTERO/ONU DI,  
PRESIDENTE MASARYK 20-14° PISO, COL. POLANCO,  
11570, MEXICO.

C.C.: ESTEBAN HOPP, COORDINADOR  
MARCELA MILLAN (CONICYT)  
RENAN FUENTEALBA (OF. ENLACE PNUD-CEPAL)

MAYO 1991

Segundo informe correspondiente Mayo 1991, Dr. M. Jordan.

A. Firma del Contrato. Indicado en el primer informe de Octubre de 1990.

B. Optimización de los sistemas de micropropagación.

La tecnología de inducción de brotes a partir de hojas ya fue descrita anteriormente, y se usa regularmente en el laboratorio. Dependiendo de cada caso, es posible incrementar la cantidad de brotes por explante (hasta 10/sección) modificando levemente las hormonas. Las condiciones de cultivo generalizadas se basan en el uso de medios agarosa-MS con 2.5 mg/l de zeatina y 0.02% AIA. Los brotes obtenidos se subcultivaron en medio J con 0.3 mg/l de NAA, 0.1 mg/l de BA y 0.01 mg/l de GA3, con lo cual se logra crecimiento de plantas enteras. Variantes somaclonales derivados de este material se visualizaron mediante electroforesis de GOT.

Plantas se regeneraron también a partir de callo, aunque este proceso indirecto, que implica subcultivos, es más lento. Una variante en esta estrategia fue lograr la iniciación múltiple de microcallo a partir de secciones internodales a través de cultivos duales co-cultivados con tabaco. El uso de 2,4-D estimula igualmente la dediferenciación de tejidos a callo.

La tercera modalidad de inducción de plantas con posible variación es a través de suspensiones celulares. Este método no es eficiente por el tiempo que se requiere para inducir morfogénesis; igualmente la regeneración es escasa, errática e insatisfactoria para la obtención de numerosos regenerantes en papa. Igualmente aquí el uso del 2,4-D es fundamental para la iniciación y mantención de suspensiones celulares en papa.

C. Inducción y caracterización de variantes somaclonales

Con el fin de visualizar variación somaclonal natural existente en el material derivado de explantes de hoja, se usaron los patrones de migración electroforética de isoenzimas, eligiéndose la enzima glutamato dehidratasa transaminasa (GDT), por su estabilidad a temperatura ambiente y la facilidad con que se visualiza su patrón de migración.

El zimograma de cada individuo analizado se logró usando 40 mg de tejido fresco en condiciones estériles, macerando con 40 ul de buffer de extracción en 2 bor. Después de la posterior centrifugación el sobrenadante, cargado en un gel activo de poliacrilamida al 7 %, se somete a electroforesis por espacio de 3 hrs. a 15 mA, revelando en buffer TRIS-HCl y Fast Blue BB con ac. aspártico-ácido glútamico. Los resultados de zimogramas son semejantes a las electroforesis realizadas en el informe anterior.

Con relación a la inducción de variación inducida, se utilizaron ápices y entrenudos del clon 1031 y cv. Desiree los que fueron sometidos a irradiación con luz UV y tratamientos con agentes químicos de efecto mutagénico. Para la exposición a UV se colocaron los explantes en placas de cuarzo en condiciones estériles. Los explantes se irradiaron entre 10 y 30 min a la luz UV a 15 cm de la fuente de radiación, cultivándose posteriormente para la inducción de raíces y plantas. Los mutágenos químicos usados fueron Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio en concentraciones de 0.1 mg/l durante un lapso de 10 min a 120 horas.

Los resultados de dichos tratamientos, que se visualizan en las Tablas 1-7, indicadas más abajo, permitieron encontrar diferentes respuestas:

Bajo irradiación con UV se encontraron respuestas individuales diversas tales como plantas robustas, mostrando algunas iniciación de microtubérculos, pérdida parcial de dominancia apical con brotación de yemas axilares a brotes, formación de callo normal y en algunos casos, tendencia a la oxidación tisular. El porcentaje de rizogénesis no se vió afectado. Las hojas en algunos tratamientos mostraban curvatura convexa con 30 min de irradiación con UV (Fig.5)

Los tratamientos con NA y BE provocaron amarillamiento de brotes con hojuelas lanceoladas atípicas e inducción múltiple de raíces. El BE, salvo tratamiento por 10 minutos siempre produjo inhibición de raíces en tratamientos por períodos más largos. En el caso de NA el sistema radicular pudo ser iniciado pero las regiones meristemáticas como las más antiguas se visualizaban notablemente atrofiadas (Fig. 6). En un caso, el BE produjo la formación de microtubérculo en el ápice de un brote de color rojo por síntesis de antocianinas (Fig.7) El detalle de las diferentes respuestas morfogénicas inducidas en el clon 1031 y el cv. Desiree está indicado en las tablas 1-7.

Tabla 1: Respuestas morfogénicas inducidas en brotes por diferentes tiempos de exposición con luz UV después de 60 días en el Clon 1031

Morfogénesis %	Tratamiento			
	Control	10 min.	20 min.	30 min.
Respuesta#	100	75	77	100
Oxidación	0	40	27	40
Rizogénesis	55	40	57	50
Nº Brotes/planta	1	0	1	1
Form. de callo	0	14	0	14
Diam. hojuelas reg. (mm)	2	1	2	0.5

# Respuestas sobre el total de plantas sobrevivientes.

Tabla 2: Respuestas morfogénicas inducidas en brotes por diferentes tiempos de exposición con luz UV después de 60 días en el cv. Desiree.

Morfogenesis %	Tratamientos			
	Control	10min	20 min.	30 min
Respuesta	77	44	55	60
Oxidación	11	22	33	22
Rizogenesis	42	75	60	33
NºBrotes/planta	1	1	1	1
Form. de callo	0	0	20	33
Diam.hojuelas reg. (mm)	2	2	2	2

Tabla 3: Respuestas morfogénicas inducidas en internudos por diferentes tiempos de exposición con luz UV después de 30 días en el clon 1031.

Morfogenesis %	Tratamientos			
	Control	10min	20 min.	30 min
Respuesta	100	77	55	88
Oxidación	11	100	60	87
Rizogenesis	11	22	14	12
NºBrotes/planta	2	1	3	1
Form. de Brotes	25	0	20	12
NºEntrenudos/planta	5	7	4	7
Form. de callo	100	77	55	88
Diam.hojuelas reg. (mm)	1	0.5	1	0.5

Tabla 4: Respuestas morfogénicas inducidas en internudos por diferentes tiempos de exposición con luz UV después de 20 días en el cv. Desiree.

Morfogenesis %	Tratamientos			
	Control	10min	20 min.	30 min
Respuesta	66	100	60	100
Oxidación	50	22	66	44
Rizogenesis	33	55	16	22
NºBrotes/planta	6	5	4	5
Form. de Brotes	16	66	33	44
NºEntrenudos/planta	11	18	5	6
Form. de callo	66	100	60	100
Diam.hojuelas reg. (mm)	1	1	2	1

Tabla 5: Efecto de pretratamientos (10 min) con agentes mutagénicos (Bromuro de Etidio y Naranja de Acridina) en brotes del cv. Desiree después de 60 días de cultivo.

Morfogenesis %	Tratamientos		
	Control	B.Et.	N.A.
Respuesta	90	80	88
Oxidación	0	0	0
Rizogénesis	100	0	87
Nº Brotes/planta	5	5	3
Form. de callo	22	25	37
Diam. hojuelas reg. (mm)	3	3	3

Tabla 6: Efecto de incubación por 24 y 72 horas con agentes mutagénicos (Bromuro de Etidio y Naranja de Acridina) de brotes del cv. Desiree después de 60 días de cultivo.

Morfogenesis %	24 horas			72 horas		
	Control	B.Et.	N.A.	Control	B.Et.	N.A.
Respuesta	100	62	80	100	20	80
Oxidación	25	0	0	20	0	0
Rizogénesis	100	0	100	80	0	100
Nº Brotes/planta	2	2	2	2	2	2
Form. de callo	0	0	0	0	0	0
Diam. hojuelas reg. (mm)	3	3	3	3	2	2

Tabla 7: Efecto de incubación de secciones internodales del cv. Desiree por 10 min, 24 y 72 horas con agentes mutagénicos (Bromuro de Etidio y Naranja de Acridina) después de 60 días de cultivo.

Morfogenesis %	10 min			24 horas			72 horas		
	Ctrl	BE	NA	Ctrl	BE	NA	Ctrl	BE	NA
Respuesta	90	70	83	80	30	60	0	20	30
Oxidación	22	28	25	0	0	18	+	0	0
Rizogénesis	22	43	75	50	0	51	+	0	66
Nº Brotes/planta	3	1	2	2	0	1	+	1	3
Form. de brotes	33	43	62	80	30	50	+	100	100
Form. de callo	90	70	50	60	20	50	+	10	30
Diam. hojuelas reg. (mm)	4	2	2	4	1	2	+	1	1
Nº de entrenudos	5	6	7	15	6	13	+	6	14
Microtubérculos%	22	43	37	0	33	0	+	0	33

\* tejidos infectados que debieron ser eliminados.

#### D. Infección de plantas

La infección con virus PVX y PVY no se ha iniciado aun puesto que las plantas obtenidas de condiciones in vitro deben adaptarse a las condiciones de invernadero (hardening) después de haberse transferrido de un ambiente estéril (in vitro), estando aun algo pequeñas para proceder a este experimento. Sin embargo se ha empezado a concentrar virus en el laboratorio del D. L. Maza en Talca con el cual se harán las pruebas de infección.

#### E. Transformación

Transformación con Agrobacterium tumefaciens. Brotes axenicos de papa cv. Desiree fueron cultivadas en medio Jordan; fueron heridos y posteriormente impregnados con un inculo de la bacteria A. tumefaciens, portadora del plasmidio pGV 2260(pES24) que codifica para genes de resistencia a kanamicina y rifampicina (material cedido por el Dr. Luis Herrera -Estrella). Estos inoculos provenian de cultivos del vector en placas de agar-luria con los antibioticos kanamicina y rifampicina en concentraciones de 50 y 100 ug/ml respectivamente.

La infección así establecida de los brotes de papa se mantuvo controlada mediante sucesivos subcultivos en el mismo medio, suplementado con rifampicina (100 ug/ml), por espacio de 2 semanas. Posteriormente se eliminó el vector subcultivando en un medio agar-shaha, que contenia 100 ug/ml del antibiotico cefatoxima y 300 de kanamicina; el primero eliminó a la bacteria, mientras que el segundo permitió seleccionar los tejidos que incorporaron el DNA plasmidial.

Los tejidos que sobrevivieron fueron subcultivados en placas de medio agar-shaha con 300 ug/ml de kanamicina, junto con explantes de Desiree, que no se infectaron con A. tumefaciens, como control.

En la actualidad se mantienen plantas de diferentes clones supuestamente transformadas en subcultivo (Desiree, Clon 1200, Fig.2); algunos están regenerando microtubérculos como lo muestra el cv. Desiree (Fig.3).

Los resultados de transformación aunque todavía son preliminares aparecen prometedores. Se cuenta con plántulas que han podido ser regeneradas en condiciones de cultivo en kanamicina (hasta 300 ug/ml y rifampicina). Estas plantas (Fig.2) muestran inicialmente in vitro diferente morfología, algunas con entrenudos cortos y/o achaparradas. El análisis aunque resistente a antibioticos se está estudiando para evaluar presencia de opinas y/o actividad de fenilalanina. En este sentido se han hecho pruebas en TLC de celulosa para visualizar los aminoácidos de bacteria: ortopina, nopalina (y arginina?) con patrones puros adquiridos de la firma Sigma. (Fig.4)



F. Evaluación de los distintos experimentos Las respuestas morfogénicas como las pruebas de electroforesis, junto con los protocolos de transformación son por ahora satisfactorias. Las plantas se están multiplicando para poder realizar la infección in vivo y en vitro, mantener stocks y probar diferentes test que permitan concluir la expresión de los genes del vector en ensaye.

G. Curso de Entrenamiento.

Entre el 15 al 30 de Marzo de 1991 asistí al Curso Taller sobre Biotecnologías para el Diagnóstico de Virosis Vegetales, que fue dictado en el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGENIB), Buenos Aires, Argentina. (ver anexo).

En general, a través de seminarios de investigación se ha podido entrenar a estudiantes y personal técnico en los aspectos de transformación, electroforesis y manipulación con agentes inductores de variación. (ver Presentaciones a Congresos y Seminarios).

H. Regeneración de papas. Se han seguido realizando subcultivo de todos los clones de papa usados para obtener material tendiente a la realización de electroforesis, isozimas de GOT y ADH como también para infectar las plantas con PVX+PVY y PLRV, de acuerdo a la letra B. En la actualidad las plantas derivadas de cultivos in vitro están siendo establecidas en el inóculo nadero, en pequeñas macetas en condiciones no esteriles. La mezcla usada consiste en 50% de una tierra de hoja de Lithraea caustica, 25% de arena y 25% de vermiculita o de turba, esterilizados en estufa a 200°C.

ANEXO

Presentaciones a Congresos/Seminarios de Investigación.

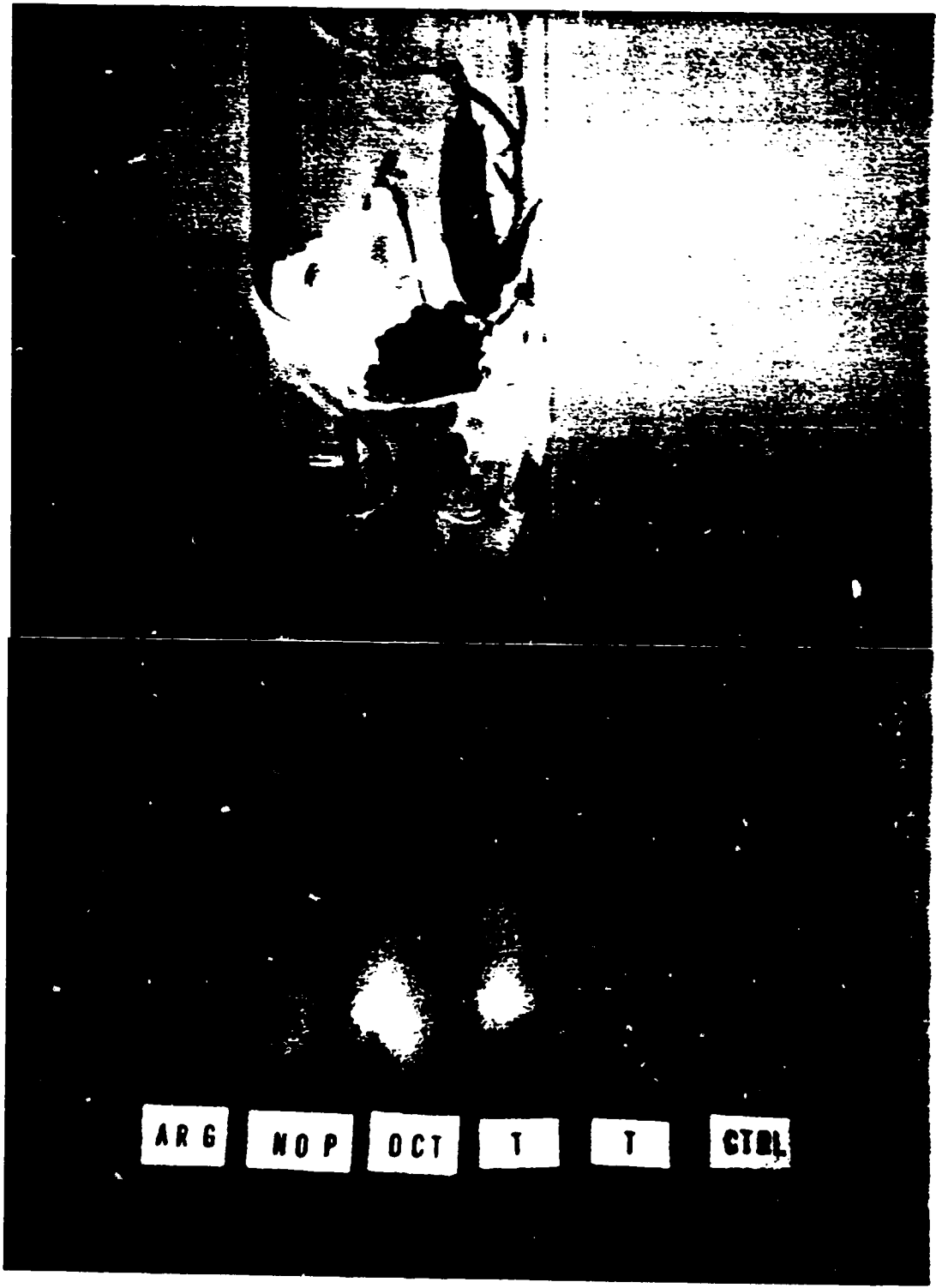
1990. Seminario de Investigación Biológica. Andrea Stipo. Expiantes de Plántulas de Papa (Solanum tuberosum) con agentes mutagénicos.

1991 - Segundo Congreso Nacional de Biotecnología. 19-20 de Abril de 1991. Villa del Mar. Jordan, M., Tascón, B., Roverano, C., Stipo, A., Velásquez, L., Aguirre, J., Aproximación a un protocolo de transformación en plantas de papa (Solanum tuberosum) usando Agrobacterium tumefaciens.

H. JORDAN  
Fig 1-2



Fig 3J4



ARG NOP OCT T T CTRL

Fig 576



H. JORDAN  
Fig 7

