

CONTENIDO DEL INFORME TÉCNICO

PROGRAMA DE FORMACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

1. Antecedentes Generales de la Propuesta

Nombre

“DESARROLLANDO MÉTODOS EFICIENTES DE SELECCIÓN PARA RESISTENCIA A VIRUS EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PAPA”

Código BID-FP-V-2003-1-A-029

Entidad Responsable Postulante Individual

CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN REMEHUE DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (INIA-REMEHUE)

Coordinador BORIS SAGREDO DÍAZ

Lugar de Formación (País, Región, Ciudad, Localidad)

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP). Perú, Lima, La Molina.

Tipo o modalidad de Formación

CURSO CORTO

Fecha de realización

22 Septiembre al 2 de Octubre

Participantes: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Nombre	Institución/ Empresa	Cargo/Actividad	Tipo Productor (si corresponde)
Boris Sagredo Díaz	INIA-Remehue	Investigador	
Marcelo Villagra Barrientos	INIA-Remehue	Ayudante de Investigación	
Annelore Winkler Ruminot	INIA-Remehue	Técnico cultivo de tejidos	
Marcos Uribe Gallegos	INIA-Remehue	Ayudante de investigación	

Problema a Resolver: detallar brevemente el problema que se pretendía resolver con la participación en la actividad de formación, a nivel local, regional y/o nacional.

El recambio de semilla de papa que deben realizar los agricultores se debe principalmente al efecto de los virus PVX, PVY y PLRV, los cuales pueden reducir drásticamente la producción y calidad de las producciones. La forma más conveniente de controlar y reducir las pérdidas que estos ocasionan es mediante resistencia genética. El desarrollo de variedades resistentes a estos virus es un objetivo de nuestro Programa de Mejoramiento Genético de Papa del INIA y para esta desarrollando métodos modernos basados en el uso de marcadores moleculares que aumenten la eficiencia de selección y aceleren la creación de estas nuevas variedades necesarias tanto para el consumo fresco y/o la industria de procesamiento. Un requisito para el desarrollo de estos nuevos métodos de selección asistida por marcadores moleculares (SAMM) es la identificación de fuentes de resistencia que posean los genes de interés y marcadores de ADN ligados a estos. Generalmente esta información se obtiene a través de métodos de disección genética, los cuales han permitido identificar marcadores de ADN para los genes Ry_{adg} y Rx_{adg} de resistencia a PVY y PVX, respectivamente. Estos marcadores están siendo utilizados en nuestro programa para desarrollar métodos SAMM a través del proyecto "Mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares para selección de variedades de papa con resistencia múltiple a nematodo dorado y virus" financiado por FIA. Sin embargo, en el caso del PLRV no se cuenta aún con marcadores moleculares para desarrollar métodos SAMM.

Nuestro Programa de Mejoramiento, utilizando una fuente *S. tuberosum* ssp andígena altamente resistente a PLRV que ha sido descrita por el CIP recientemente, pretende mapear e identificar MM asociados a los genes de resistencia a PLRV y así avanzar en el desarrollo de métodos SAMM para crear aceleradamente nuevas variedades resistentes a PLRV.

En los experimentos de disección genética de mapeamiento de genes y/o QTL, la caracterización fenotípica de individuos de familias segregante es un paso crítico. Así sería muy importante contar con un método eficiente de evaluación de resistencia a PLRV que permita evaluar un gran número de genotipos en un corto tiempo. Los métodos utilizados en nuestro programa se basan en evaluaciones de campo que toman un largo periodo de tiempo y no permiten trabajar con un alto número de individuos. El CIP es este último tiempo ha desarrollado métodos de evaluación en invernadero utilizando plántulas o brotes de tubérculos que resultan más sencillos y rápidos y permiten trabajar con un alto número de genotipos, una metodología que nos permitiría avanzar rápidamente en nuestros propósitos de caracterización de familias segregantes y mapeamientos de genes de resistencia a PLRV. Así mediante un curso especial preparado por la Dra Merideth Bonierbale investigadora del Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú, un profesional y técnicos de nuestro programa recibirían un entrenamiento teórico y práctico sobre estas metodologías. Así también se entrenaría a uno de los concurrentes en el uso de programas de manejo de información y base de datos aplicados a un programa de mejoramiento de papa.

Objetivos de la Propuesta

El objetivo general de esta propuesta fue adquirir los conocimientos teóricos y prácticos necesarios para implementar en nuestro programa de mejoramiento de INIA-Remehue un sistema de evaluación rápida de resistencia a PLRV en plantas de papa y avanzar en la implementación de un sistema de base de datos para desarrollar métodos eficientes de selección y desarrollo de nuevas variedades

El éxito de este objetivo nos permitiría avanzar en la ejecución de las actividades de evaluación de resistencia a PLRV en familias segregantes, lo que representa un paso crítico para alcanzar la meta de desarrollar un método SAMM para selección de genotipos altamente resistentes a PLRV mediante la identificación de MM asociados a genes de resistencia (Proyecto FIA de Biotecnología BIOT-01-A-015).

Para el cumplimiento de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Adquirir conocimientos teóricos y prácticos para implementar y manejar una crianza de vectores áfidos de PLRV en condiciones controladas de laboratorio.
2. Adquirir conocimientos teóricos y práctico sobre métodos infestación y evaluación de resistencia a PLRV en plantas de papa, con énfasis en metodología de condiciones controladas en invernadero.
3. Adquirir conocimientos teóricos y prácticos para implementar métodos de detección de virus en papa mediante PCR.
4. Adquirir conocimientos teóricos y prácticos para avanzar en la implementación de un sistema eficiente de manejo de información en base de datos en el programa de mejoramiento genético de INIA-Remehue

2. Antecedentes Generales: describir si se lograron adquirir los conocimientos y/o experiencias en la actividad en la cual se participó (no más de 2 páginas).

Nuestro programa de mejoramiento genético de papa trabaja por desarrollar nuevas variedades destinadas al consumo fresco y/o a la industria para procesamiento, las cuales además tienen que ser resistentes a virus y nematodo dorado. Estas nuevas variedades multiresistente beneficiarán directamente al agricultor, dado que disminuirán la tasa de degeneración de la semilla por virus y así el periodo de tiempo para recambio de semilla será mas largo. Los mas beneficiados serán los pequeños agricultores quienes no tienen un fácil acceso a semilla de buena calidad. Por otro lado, el desarrollo de nuevas variedades resistentes a Nematodo dorado disminuirá el riesgo de dispersión de esta plaga cuarentenaria hacia las zonas semilleras del sur de Chile. El mejoramiento genético de esta especie *S. tuberosum* ($4x=2n=48$) es un proceso largo y tedioso, donde se requieren periodos de tiempo sobre los 10 años para llegar a seleccionar una nueva variedad. Para el desarrollo de este proceso es indispensable contar con métodos de evaluación y selección eficientes. En este sentido el desarrollo herramientas de selección basadas en marcadores de ADN representan una enorme ventajas; son muy sensibles, no dependen del medio ambiente y solo requieren una pequeña muestra de tejido. El uso de marcadores de ADN puede aumentar ostensiblemente la eficiencia de selección en los programas de mejoramiento. Con este objetivo de aumentar la eficiencia de nuestro programa de mejoramiento genético de papa, y acelerar el desarrollo de nuevas variedades, estamos ejecutando el proyecto "Mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares para selección de variedades de papa con resistencia múltiple a nematodo dorado y virus" - financiado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA-BIOT-01-A-015) - mediante el cual se implementaran métodos de selección asistida por marcadores moleculares (SAMM) para identificar tempranamente genotipos que posean genes de resistencia a PVY, PVX, PLRV y al Nematodo dorado en poblaciones segregantes.

A un año de ejecución de este proyecto en nuestro germoplasma los genes Rx_{adg} Ry_{adg} y H1 de resistencia a PVX, PVY y ND respectivamente, han sido identificados a través de ensayos

biológicos y/o moleculares, y en estos momentos se están analizando sus respectivas progenies segregantes, lo cual permitirá evaluar y diseñar métodos SAMM. La situación de PLRV es diferente, donde existe poca, casi nula, información molecular respecto de la genética de transmisión de los genes y/o QTL responsable de la resistencia a este virus.

El Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, ha identificado nuevas fuentes de resistencia a PLRV en *S. tuberosum* spp *andigena*, que muestran elevados niveles de resistencia varias veces superiores a las variedades conocidas como resistentes. Una familia tetraploide de estas fuentes de resistencia a PLRV CIP397087 (LR93.160 x C93.156) ha sido introducida a nuestro programa para ser caracterizada y mediante métodos de disección genética mapear los genes y/o QTL responsable de la resistencia, para así identificar marcadores asociados a estos y desarrollar métodos SAMM.

Un aspecto crítico para el éxito de estos análisis de disección genética mediante poblaciones segregantes y MM, es contar con métodos eficientes de evaluación del fenotipo, el cual debe indicarnos el grado de resistencia y/o susceptibilidad al virus presente en cada genotipo de la familia segregante. Hasta ahora, en INIA-Remehue, los ensayos de resistencia a PLRV se realizaban en campo bajo infestación natural y su evaluación puede tomar tres años o más, y además este método no permite evaluar un gran número de genotipos a la vez. Sin embargo, el CIP ha desarrollado un protocolo de evaluación de resistencia a PLRV más eficiente y rápido bajo condiciones de invernadero (Mihovilovich et al., 2002) que permite evaluar poblaciones de gran tamaño. Actualmente el CIP esta utilizando este protocolo para sus actividades de mejoramiento. Con el fin de asegurar el éxito de las actividades de caracterización de familias segregantes para PRLV contempladas en el proyecto FIA-BIOT-01-A-015, es un objetivo nuestro implementar esta técnica de monitoreo de resistencia a PLRV desarrollada por el CIP. Con el fin de ayudarnos en este propósito, el CIP desarrolló un entrenamiento especial de capacitación de profesionales y técnicos de INIA-Remehue. Esto consistió clases y charlas específicas, incluyendo participación directa en las evaluaciones de rutina de resistencia a PLRV que esta realizando el CIP.

3. Itinerario Realizado: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

FECHA	ACTIVIDAD	OBJETIVO	LUGAR
-------	-----------	----------	-------



22-Sept-2003	Introducción general al CIP. Reunión con MarthaHuanes	Conocer al CIP y sus dependencias. Recibir información relevante sobre regulaciones y facilidades para los participantes extranjeros en entrenamiento	Sala Phureja, CIP, La Molina, Lima, Perú
	Reunión con Dra Merideth Bonierbale y Thomas Zschocke	Recepción formal de parte de la coordinadora curso y el nuevo jefe de transferencia del CIP	Sala Phureja, CIP, La Molina, Lima, Perú
	Charlas-clases sobre metodologías de evaluación de grandes poblaciones de papa para PLRV. Elisa Mihovilovich	Conocer y discutir aspectos importantes de las metodologías de evaluación de resistencia a PLRV en poblaciones de gran tamaño que se están realizando en el CIP	Sala Phureja,CIP, La Molina, Lima, Perú
	Charla-presentación caracterización genética y molecular de altos niveles de resistencia a PLRV en S. andigena. André Vlesquez.	Conocer y discutir los avances obtenidos en la caracterización genética de una fuente de resistencia a PLRV de S. andigena.	Sala Phureja,CIP, La Molina, Lima, Perú
	Visita a la biblioteca	Conocer como usar las facilidades de la biblioteca del CIP	Biblioteca, CIP, La Molina, Lima, Perú
	Trabajo práctico en invernadero: llenado de macetas y trasplante de material vegetal	Aprender en forma práctica el manejo de plantas provenientes de ensayos de PLRV para evaluar infección secundaria	Invernadero, CIP, La Molina, Lima, Perú
23-Sept-2003	Randomización de genotipos de una población andigena dihaploide segregante en un diseño BCA	Conocer en forma practica el modelo estadístico que se aplica en las evaluaciones de poblaciones segregantes para resistencia a PLRV	Invernadero, CIP, La Molina, Lima, Perú
	Continuación de trasplante de plantas infectadas con PLRV para evaluación de infección secundaria	Aprender en forma práctica el manejo de plantas provenientes de ensayos de PLRV para evaluar infección secundaria	Invernadero, CIP, La Molina, Lima, Perú
	*Reunión Laboratorio (GIS) Reinhard Simon	Introducción al Manejo de Información de Base de Datos.	Laboratorio Informática CIP, La Molina, Lima, Perú
24-Sept-2003	Inoculación de la población con el PLRV, utilizando áfidos infestivos (Repetición I).	Conocer en forma practica la forma de trabajar con áfidos e inocular plántulas.	Invernadero de virología, CIP, La Molina, Lima, Perú
	Finalizar actividades de trasplantes	Aprender en forma práctica el manejo de plantas provenientes de ensayos de PLRV para evaluar infección secundaria	Invernadero, CIP, La Molina, Lima, Perú
	*Control de Calidad de Datos Henry Juárez	Conocer e identificar formas de ingresar la información en Base de Datos.	Laboratorio Informática CIP, La Molina, Lima, Perú
25-Sept-2003	Análisis genético utilizando marcadores SSR	Conocer en forma práctica los avances que tienen en la caracterización de familias segregantes	Lab. Biología Molecular, CIP, La Molina, Lima, Perú
	Determinación de Ploidía I	Colectar y almacenaje de raíces de plantas tetraploides y haploides para luego realizar conteo de cromosomas.	Lab. Citogenética e invernadero CIP. La Molina, Lima, Perú
	*Sistema de Georeferencias (DIVA) Henry Juárez	Conocer sistemas de colectas de la información y ubicación geográficas de los cultivares de Papas y Camote en diferentes Regiones del Perú y Otras Regiones	Laboratorio Informática CIP, La Molina, Lima, Perú

		Regiones del Perú y Otras Regiones.	
26-Sept-2003	Trabajo práctico en el invernadero. Determinación de ploidía II Determinación de ploidía III. Herramientas Software de control de calidad generales Edwin Rojas	Evaluar el numero de áfidos por genotipo inoculados anteriormente Preparación de muestras de raíces para el conteo de cromosomas: Hidrólisis Aprender técnica de conteo de cloroplasto en hojas y cromosomas en raíces de papa Conocer y practicar el uso y manejo de la información en los diferentes ambientes de trabajo (Programas Computacionales)	Invernadero, CIP, La Molina, Lima, Perú Lab. Citogenética, CIP. La Molina, Lima, Perú. Lab. Citogenética, CIP. La Molina, Lima, Perú Laboratorio Informática CIP, La Molina, Lima, Perú
29-Sept-2003	Trabajo práctico en invernadero *Herramientas de manejo de la información (LIMS) Edwin Rojas, Miguel Blancas	Participar en forma práctica en la randomización e inoculación con áfidos infestivos la replica II de plantas Conocer las diferentes maneras de entregar al usuario los formularios para solicitar a través de la WEB sus materiales de investigación (Virología, distribuciones, asignación de espacios)	CIP, La Molina, Lima, Perú Laboratorio Informática CIP, La Molina, Lima, Perú
30-Sept-2003	Análisis de datos de resistencia a PLRV Trabajo práctico en laboratorio *Viaje Ayacucho, Water Amoros	Discutir datos sobre las evaluaciones de resistencia a PLRV y los modelos estadísticos usados. Realizar reacciones de SSR en poblaciones segregantes para resistencia a PLRV . Preparación de muestras y carga de geles electroforeticos Evaluación de Líneas Experimentales con Resistencias a Virosis (PLRV, X , Y)	Sala de visitantes, CIP. La Molina, Lima, Perú Lab. Biología Molecular, CIP. La Molina, Lima, Perú Región Andina del Perú
01-oct-2003	Trabajo práctico en laboratorio Trabajo práctico en invernadero Aplicación de pesticida *Viaje Ayacucho, Water Amoros	Tinción y revelado de geles de SSR Aprender sobre el muestreo de hojas para pruebas de NASH de experimentos de evaluación de infección secundaria Observar como se aplican un pesticida para la eliminación de áfidos en una replica I de los experimentos Evaluación de Líneas Experimentales con Resistencias a Virosis (PLRV, X , Y)	Lab. Biología Molecular, CIP. La Molina, Lima, Perú Invernadero, CIP, La Molina, Lima, Perú Invernadero, CIP, La Molina, Lima, Perú Región Andina del Perú
2-Oct-2003	Trabajo en invernadero y laboratorio Trabajo de laboratorio *Uso de Herramientas de acceso Intranet e Internet Edwin Rojas, Reinhard Simon	Macerar muestras y llenado de membranas para prueba de NASH. Prueba demostrativa de realización de Prueba NASH para PLRV y detección de virus por RT-PCR Practica y uso de la Web del Centro Internacional de la Papa (CIP)	Lab. Virología e invernaderos, CIP, La Molina, Lima, Perú Lab. Virología e invernaderos, CIP, La Molina, Lima, Perú Laboratorio de Informática, CIP, La Molina, Lima, Perú.

* indica actividades especiales para Marcos Uribe

4. Resultados Obtenidos: descripción detallada de los conocimientos adquiridos. Explicar el grado de cumplimiento de los objetivos propuestos, de acuerdo a los resultados obtenidos. Incorporar en este punto fotografías relevantes que contribuyan a describir las actividades realizadas.

1. Adquirir conocimientos teóricos y prácticos para implementar y manejar una crianza de vectores áfidos de PLRV en condiciones controladas de laboratorio.

El virus del enrollamiento de la hoja (PLRV) es un virus persistente y solo se trasmite a través de vectores tales como áfidos (*Myzus persicae*) los cuales tienen que ser mantenidos y criados en jaulas especiales, en condiciones óptimas de temperatura, aireación y humedad. Para cumplir con este objetivo se discutieron las consideraciones teóricas y prácticas que deben primar a la realización de estos ensayos. Si bien todo el grupo en entrenamiento participó de esta actividad quien prestó especial atención fue Don Marcelo Villagra quien inmediatamente después de volver a Osorno está implementando una crianza de vectores áfidos en nuestro programa. Se adjunta un protocolo y discusión sobre el tema desarrollado por Don Marcelo. Este objetivo fue cumplido en un 100%.

2. Adquirir conocimientos teóricos y práctico sobre métodos infestación y evaluación de resistencia a PLRV en plantas de papa, con énfasis en metodología de condiciones controladas en invernadero.

Durante la capacitación se discutieron en detalles los ensayos de evaluación de resistencia a PLRV utilizando plántulas y brotes de tubérculos. Sin embargo, en forma práctica solo se trabajó con plántulas. Se puso especial atención a las condiciones de manejo tanto del material vegetal como los vectores tales como condiciones fisiológicas de las plántulas y/o tubérculos, las condiciones ambientales en invernaderos, la presión de inóculo como número de áfidos infecciosos. En esta actividad participaron el Dr. Boris Sagredo, don Marcelo Villagra y la Srta Annelore Winkler. En esta etapa se discutieron los diseños estadísticos que se utilizan para evaluar resistencia a PLRV en plantas de papa. Este objetivo fue cumplido en un 100%.

3. Adquirir conocimientos teóricos y prácticos para implementar métodos de detección de virus en papa mediante PCR.

Una vez que las plantas son sometidas a una presión de inóculo por áfidos infestados con PLRV estas manifestarán su resistencia genética según los niveles de infestación por virus que presenten después de 7 a 12 días. La resistencia también puede ser estimada por la infección secundaria detectada en una segunda temporada en plantas provenientes de tubérculos de las primeras plantas. La detección de virus en plantas se puede realizar por métodos inmunológicos tipo ELISA, PCR y Hibridización de ácidos nucleicos (NASH). Se discutieron las ventajas y limitaciones de las distintas técnicas. El tiempo que se dedicó a este objetivo fue menor que los dos anteriores. Las actividades desarrolladas fueron más bien demostrativas, sin práctica por parte de las personas en entrenamiento. Por lo tanto este objetivo se cumplió en un 50-60%. Sin embargo, se acordó mantener un canal de comunicación y cooperación entre el laboratorio de virología del Dr. Luis Salazar y nuestro laboratorio de INIA-Remehue, lo que será muy útil cuando comencemos a desarrollar estas nuevas tecnologías en nuestro laboratorio.

4. Adquirir conocimientos teóricos y prácticos para avanzar en la implementación de un sistema eficiente de manejo de información en base de datos en el programa de mejoramiento genético de INIA-Remehue

La persona que estuvo relacionada con este objetivo fue el Sr Marcos Uribe, quien recibió un importante entrenamiento en el área de manejo información y base de datos. Además visitó en terreno diversos ensayos mantenidos por el programa de mejoramiento en La Molina y en Ayacucho donde se están desarrollando evaluaciones. El CIP esta desarrollando softwares de manejo de información especiales para el mejoramiento de papa, los cuales se encuentran en etapas de elaboración avanzada. Este tipo de programa permitirá manejar fácilmente información de ensayos y variedades con variables de rendimiento, incidencia de enfermedades, fertilización, etc. Se acordó mantener una estrecha colaboración y en el futuro inmediato cuando se completen estos programas se verá la forma de incorporarlos a nuestro programa de mejoramiento de INIA-Remehue.

En general los objetivos de la propuesta fueron cumplidos con un alto grado de satisfacción. En estos momentos, basados en los conocimientos teóricos y prácticos recibidos en este entrenamiento, nuestro programa de mejoramiento de INIA-Remehue esta en condiciones de implementar un sistema de evaluación rápida de resistencia a PLRV en plantas de papa y avanzar en la implementación de un sistema de base de datos para desarrollar métodos eficientes de selección y desarrollo de nuevas variedades

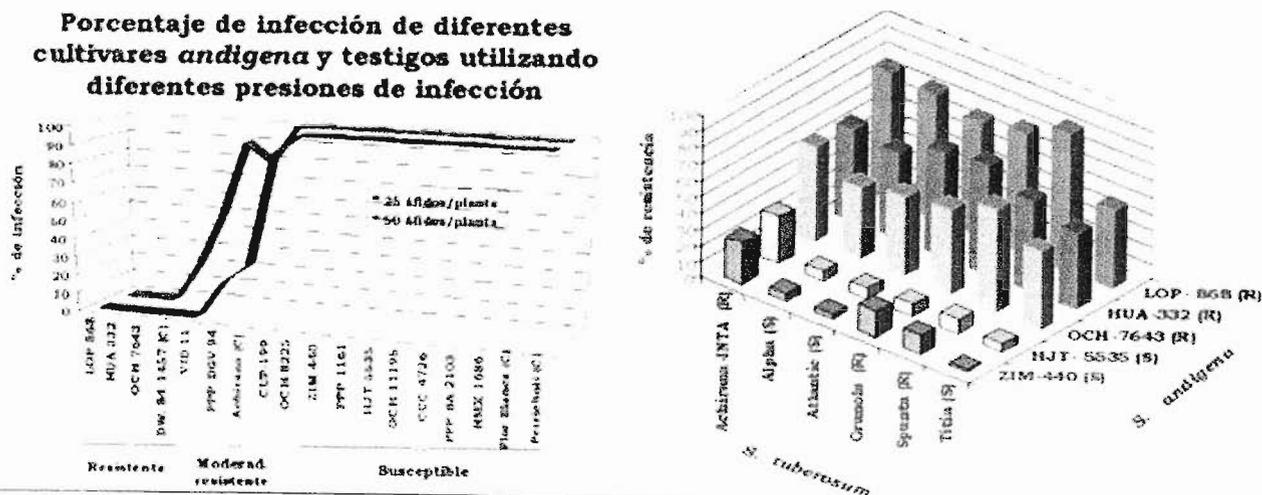


Figura 1. Nuevas fuentes de resistencia a PLRV de *S. andigena*. El gráfico de la izquierda muestra los bajos niveles de infección que muestran los clones resistentes a baja y alta presión de áfidos. El segundo gráfico de la derecha muestra que los altos niveles de transmisión de la resistencia cuando los clones resistentes son cruzados con *S. tuberosum*.

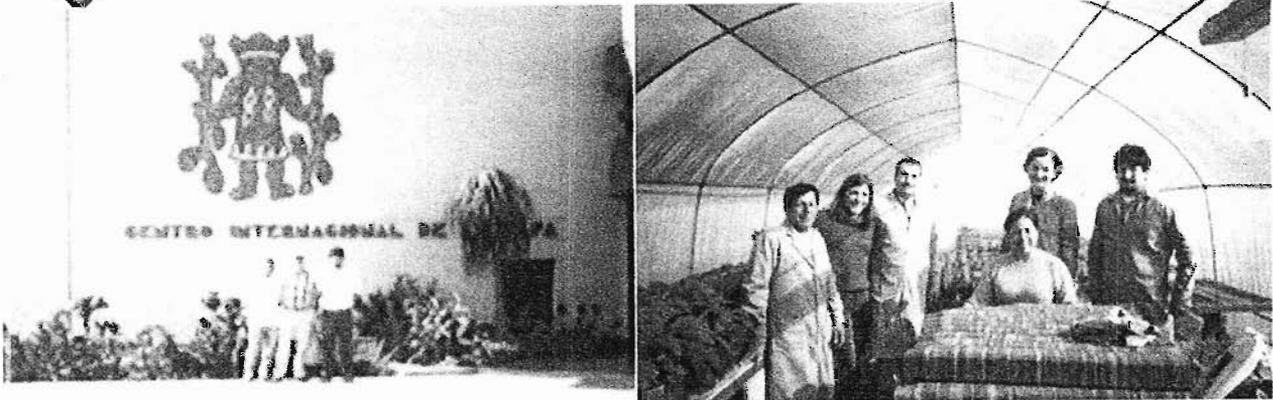


Figura 2. Comienza la capacitación en el CIP. A la derecha es una foto de Marcos Uribe, Marcelo Villagra y el Dr. Boris Sagredo en la entrada al CIP. En la foto de la izquierda están Juan Guacache, Ing. Agrónomo Elisa Mihovilovich, Marcelo Villagra, Martha Huanes, Annelore Winkler y el Dr. Boris Sagredo

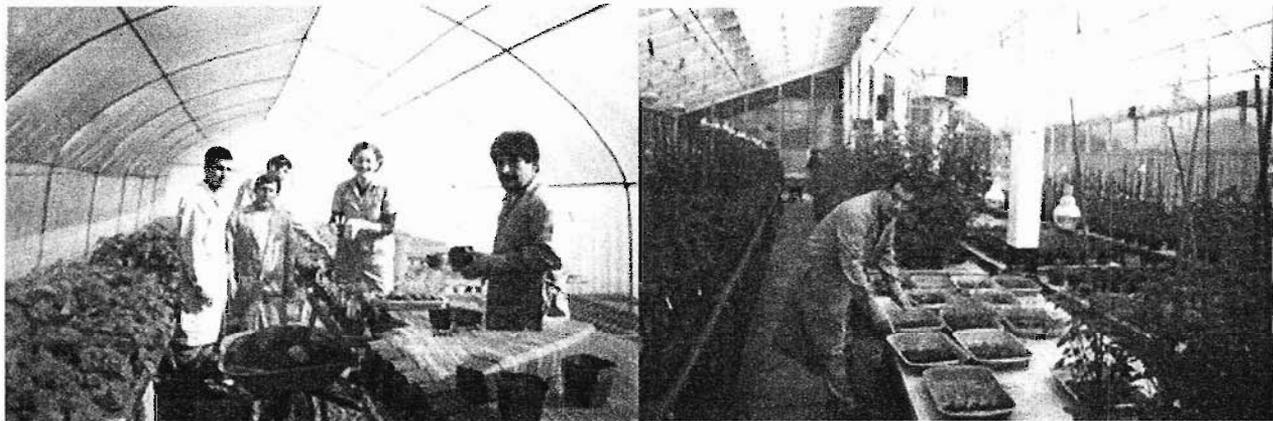


Figura 3. Transplante de plantas y randomización. A la izquierda se muestran las actividades de transplantes para evaluar infección secundaria de PLRV, y la foto de la derecha es don Marcelo Villagra ayudando en randomización de plantas antes de ser sometidas a presión con áfidos infectivos.

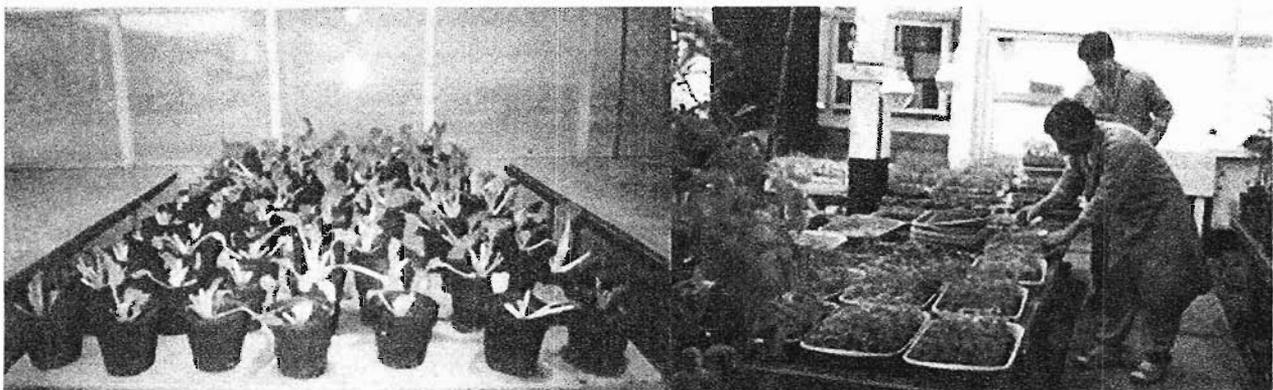


Figura 4. Áfidos son crecidos y mantenidos en plantas de col china. Las hojas de plantas de col china donde han crecido los áfidos son removidas (foto izquierda) y puestas sobre plantas de papas infestadas con PLRV. Luego de varios días, cuando los áfidos comienzan a ser infectivos se inoculan las plantas a ser evaluadas para resistencia a PLRV



Figura 5. Determinando haploidía en papa. En la foto de la izquierda se muestra en primer plano a la Dra Matilde Orillo enseñando la técnica de conteo de cromosomas en raíces de papa. En la foto izquierda se muestran algunos de los utensilios que se requieren para teñir cromosomas.

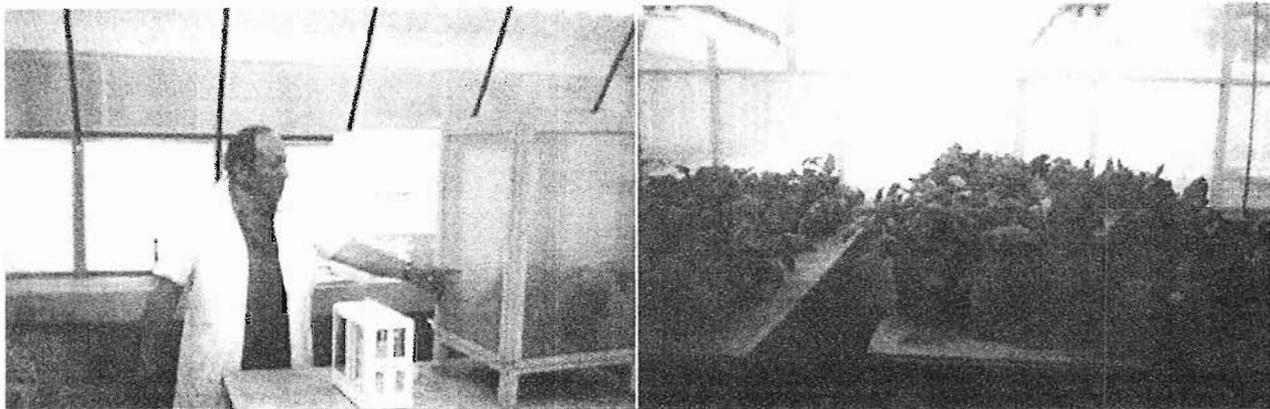


Figura 6. Crianza de áfidos y preparación de inoculo. A la izquierda se muestra al Dr. Carlos Chuquillanqui mostrando un jaula de crianza de áfidos. A la derecha se muestran plantas de papa infectadas con PLRV que se utilizaron para preparar áfidos infectivos.

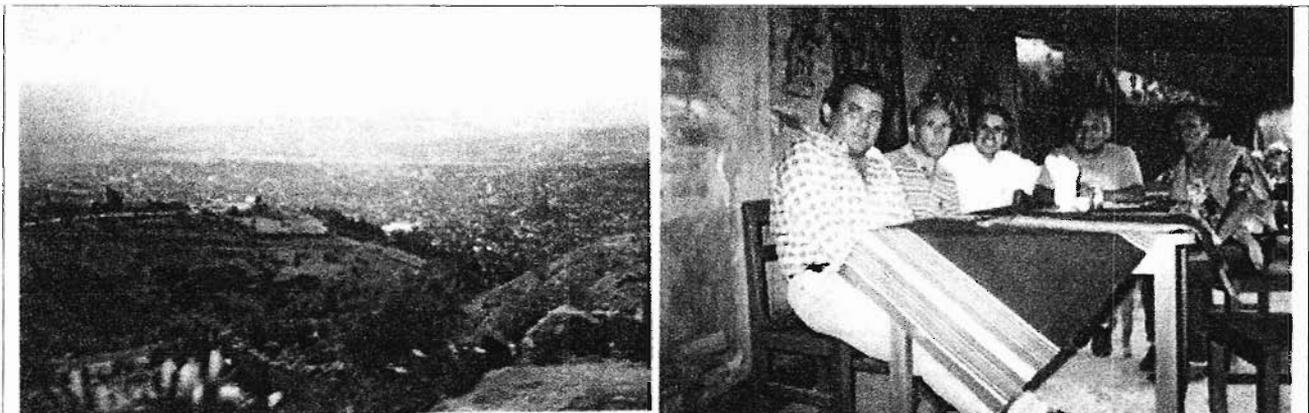


Figura 7. Visita a ensayos en Ayacucho. A la izquierda es una vista del valle de Ayacucho donde el CIP mantiene ensayos de resistencia a virus. En la foto de la derecha el segundo de la izquierda es el Ing. Walter Amoros y a su derecha esta Marcos Uribe, ambos se reunieron con algunos agricultores de la zona

5. Aplicabilidad: explicar la situación actual del rubro en Chile (región), compararla con la tendencias y perspectivas en el país (región) visitado y explicar la posible incorporación de los conocimientos adquiridos, en el corto, mediano o largo plazo, los procesos de adaptación necesarios, las zonas potenciales y los apoyos tanto técnicos como financieros necesarios para hacer posible su incorporación en nuestro país (región).

Actualmente nuestro programa de Mejoramiento Genético de INIA de papa realiza las evaluaciones de resistencia a PLRV a nivel de campo, un proceso lento que requiere varios años de evaluación, y no permite evaluar poblaciones de gran tamaño.

Las metodologías de evaluación rápida de resistencia a PLRV en plántulas y brotes de tubérculo desarrolladas por el CIP permiten evaluar eficientemente grandes poblaciones de clones y/o variedades.

La aplicación de estas metodologías serán inmediatas y permitirán avanzar en la ejecución de las actividades de evaluación de resistencia a PLRV en familias segregantes, lo que representa un paso crítico para alcanzar la meta de desarrollar un método SAMM para selección de genotipos altamente resistentes a PLRV mediante la identificación de MM asociados a genes de resistencia (Proyecto FIA de Biotecnología BIOT-01-A-015).

La implementación de métodos eficientes de selección de genotipos resistentes a PLRV, permitirá realizar tempranamente la selección temprana de genotipos, esto por un lado disminuirá significativamente la cantidad de material a ensayarse directamente contra el patógeno, y por otro, disminuirá ostensiblemente el número de genotipos para las siguientes etapas de evaluación. Esto producirá un ahorro de recursos, tiempo, y en definitiva disminuye el costo de producción de una variedad.

En el largo plazo la liberación oportuna de nuevas variedades resistente aptas para el mercado fresco y de productos procesados disminuirían las pérdidas producidas por el fenómeno degenerativo de la papa, donde las infecciones acumulativas de los virus en el cultivo explican el 40% de dichas pérdidas. Los pequeños agricultores serían los más beneficiados dado que este sector es el más afectado por este fenómeno degenerativo, porque no tienen la capacidad de renovar sus materiales por semilla de buena calidad que usualmente es costosos y difícil de adquirir. Este sector representa el 93% de los 91994 productores del país, con 85563 producciones de papa.

6. Contactos Establecidos: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Institución/Empresa	Persona de Contacto	Cargo/Actividad	Fono/Fax	Dirección	E-mail
Centro Internacional de la Papa (CIP)	Merideth Bonierbale	Líder Departamento de Mejoramiento y Recursos Genéticos	+(511)3496017 +(511)3175333	Apartado 1558, Lima 12, Perú	m.bonierbale@cgiar.org
Centro Internacional de la Papa (CIP)	Walter Amoros	Investigador Asociado Departamento de Mejoramiento y Recursos Genéticos	+(511)3496017 +(511)3175333	Apartado 1558, Lima 12, Perú	w.amoros@cgiar.org
Centro Internacional de la Papa (CIP)	Martha Huanes	Coordinadora Capacitación y Conferencias	+(511)3496017 +(511)3175333	Apartado 1558, Lima 12, Perú	m.huanes@cgiar.org
Centro Internacional de la Papa (CIP)	Giovanna Müller	Investigador asistente Departamento protección de cultivos	+(511)3496017 +(511)3175333	Apartado 1558, Lima 12, Perú	g.muller@cgiar.org
Centro Internacional de la Papa (CIP)	Elisa Mihovilovich	Investigador Asociado Departamento de Mejoramiento y Recursos Genéticos	+(511)3496017 +(511)3175333	Apartado 1558, Lima 12, Perú	e.mihovilovich@cgiar.org
Centro Internacional de la Papa (CIP)	Jorge Benavides R.	Investigador asistente departamento de mejoramiento y recursos genéticos	+(511)3496017 +(511)3175333	Apartado 1558, Lima 12, Perú	j.benavides@cgiar.org
Centro Internacional de la Papa (CIP)	Jasper Buijs	Experto asociado en bioinformática. Departamento de mejoramiento y Recursos genéticos	+(511)3496017 +(511)3175333	Apartado 1558, Lima 12, Perú	j.buijs@cgiar.org
Centro Internacional de la Papa (CIP)	Matilde Orrillo	Citogenetista. Investigador asistente departamento de mejoramiento y recursos genéticos	+(511)3496017 +(511)3175333	Apartado 1558, Lima 12, Perú	m.orrillo@cgiar.org
Centro Internacional de la Papa (CIP)	Thomas Zschocke	Jefe Departamento Capacitación y Conferencias	+(511)3496017 +(511)3175333	Apartado 1558, Lima 12, Perú	t.zschocke@cgiar.org
Centro Internacional de la Papa (CIP)	Griselda Lay	Bibliotecaria CIP	+(511)3496017 +(511)3175333	Apartado 1558, Lima 12, Perú	g.lay@cgiar.org
Centro Internacional de la Papa (CIP)	Carlos Chuquillanqui,	Investigador asistente Departamento protección de cultivos	+(511)3496017 +(511)3175333	Apartado 1558, Lima 12, Perú	c.chuquillanqui@cgiar.org
Centro Internacional de la Papa (CIP)	Marc Ghislain,	Manager - Serv.Unit- Molecular Marker Laboratory	+(511)3496017 +(511)3175333	Apartado 1558, Lima 12, Perú	m.ghislaini@cgiar.org
Centro Internacional de la Papa (CIP)	Rosario Herrera,	Investigador asistente departamento de mejoramiento y recursos genéticos	+(511)3496017 +(511)3175333	Apartado 1558, Lima 12, Perú	r.herrera@cgiar.org
Centro Internacional de la Papa (CIP)	Simon Reinhard	Científico visitante (University of Jena, Germany)	+(511)3496017 +(511)3175333	Apartado 1558, Lima 12, Perú	s.reinhari@cgiar.org

Benavides se discutió la posibilidad de transferir y probar algunos de estos materiales en Chile. Además, se conversó sobre el trabajo que está realizando Jasper Buijs experto asociado en bioinformática del departamento de Mejoramiento y Recursos Genéticos, quien está desarrollando una encuesta sobre el uso de OGM en las zonas productoras del Perú y confeccionando un portal web relevante al uso de papa transgénicas. La percepción y opinión pública que tenga la población sobre los organismos genéticamente modificados (OGM) es un aspecto muy importante que incidirá en las políticas que adopten los gobiernos y por lo tanto definirán el desarrollo de estas nuevas tecnologías. En Chile, si bien existen varios proyectos de desarrollo de OGM, todavía no existen trabajos que aborden sistemáticamente esta área de la percepción e información al público. No obstante en el informe al Presidente de la República la Comisión Nacional para el Desarrollo de la Biotecnología, se indica que este es un aspecto muy importante y se sugieren reforzar esta área. Esta experiencia del CIP, relativa al cultivo de la papa, será muy importante para apoyar esta área en nuestro país.

8. Resultados adicionales: capacidades adquiridas por el grupo o entidad responsable, como por ejemplo, formación de una organización, incorporación (compra) de alguna maquinaria, desarrollo de un proyecto, firma de un convenio, etc.

No se produjeron resultados adicionales a los ya nombrados.

9. Material Recopilado: junto con el informe técnico se debe entregar un set de todo el material recopilado durante la actividad de formación (escrito y audiovisual) ordenado de acuerdo al cuadro que se presenta a continuación (deben señalarse aquí las fotografías incorporadas en el punto 4):

Tipo de Material	Nº Correlativo (si es necesario)	Caracterización (título)
Protocolo	1	Detección de PSTVd usando Probes-RNA marcados con Digoxigenina
Protocolo	2	Técnicas en Virología de Plantas. Fascículo 345
Protocolo	3	Hibridización de Ácidos nucleicos
Protocolo	4	Reacción en cadena de la polimerasa
Capítulo libro	5	Detección de viroides y virus con técnicas de ADN recombinantes
Protocolo	6	Técnica usada en el laboratorio de citogenética del CIP para determinar el número de cromosomas en papa
Artículo	7	Advances in Potato Cryopreservation by vitrification



Apuntes powerpoint	presentación	8	Caracterización genética molecular de altos niveles de resistencia a PLRV en <i>S. tuberosum</i> subsp andigena
Apuntes powerpoint	presentación	9	Evaluación de dos métodos de "tamizado" para probar la resistencia al Virus del enrollamiento de la papa (PLRV) en poblaciones de mejoramiento de papa, <i>S. tuberosum</i>
Video		10	1.5 horas de video con grabaciones de algunas de las actividades realizadas

10. Aspectos Administrativos

10.1. Organización previa a la actividad de formación

a. Conformación del grupo

___ muy dificultosa ___X___ sin problemas ___ algunas dificultades

(Indicar los motivos en caso de dificultades)

b. Apoyo de la Entidad Responsable

__X__ bueno ___ regular ___ malo

(Justificar)

c. Información recibida durante la actividad de formación

__X__ amplia y detallada ___ aceptable ___ deficiente

d. Trámites de viaje (visa, pasajes, otros)

__X__ bueno ___ regular ___ malo

e. Recomendaciones (señalar aquellas recomendaciones que puedan aportar a mejorar los aspectos administrativos antes indicados)

10.2. Organización durante la actividad (indicar con cruces)

Ítem	Bueno	Regular	Malo
Recepción en país o región de destino	X		
Transporte aeropuerto/hotel y viceversa	X		
Reserva en hoteles	X		
Cumplimiento del programa y horarios	X		

En caso de existir un ítem Malo o Regular, señalar los problemas enfrentados durante el desarrollo de la actividad de formación, la forma como fueron abordados y las sugerencias que puedan aportar a mejorar los aspectos organizacionales de las actividades de formación a futuro.

11. Conclusiones Finales

En primer lugar, en función del objetivo general de adquirir los conocimientos teóricos y prácticos para implementar en nuestro Programa de Mejoramiento Genético de Papa de INIA-Remehue un sistema de evaluación rápida de resistencia a PLRV en plantas de papa y avanzar en la implementación de un sistema de base de datos para desarrollar métodos eficientes de selección y desarrollo de nuevas variedades, se puede concluir que la capacitación tanto de un profesional y técnicos del programa ha sido exitosa.

La casi inmediata implementación de esta metodología de evaluación de resistencia a PLRV en INIA-Remehue confirma lo recién dicho. Esto nos permitirá avanzar en la ejecución de las actividades de evaluación de resistencia a PLRV en familias segregantes, lo que representa un paso crítico para alcanzar la meta de desarrollar un método SAMM para selección de genotipos altamente resistentes a PLRV (Proyecto FIA de Biotecnología BIOT-01-A-015).

Respecto al objetivo de adquirir conocimientos teóricos y prácticos para implementar métodos de detección de virus en papa mediante PCR, ya que los conocimientos adquiridos fueron de tipo teórico y demostrativo, no podemos concluir que se cumplió a cabalidad, sin embargo quedaron los contactos de comunicación para avanzar en el desarrollo de este.

La fuerte capacitación del Sr Marcos Uribe en el área informática nos permite decir que el objetivo de adquirir conocimientos teóricos y prácticos para avanzar en la implementación de un sistema de manejo de datos en nuestro programa de mejoramiento genético de INIA-Remehue, se ha cumplido. Nuestra meta es que una vez que se desarrollen y adquieran los softwares, probablemente en el año 2004, estos sistemas de manejo de información se incorporaran rápidamente en nuestro programa.

El CIP posee es una gran institución que posee un valiosísimo staff de científicos, profesionales y técnicos, que junto a su gran infraestructura y experiencia en capacitación aseguraron que las metas de nuestro entrenamiento se cumplieran con un alto grado de satisfacción.

La capacitación de un profesional y técnicos que tienen responsabilidades directas en el programa de mejoramiento genético de papa de INIA, asegura que los conocimientos y metodologías adquiridas tendrán una aplicación práctica inmediata. Lo que acelerará el desarrollo de nuevas variedades de papa resistentes al virus PLRV, lo que en el mediano y largo plazo beneficiará a los agricultores.

Se agradece al FIA por apoyar la realización de este proyecto-capacitación, los participantes siempre nos sentimos apoyados y muy bien asistidos por los supervisores del proyecto.

La Institución responsable INIA-Remehue, esta muy complacida por el apoyo que el FIA brinda al Programa de Mejoramiento Genético de Papa de Chile.

12. Conclusiones Individuales: anexar las conclusiones individuales de cada uno de los participantes de la actividad de formación, incluyendo el nivel de satisfacción de los objetivos personales (no más de 1 página y media por participante).

Fecha: 19 Dic 2003

Nombre y Firma coordinador de la ejecución: Boris Sigurd Díaz

AÑO 2003

Conclusión de la Gira Técnica

El objetivo general de esta gira fue adquirir conocimientos teórico y prácticos necesarios para implementar en nuestro programa de mejoramiento de INIA Remehue un sistema de evaluación rápida de resistencia a PLRV en plantas de papa.

Creo que este objetivo alcanzó el grado esperado. El equipo de profesionales del Centro Internacional de la Papa desarrollaron un programa de actividades que nos permitió adiestrarnos en las áreas relevantes.

Con respecto a los objetivos específicos 2 y 3 de las actividades de capacitación, vale decir:

- “Adquirir conocimientos teóricos y prácticos sobre métodos de infestación y evaluación de resistencia a PLRV en plantas de papa, con énfasis en metodología de condiciones controladas en invernadero”. En este sentido gracias a la duración del curso se pudo abarcar todas las etapas que este objetivo incluía, se trabajó exclusivamente en invernadero. En lo personal pienso que se cumplió en un 100% el objetivo.
- “Adquirir conocimientos teóricos y prácticos para implementar métodos de detección de virus en papa mediante PCR”. Lamentablemente este objetivo sólo se cumplió en un 50%, ya que sólo por lo ajustado de la agenda se pudo presenciar el desarrollo de la técnica y no se pudo realizar la práctica de esta técnica.

Finalmente agradezco a ambas Instituciones, FIA e INIA por darme la posibilidad de perfeccionarme en el área de mi competencia.

Atte.,

Annelore Winkler
Ayudante de Investigación

CONCLUSION INDIVIDUAL DE LA GIRA CIP – PERU.

Respecto del **objetivo general** de la actividad de capacitación, es decir, adquirir los conocimientos teóricos y prácticos necesarios para implementar en el programa de mejoramiento INIA-Remehue un sistema de evaluación rápida de resistencia a PLRV en plantas de papa, creo se cumplió con las expectativas que se formularon al inicio de la misma. El programa desarrollado por el Centro Internacional de la Papa (CIP) para el adiestramiento en las distintas técnicas y etapas para el cumplimiento del objetivo general fue satisfactorio y conducente al mismo. El conocimiento y desarrollo de técnicas orientadas a poder aplicar en Chile un método de selección para resistencia a virus del enrollamiento de la papa fue adquirido.

Objetivos específicos:

En relación a los objetivos 1 y 2 planteados en la actividad de capacitación, es decir, “adquirir conocimientos teóricos y prácticos para implementar y manejar una crianza de áfidos en condiciones controladas de laboratorio” y “ adquirir conocimientos teóricos y prácticos sobre métodos de infestación y evaluación de resistencia a PLRV en plantas de papa”, debo indicar que las actividades realizadas fueron las adecuadas para cumplir con los objetivos planteados, sin embargo, creo que en el programa faltó una mayor profundización y dedicación al tema de crianza artificial del agente vector **Myzus persicae**. Si bien es cierto, trabajamos en actividades tales como: transplante de plantas infestadas con PLRV, inoculación de poblaciones con el PLRV (áfidos infestados), determinación del número de insectos por planta (población), aplicación de pesticidas, no se pudo establecer con claridad una metodología estándar de multiplicación del agente vector, formándome mi propio marco general del mismo en base a lo observado y en conversación con otros Investigadores del CIP que también trabajan en la crianza de áfidos como el virólogo de esa Institución. Sin perjuicio de lo anterior, creo que los objetivos específicos para esta gira fueron cumplidos y estamos en condición de poder replicarlos en nuestro Centro Regional de Investigación. Se hace recomendable una mayor profundización sobre este tema si en el futuro nos encontramos con variables no consideradas en el programa elaborado.

Para finalizar es necesario expresar que la iniciativa de que en la gira de capacitación participaran profesionales de distintos estamentos y áreas de especialización fue una excelente idea, pues son justamente estas personas las que deben poner en marcha las actividades para desarrollar para cumplir con el objetivo final. La participación en conjunto del programa elaborado por el CIP para tal efecto nos permitió no solo aprender las técnicas que cada uno deberá aplicar sino que poder tener una visión global de lo que involucra el programa de mejoramiento genético y la importancia específica de cada una de las actividades que necesariamente se deben realizar.

Finalmente, agradezco a las personas e Instituciones correspondientes , la posibilidad de perfeccionamiento en un área tan interesante y motivante.

Marcelo Villagra Barrientos
Prof. De Biología y Cs.

Conclusión de la Gira Técnica en el CIP

El objetivo general de esta gira fue adquirir conocimientos teóricos y prácticos necesarios para implementar en nuestro programa de mejoramiento de INIA Remehue un sistema de evaluación rápida de resistencia a PLRV en plantas de papa y avanzar en la implementación de un sistema de base de datos para desarrollar métodos eficientes de selección y desarrollo de nuevas variedades

Este objetivo general alcanzó un alto cumplimiento, según lo planificado. En mi caso recibí una fuerte capacitación en el tema de manejo de información y bases de datos relacionados con el objetivo específico: adquirir conocimientos teóricos y prácticos para avanzar en la implementación de un sistema eficiente de manejo de información en base de datos en el programa de mejoramiento genético de INIA-Remehue.

Respecto a este objetivo debo decir que me permitió conocer los avances que esta desarrollando el CIP en el desarrollo de bases de datos y softwares en el área. Recibí un adiestramiento como usuario de estos programas, pero además mi larga experiencia como Técnico de Campo en el programa de mejoramiento de INIA-Remehue sirvió para que ellos consideraran algunas de mis sugerencias. Se estableció una rica relación con los profesionales que me capacitaron lo cual permitirá mantener una comunicación fluida que ayudará a resolver cualquier duda cuando comencemos a desarrollar nuestros propios sistemas de información y bases de datos basados en sus softwares.

Agradezco enormemente al FIA y al INIA por darme la oportunidad de perfeccionarme en esta área.

Atentamente,

Marcos Uribe Gallegos
Técnico de Campo
Programa de Mejoramiento Genético de Papa
INIA-Remehue

Curso: "Desarrollando Métodos Eficientes de Selección para Resistencia a Virus en Mejoramiento Genético de Papa"

Apuntes desarrollados por **Annelore Winkler**

Capacitación en Virología

Encargada: Giovanna Müller
Laboratorio de Virología Molecular
Centro Internacional de la Papa

Detección de PSTVd usando Probes-RNA marcados con Digoxigenina

Aún cuando las técnicas inmunológicas, p.e. ELISA, han demostrado alta sensibilidad para el diagnóstico de virus en las plantas, no son aplicables a la detección de viroides o de ciertos virus cuya entidad infectiva ocurre naturalmente como ácido nucleico desprovisto de la cubierta proteínica. Asimismo, la dificultad de producir antisueros para algunos virus, ya sea por la inestabilidad de sus partículas, por su íntima asociación con ciertos tejidos u orgánulos del huésped, o por su baja concentración, limitan el valor de la serología en esos casos.

Recientemente, los avances logrados en la investigación de los ácidos nucleicos han mejorado las técnicas de hibridación de moléculas complementarias de ADN-ADN y ARN-ADN. La capacidad de hibridación de los ácidos nucleicos complementarios es la base para desarrollar métodos de diagnóstico de viroides y virus. Para facilitar la aplicación del método, el ácido nucleico que debe detectarse se fija a un soporte sólido (filtro o membrana) para que la sonda ("probe") en solución pueda hibridarse sobre ese ácido nucleico ya fijado en la membrana. Por esa razón la técnica se conoce también como gota adsorbida ('dot blot'). Las etapas de esta técnica se describen a continuación:

Paso 1: Extracción de las muestras

- Moler el tejido vegetal en un bolsa para muestras conteniendo 2 volúmenes de buffer de extracción 5X SSC (1mL de buffer : 0.5 g de muestra).
- Transferir 0.5 mL del extracto a un tubo eppendorf y agregar 1 volumen de la mezcla fenol cloroformo en proporción 1:1 (v/v), tapar el tubo y agitar vigorosamente o en vortex por 1 minuto.
- Centrifugar los tubos por 5 minutos a 12,000 rpm para separar el contenido en dos fases una acuosa (superior) y otra de solvente (inferior).

Paso 2: Fijación de las muestras

- Tomar con un pipeta automática 3 a 5 μ L de muestra de la fase acuosa (superior) y colocarla sobre la membrana de nylon. Dejar secar bien a temperatura ambiente.

Hay que tomar en cuenta que las membranas conteniendo las muestras secas pueden ser guardadas por varias semanas antes de ser guardadas.

Paso 3: Hibridación

- Fijar las membranas conteniendo las muestras secas en un horno con sistema de vacío por 2 hrs. a 80°C ó en un UV crosslinker.

En este paso podemos usar el transiluminador UV, pero se deberá determinar el tiempo óptimo de exposición al UV.

- Colocar la membrana fijada dentro de una bolsa para hibridación y sellarla completamente.
- Cortar una esquina superior para poder introducir el buffer de hibridación y la sonda.
- Agregar el volumen adecuado de buffer de hibridación (aprox. 9.6 mL de buffer para una membrana de 8 x 12 cm) precalentado a 55°C, embeber bien la membrana y agregar la sonda en cantidad adecuada (aprox 2 µL de sonda por mililitro de buffer).
- Homogenizar bien evitando derramar el buffer. Eliminar las burbujas y sellar la esquina.
- Llevar a baño María a 55°C durante toda la noche.

Paso 4: Lavados

- Al día siguiente, lavar la membrana por 5 minutos a T^a ambiente en 200 mL de bufer de lavado 1.
- Luego lavar por 15 minutos a T^a ambiente en 200 mL de buffer de lavado 1 conteniendo 1 µg/mL de Rnasa A.
- Luego de eso , lavar las membranas por dos veces, 15 minutos cada vez en 200 mL de buffer de lavado 2 precalentado a 65°C.
- Finalmente, enjuagar la membrana en 100 mL de ácido maléico 1X (100mM ácido maléico, pH 7,5; 150 mM NaCl) por 1 minuto a T^a ambiente.

Paso 5: Bloqueo

- Transferir la membrana a un recipiente conteniendo 100-200 mL de solución de bloqueo 1X (solución comercial) y bloquear la membrana durante 1 a 2 horas a T^a ambiente en constante agitación suave.

Paso 6: Conjugado

- Transcurrido el tiempo de bloqueo, añadir a la misma solución el conjugado (a la dilución indicada por el proveedor, en nuestro caso fue 1:10.000). Incubar la membrana por 30 minutos a T^a ambiente en agitación suave y constante.
- Luego lavar 2 veces por 15 minutos cada vez con ácido maleico.

El conjugado que se uso puede servir hasta 2 semanas.

Paso 7: Sustrato

- Transcurrido el tiempo, lavar la membrana en buffer de detección 1X durante 5 minutos a T^a ambiente.
- Preparar el sustrato CSPD en buffer de detección según proveedor. (en nuestro caso del Lab Roche)
- Escurrir la membrana y colocarla con las muestras hacia arriba sobre una hoja de acetato, esparcir el sustrato sobre la membrana usando una pipeta, (unas gotitas)
- Colocar sobre la membrana otra hoja de acetato. Eliminar burbujas y el exceso de sustrato y sellar los cuatro lados de la membrana.

Paso 8: Detección

- Colocar la membrana dentro de un cassette de revelado (Paquetito que se elabora con cartón negro y papel aluminio, para evitar la luz) y dentro de un

cuarto oscuro colocar sobre la membrana una película Kodak. Cerrar el cassette y dejar expuesta la membrana por 1 a 2 horas a T^a ambiente.

- Revelar usando solución de revelado y fijador.

Amplificación y Detección de Virus/Viroide usando PCR

La transcripción reversa de las preparaciones de RNA se realiza usando el kit de Perkin-Elmer GeneAmp RNA PCR; se utiliza como primers una mezcla de hexanucleotidos (pdN6) que se unen al azar con el RNA, siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. Los productos Cdna son luego amplificados usando los primers específicos tanto para PLRV como para PSTVd.

Primers usados

- Para PSTVd: primer RAO-2: gcggatCCGGTGGAAACAACACTGAAGC
primer RAO-33: gccggtACCAGTTCGCTCCAGGTTTCCCC
- Para PLRV : primer LR 210: tagcatGCCAGTGGTTRTGGTC
Primer LR212 : gcctcGAGTCTACCTATTTGG

La amplificación PCR es llevada a cabo en un termociclador de Perkin Elmer 480 en 35-40 ciclos de 94°C 1 min., 55°C 2 min., 72°C 1 min. Finalmente los productos de PCR son analizados en geles de acrilamida al 5% y teñidos con una solución de Bromuro de Etidio al 0.5%.

Paso 1: Extracción del RNA

- Macerar 0.5 g de tejido con 1 mL de Buffer de Maceración en una bolsa plástica.
- Transferir 0.5 mL de la savia a un tubo Eppendorf estéril.
- Incubar por 15 minutos a T^a ambiente
- Agregar 200 µL de fenol y 200 µL de cloroformo, agitar suavemente.
- Centrifugar 5 min a 12.000 rpm, en una microcentrífuga
- Transferir la fase acuosa (superior) a otro tubo Eppendorf estéril.
- Agregar 50 µL de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 1 mL de etanol absoluto. Agitar suavemente.
- Dejar a -20°C toda la noche.
- Centrifugar 15 min a 12.000 rpm (en microcentrífuga), descartar el etanol.
- Secar el pellet, resuspender en 50 µL de H₂O estéril y leer en el espectofotómetro.
- Almacenar a -20°C, hasta su utilización.

Paso 2: Transcripción Reversa

Mezclar lo siguiente sobre hielo:

4 µL agua desionizada, destilada y autoclavada

1 µL primer específico

5 µL muestra de RNA (Calcular cuánto para que en 5 µL se tenga un µg)

10 µL

Calentar 5 min a 65°C, enfriar en hielo 2 min, agregar 10 µL mix PCR, esto es:

4 µL 25mM MgCl₂

1 µL Rnasin (sin maleasas, se compra)

2 µL 10X PCR buffer

2 µL 10mM dNTP'

1 µL Transcriptasa reversa (5U)

Incubar 10 min a T^a ambiente, luego transferir al termociclador y correr el programa:
42°C, 45 min
99°C, 5 min.
5°C, 5 min.

Paso 3: Amplificación

Mezclar lo siguiente sobre hielo:

15.875 µL agua
2 µL 10X PCR buffer
1 µL 25mM MgCl₂
0.5 "upstream" oligonucleotide primer a 20pMoles/µL
0.5 "downstream" oligonucleotide primer a 20pMoles/µL
5 µL cDNA
0.125 µL Taq polymerasa (5U/µL)
25 µL

Mezclar suavemente y agregar 2 gotas de aceite mineral, esto es:

MIX PCR + MIX TR + ACEITE MINERAL

Colocar los tubos en el termociclador Perkin Elmer y correr el programa:

1 min a 94°C Denaturación
2 min a 55°C Apareamiento
1 min a 72°C Extensión
5 min a 72°C Ciclo final (opcional)

Al terminar los 35-40 ciclos el termociclador automáticamente se ajusta a 4°C.

Paso 4: Análisis por Electroforesis

Preparación de geles de acrilamida al 5% para la visualización de productos PCR:

Acrylamida:Bisacrylamida (29:1) 30%	8.4	mL
10X TBE	5	mL
50% Glicerol	5	mL
Agua	31	mL
Temed (Agitar antes de usar)	60	µL
10% Persulfato de Amonio(Agitar antes de usar)	450	µL

Preparacion de acrilamida:bisacrilamida (29:1) 30%

Acrilamida 29 gr.
Bis-acrilamida 1 gr.
Completar hasta 100 mL.

Contactos adquiridos a propósito de curso de perfeccionamiento

- Giovanna Müller, Bióloga, Investigador Asistente, Departamento de Protección de Cultivos. G.muller@cgiar.org
- Elisa Mihovilovich, Bióloga, Investigador Asistente, Departamento de Protección de Cultivos. E.mihovilovich@cgiar.org

- Cecilia Inouye, Investigador Asistente. Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Departamento de Producción de Cultivos. c.inouye@cgiar.org
- William Roca, Investigador

PROTOCOLO DE CRIANZA DE Myzus persicae.

Marcelo Villagra B
Prof. De Biología y Cs.

A continuación se describe en forma resumida la metodología de crianza de áfidos, utilizada en el Centro Internacional de la Papa (CIP) como agente vector del virus de enrollamiento de la Papa (PLRV). El siguiente informe esta basado en la visita realizada al CIP entre los días 22 de Septiembre y el 2 de Octubre del presente año.

Objetivo:

El objetivo de establecer la crianza artificial de Myzus persicae es obtener una población del áfido suficiente para establecer los ensayos conducentes a determinar resistencia de algunas variedades de papa al virus del enrollamiento (PLRV), utilizando a M. persicae como agente vector.

METODOLOGÍA

Se procede a coleccionar de campo o invernaderos individuos a criar artificialmente, asegurándose que sea la especie que deseada a multiplicar. Una forma de obtenerlos es coleccionar hojas infectadas con áfidos, es necesario eliminar otras especies presentes así como también los estados inmaduros que estén parasitados.

Una vez obtenidos los individuos que pasarán a formar parte de la colonia formadora, éstos se depositarán sobre plantas de col-china (Brassica pekinensis) que tengan unos 40 días aproximados de siembra, o sea, de unos 30 centímetros de altura. (ver Fig. 1)

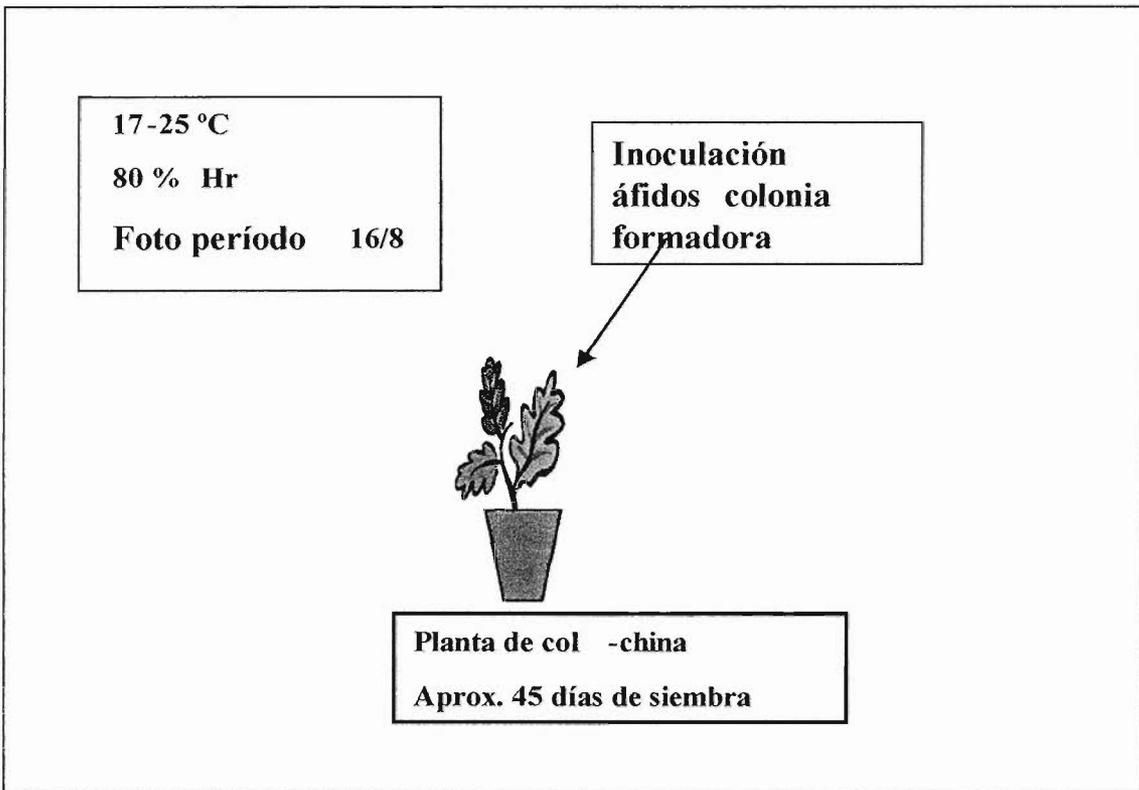


Fig. 1 Diagrama de crianza de áfidos.

La multiplicación se realizará bajo condiciones controladas de temperatura (entre 17 y 25 °C) siendo la temperatura óptima 22 °C, Humedad relativa (sobre 70%) con un óptimo de 80% y con un Foto período de 16 / 8.

Los áfidos obtenidos de la multiplicación sobre col-china (2° generación)) estarán libre de virus que potencialmente portarían sus progenitores, según lo descrito en la literatura, condición que es esencial para que posteriormente posibilite que ellos adquieran el virus del enrollamiento (PLRV) y cumplan su rol de vector.

Bajo éstas condiciones aproximadamente entre 7 a 10 días la colonia formadora dará origen a una nueva generación de un número variable de individuos, se debe repetir el procedimiento anteriormente descrito de multiplicación hasta tener la población requerida para los ensayos deseados.

Una vez obtenida la población de áfidos requeridos para el establecimiento del ensayo , se procederá a cortar las hojas de col-china con presencia del insecto (ver foto 1) en un número que asegure la cantidad deseada y se depositarán con mucho cuidado sobre plantas de Solanum sp. que tenga el inóculo del virus para que sea adquirido por los áfidos al momento de alimentarse de ellos, para asegurar esta condición los insectos se dejarán alrededor de doce (12) días.

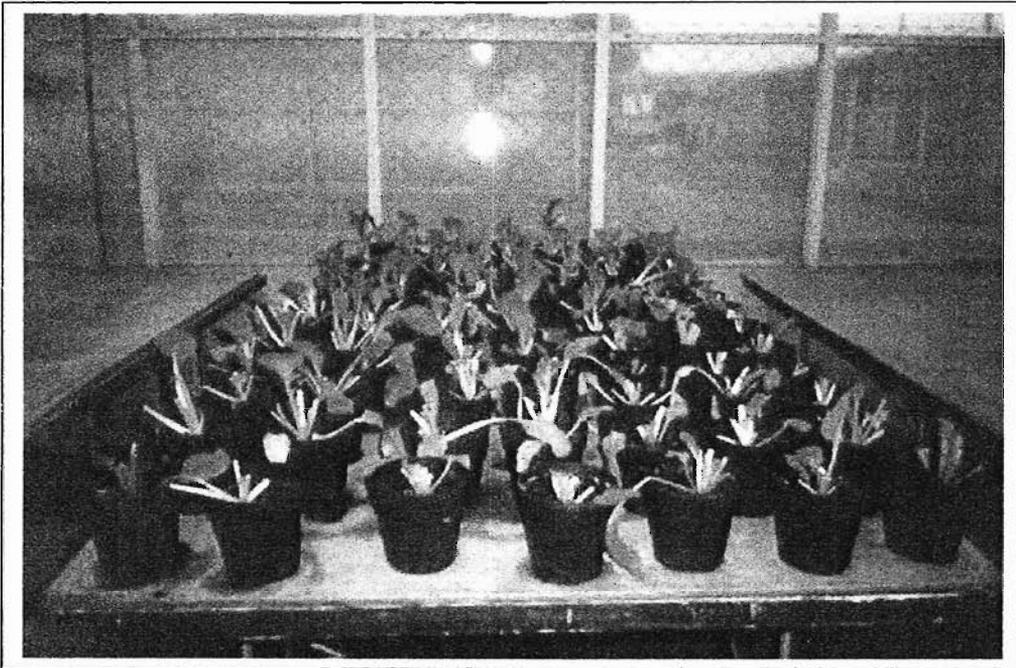


Foto N° 1 Plantas de col-china con hojas cortadas.

Transcurrido este período de tiempo los áfidos serán inoculados a las plantas en tratamiento mediante la técnica del “ sacudido, que consiste en agitar con movimientos cortos y precisos las hojas de papa en donde los insectos adquirieron el inóculo, sobre las plantas a tratar . El número de insectos portadores del virus del enrollamiento a inocular por planta a tratar no será mayor a 50 individuos con un rango entre 30 y 50 insectos por planta. Los áfidos permanecerán siete días sobre las plantas antes de ser eliminados con un insecticida (Tamaron 600 SL), especial cuidado se deberá tener en observar la sintomatología de daño sobre las plantas tratadas, si en un número menor de días se observan daños evidentes (ejemplo cinco días) se procederá a la eliminación antes del tiempo indicado anteriormente.

Controversia en metodología de inoculación.

Si bien en los párrafos anteriores se describe el método del “sacudido” como método eficaz de inoculación a las plantas a tratar, existe otro método sugerido por un Investigador del Centro Internacional de la Papa, el Dr. Carlos Chuquillanqui, quién indica que esta inoculación debe ser manual e individual, utilizando para ello un pincel fino N° 0 de pelo de camello, con el cual se tomarán los áfidos y se depositarán sobre las plantas a tratar. Lo indicado por el Investigador Chuquillanqui se fundamenta en que la acción de sacudir las hojas en donde están los insectos les puede provocar un daño serio en la estructura de su aparato bucal dado la condición del insecto que al estar alimentándose, se encuentra con éste en el interior de la planta, por lo que una acción mecánica de este tipo necesariamente provocará un daño en esta estructura, la que posteriormente se encontrará inutilizada para que el insecto se alimente de la planta hospedero y de esa manera transmita el virus del enrollamiento, situación que es deseada o esperada.

Comentarios.

Respecto de lo señalado en el párrafo anterior, es necesario indicar, que si bien lo planteado por el Investigador Chuquillanqui tiene una base que potencialmente sea efectiva, no es menos cierto que por un análisis de probabilidad es prácticamente imposible que todos los individuos se encuentren alimentándose simultáneamente al momento de practicar el método del “sacudido”, razón por la cual, necesariamente y aunque ocurra algún daño en el aparato bucal del insecto, no todos ellos sufrirán tal daño, por lo tanto, siempre existirán insectos sanos que si cumplan su función de vector al alimentarse normalmente. Creo importante además indicar que la metodología del “sacudido” ha probado ser un método eficiente dado los resultados de infestación obtenidos en las unidades experimentales del CIP.

Detección de PSTVd usando Probes-RNA marcados con Digoxigenina.

1. Extracción de las muestras

- Moler el tejido vegetal en una bolsa para muestras conteniendo 2 vol. de buffer de extracción 5X SSC (1 ml de buffer : 0.5 g. de muestra).
- Transferir 0.5 ml del extracto a un tubo eppendorf y agregar 1 volumen de la mezcla fenol cloroformo en proporción 1:1 (v/v), tapar el tubo y agitar vigorosamente o en vortex por 1 minuto.
- Centrifugar los tubos por 5 minutos a 12,000 rpm para separar el contenido en dos fases una acuosa (superior) y otra de solvente (inferior).

2. Colocación de las muestras

- Tomar con un pipetor 3- 5µl de muestra de la fase acuosa (superior) y colocarla sobre la membrana de nylon. Dejar secar bien a temperatura ambiente.

Nota: La membrana conteniendo las muestras secas puede ser guardada por varias semanas antes de ser usada.

3. Hibridación

- Fijar las membranas conteniendo las muestras secas en un horno con sistema de vacío por 2 hrs a 80°C ó en un UV-crosslinker.

Nota: También se puede fijar empleando un transiluminador-UV, pero se deberá determinar el tiempo óptimo de exposición al UV.

- Colocar la membrana fijada dentro de una bolsa para hibridación y sellarla completamente.
- Cortar una esquina superior para poder introducir el buffer de hibridación y la sonda.
- Agregar el volumen adecuado de buffer de hibridación (aproximadamente 9.6 ml de buffer para una membrana de 8 x 12 cm) precalentado a 55°C, embeber bien la membrana y agregar la sonda en cantidad adecuada (aproximadamente 2µl de sonda por mililitro de buffer).
- Homogenizar bien evitando derramar el buffer. Eliminar las burbujas y sellar la esquina.
- Llevar a baño María a 55°C durante toda la noche.

4. Lavados

- Al siguiente día, lavar la membrana por 5 minutos a temperatura ambiente en 200 ml de buffer de lavado #1.
- Luego lavar por 15 minutos a temperatura ambiente en 200 ml de buffer de lavado #1 conteniendo 1µg/ml de RNasa A.
- Seguido, lavar las membranas por dos veces, 15 minutos cada vez en 200 ml de buffer de lavado #2 precalentado a 65°C.

Fasciculo 345

Preparación de Sondas con ³²P Mediante el Sistema de Transcripción

Esta técnica de detección de PSTVd está basada en la hibridación de una molécula altamente radiactiva de RNA complementario al PSTVd, con el PSTVd presente en la muestra previamente fijada en una membrana de nitrocelulosa. El híbrido resultante es detectado mediante una autoradiografía.

1. Marcaje (RNA-transcription)

El sistema de transcripción es un proceso mediante el cual el mensaje genético contenido en una molécula de DNA es transcrito en forma de RNA. Este método está limitado a secuencias clonadas dentro de vectores específicos útiles para este fin.

La transcripción requiere de la presencia de un promotor (por ejemplo, SP6 ó T7) reconocido por la RNA polimerasa correspondiente, y la secuencia de cDNA tiene que estar ubicada luego del promotor.

Para asegurar la síntesis de únicamente la secuencia deseada, el plásmido es linearizado inmediatamente después de la secuencia clonada, de este modo, la transcripción empieza a continuación del promotor, sigue a lo largo de la molécula clonada y se interrumpe en el punto de linearización.

Si en la mezcla uno de los nucleótidos se encuentra en forma radiactiva o marcada, éste será incluido en la síntesis de la nueva molécula de RNA. La degradación del plásmido utilizado como molde por acción de una DNasa permite obtener el RNA marcado en forma pura. Para el marcaje se utiliza el "Riboprobe Gemini System II" (Promega) y nucleótido radiactivo "Uridine-5'-triphosphate" (³²P, actividad específica: 650 Ci/ mmol, concentración: 10 mCi/ml).

Advertencia: el desarrollo del método pide la utilización de material radiactivo. Usar guantes en todos los pasos y tener el cuidado necesario para un manejo seguro. El material radiactivo tiene que ser eliminado en recipientes apropiados y almacenados siguiendo las indicaciones de la institución responsable de la seguridad nuclear. El tiempo de vida media del ³²P es de 14 días; en consecuencia, el tiempo mínimo de almacenamiento para que la radiactividad sea nula es de aproximadamente 4 a 5 meses.

Mezclar en un tubo Eppendorf a temperatura ambiente en el mismo orden lo siguiente:

5X "transcription buffer"	4 ul
DTT 100 mM	2 ul
RNasin (Progena)	1 ul
GTP 10 mM	1 ul
ATP 10 mM	1 ul
CTP 10 mM	1 ul
α^{32} P-UTP 10 mCi/ml (70 uCi)	7 ul
RNA polymerase (SP6 ó T7, según el promotor contenido en el plásmido, 15-20 unidades/ μ l)	1 ul
Plásmido linearizado (=1ug)	2 ul

Mezclar bien y centrifugar brevemente. Incubar a 38°C durante 120 minutos en baño maría. Agregar 1 ul RQ1 DNasa (1 unidad/ul) e incubar a 37°C durante 20 minutos. Luego adicionar 179 ul agua bidestilada (ddH₂O) y mezclar.

Agregar 100 ul de fenol saturado y 100 ul de cloroformo. Mezclar en agitador de tubos (vórtex) y centrifugar durante 2 ó 5 minutos.

Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf y agregar 200 ul de cloroformo. Mezclar en agitador de tubos (vórtex) y centrifugar durante 2 ó 5 minutos.

Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf y agregar 20 ul de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 550 ul de etanol frío.

Mezclar y poner a -70°C por 30 minutos o más. Luego descongelar 5 minutos y centrifugar durante 15 minutos a 14 000 rpm, aproximadamente. Eliminar el sobrenadante (chequear a 10 cm de distancia; el sobrenadante debe medir 0,5 mR; el pellet de 1 a 1,5 mR a 10X) y voltear el tubo Eppendorf para secar el pellet.

Resuspender el pellet en 100 ul de T₁₀E₁ con 1% de mercaptoetanol y mezclar bien. Guardar a -70°C hasta su utilización.

2. Medición de la incorporación

Cortar papel filtro 3MM Whatman en rectángulos de 2 por 0.5 cm. Colocar 1 ul de RNA marcado en el centro del papel y dejar secar completamente.

Lavar el papel filtro como sigue:

- 2 veces durante 5 minutos en TCA al 5%
- 1 vez durante 5 minutos en etanol al 70%
- 1 vez durante 5 minutos en etanol absoluto

Dejar secar completamente. Colocar el papel filtro dentro de la tapa de plomo utilizada para el transporte del nucleótido radiactivo. Colocar el contador Geiger sobre la tapa y medir la radiactividad como se muestra en el cuadro al final de la página 5.

3. Hibridación

Poner la membrana en una bolsa plástica específica para este fin, sellar la bolsa y cortar una esquina. Para una membrana de 12 x 16 cm, poner 9.6 ml de solución amortiguadora de hibridación en la bolsa, cerrar e incubar en baño maría a 55°C durante 10 minutos.

Solución amortiguadora de hibridación

Solución stock	x 40 ml	Conc. final
Formamida desionizada	20 ml	50%
Cacodilato de sodio 200 mM	5 ml	25 mM
SDS al 20%	0,25 ml	0,125 %

Completar con H₂O hasta el volumen final

Desnaturalizar el "calf-thymus DNA" (stock: 6 mg/ml) calentándolo a 100 °C durante 5 minutos: colocarlo inmediatamente sobre hielo.

Agregar 1 ml de "calf-thymus DNA" en la bolsa y mezclar bien. Incubar a 55°C durante 10 minutos.

Agregar 2,4 ml de sulfato de dextran (previamente calentado a 55°C, stock al 50%) e incubar a 55°C durante 10 minutos más.

Agregar la cantidad adecuada de sonda (calculada como ya se indicó) para obtener una concentración final de 400 000 CPM/ml de solución amortiguadora de hibridación (por ejemplo: 9,6 + 1 + 2,4 = 13 ml).

Mezclar bien los componentes, sellar la bolsa plástica evitando la formación de burbujas de aire. Incubar, a 55°C en el caso de viroides y a 45°C en el caso de virus, en baño maría durante toda la noche.

Al día siguiente, retirar la bolsa, cortar una esquina y retirar la solución amortiguadora de hibridación (*cuidado, es altamente radiactiva y tiene que ser eliminada en un recipiente apropiado*).

3. Lavado

Los pasos de lavado se deben realizar en una bandeja metálica y utilizando un agitador rotatorio. Luego de su utilización, las soluciones de lavado deben ser eliminadas según lo indicado.

Solución amortiguadora de lavado No. 1

Na^+Cl^- 0,36 M (21 g/l)

Tris base 20 mM (2,4 g/l)

HCl 1,48 ml/l (diluir 1,75 ml de HCl al 37%
en 10 ml de aguas y de éstos usar 8 ml)

SDS 0,1%

Solución amortiguadora de lavado No. 2

SSC 0,1X

SDS 0,1%

Solución amortiguadora de lavado No. 3

SSC 2X

Lavar como sigue:

2 veces durante 20 minutos en solución
amortiguadora No. 1 a temperatura ambiente

1 vez durante 30 minutos en solución
amortiguadora No. 2 en baño maría a 65 °C

2 veces durante 10 minutos en solución
amortiguadora No. 3 a temperatura ambiente

1 vez durante 20 minutos en 100 ml de
solución amortiguadora No. 3 con 20 μl de

RNasa (stock: 10 mg/ml) a temperatura ambiente (concentración final de 2 ug/ml)

1 vez durante 20 minutos en solución amortiguadora No. 2 en baño maría a 50 °C

Al terminar los lavados, secar las membranas bajo una lámpara que emane calor moderado o a temperatura ambiente.

4. Autoradiografía

Colocar la membrana seca en el cassette (trabajar cuidadosamente y con guantes; la membrana es radiactiva) y fijarla con cinta adhesiva en las esquinas para evitar que se mueva. Cubrir la membrana con plástico no electrostático para evitar la contaminación de la placa fotográfica.

Los siguientes pasos deben realizarse en un cuarto oscuro provisto de luz roja apropiada (luz con filtro Kodak GBX-2) y utilizando guantes:

- a) Colocar una placa fotográfica (Kodak X-Omat AR ó similar) sobre la membrana y cubrir con "intensifying screen".
- b) Cerrar el cassette.
- c) Poner a -70°C durante el tiempo adecuado, generalmente 24 horas.
- d) Retirar del congelador y desarrollar al momento.
- e) Sacar la placa fotográfica del cassette en un cuarto oscuro y cortar una esquina para identificar la posición original dentro del cassette.
- f) Desarrollar durante 2 minutos en "revelador" (solución de desarrollo) en una bandeja de metal a 22-23°C agitando las membranas suavemente.
- g) Enjuagar brevemente en agua.
- h) Colocar las membranas en la solución fijadora durante 2 minutos.
- i) Lavar con abundante agua corriente (bajo el caño abierto) y finalmente enjuagar con agua destilada.
- j) Secar las placas.

Identificar los resultados colocando la placa fotográfica encima de la membrana y localizando la posición de las manchas de los positivos.

5. Preparación de soluciones

a) SSC 20X (1 litro)

175,32 g de NaCl (3M)

88,23 g de citrato de sodio dihidratado (0,3M)

Disolver en 800 ml de agua destilada. Corregir el pH a 7,0 con NaOH. Llevar el volumen a 1 litro. Si es necesario, esterilizar en una autoclave.

b) Formamida desionizada (200 ml)

Mezclar 200 ml de formamida y 7 g de "mixed-bed, ion-exchange resin" (Bio-Rad AG 501-X8, 20-50 mesh) en un beaker. Agitar lentamente con un magneto durante 1 ó 2 horas a temperatura ambiente. Filtrar a través de papel filtro Whatman N°1. Repetir esta operación con 7 g más y filtrar. Dividir en alícuotas y guardar a -20°C.

c) SDS 20% (100 ml)

Disolver 20 g de "electrophoresis-grade SDS" en 90 ml de agua destilada. Calentar a 68°C para facilitar la disolución. Corregir el pH a 7,2 con HCl concentrado. Llevar el volumen a 100 ml. No se necesita esterilizar.

d) Acetato de sodio 3M pH 5,2 (10 ml)

Disolver 2.46 g de CH_3COONa (PM 82,03) en 8 ml de agua destilada y corregir el pH a 5,2 agregando CH_3COOH . Completar a 10 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

e) Solución amortiguadora cacodilato de sodio (200 mM)

Solución stock	x 100 ml	Conc. final
Cacodilato de sodio	2.72 g	170 mM
Acido cacodílico	0.414 g	30 mM
NaCl	10.4 g	1.8 M
EDTA (stock: 500 mM, pH 8.0)	2 ml	10 mM

Disolver en agua destilada estéril y llevar al volumen final. Usar guantes y mascarilla en la preparación porque es muy tóxico.

f) T₁₀E₁ + mercaptoetanol 1%

Para 100 ml, diluir 1 ml de TrisHCl 1M pH 8,0 y 0,2 ml de EDTA 500mM pH 8,0 en agua destilada, autoclavar y luego agregar 1% del mercaptoetanol. Dividir en alícuotas y almacenar a -20°C.

g) TCA al 5%

Para la preparación de 500 ml, disolver en agua destilada estéril 25 g de ácido tricloroacético y 1.42 g de Na₂HPO₄. Agitar hasta que se disuelva completamente y llevar al volumen final. La concentración de Na₂HPO₄ será 0,02M.

h) Sulfato de dextran 50%

Disolver 50 g en agua destilada, llevar el volumen a 100 ml. Para disolver completamente, calentar en baño maría a 60-70°C. La solución es muy densa; almacenar a -20°C.

i) EDTA 500mM pH 8,0

Para la preparación de 100 ml, pesar 18.6 g de EDTA (PM 372.2) y diluir en agua destilada estéril. La disolución es muy lenta. Agregar NaOH en pastillas hasta obtener un pH de 8.0. Agregar agua destilada estéril hasta completar al volumen final.

j) Calf thymus DNA (6 mg/ml)

Disolver 1 g en 170 ml de agua destilada estéril en agitación por toda la noche a 4°C (poner alta la velocidad del agitador porque a medida que se va disolviendo, el DNA se vuelve más denso). Pasar con fuerza el DNA disuelto por una jeringa 2 ó 3 veces para romperlo más. Dividir en alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf y guardar a -20°C.

k) RNasa (10 mg/ml)

En 10 ml de agua destilada estéril agregar 50 ul de Tris-HCl 2M pH 7,5 (concentración final: 10 mM) y 40 ul de NaCl 4M (concentración final: 15 mM). Pesar 10 mg/ml de "Ribonuclease A" (Type 1A, Sigma R4875) y disolver en agitación. Poner a baño maría a 100°C durante 15 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente y luego dividir en alícuotas en tubos Eppendorf y almacenar a -20°C.

l) Soluciones requeridas

- Marcaje: Kit (Promega), nucleótido ³²P-UTP (ICN), RQ1 DNasa, DTT (100 mM), RNasin, fenol saturado, cloroformo, acetato de sodio 3M pH 5.2, etanol, T₁₀E₁ + M.E. 1%.

- Medición de la incorporación: TCA al 5%, etanol al 70%, etanol absoluto.
- Hibridación: formamida, cacodilato de sodio, EDTA, SDS, Calf thymus DNA (6 mg/ml), sulfato de dextran 50%.
- Lavado: SSC, SDS, RNasa (10 mg/ml).
- Revelado de placas fotográficas: solución de desarrollo ("developer"), solución fijadora ("fixer").

6. Preparación de fenol saturado

Precaución: Trabajar bajo una campana extractora. Usar guantes gruesos, lentes especiales y una mascarilla. El fenol puede causar quemaduras y es muy tóxico cuando se realiza la mezcla.

a) Apartir del fenol líquido:

Agregar 0.1% de 8-hidroxiquinolina y 10% de m-cresol en el fenol líquido. Agitar 1 hora. Para estabilizar el pH, realizar de 3 a 4 lavados (agregar la solución amortiguadora, mezclar, esperar separación de fases y eliminar la solución) con solución amortiguadora Tris-HCl 1M pH 8.0, luego con 0.1M Tris-HCl pH 8.0 hasta que el pH de la solución de fenol sea mayor que 7.6.

Para preparar la solución amortiguadora Tris-HCl 1M pH 8.0, disolver 121.1 g de Tris en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8,0 utilizando HCl 0.1N (aproximadamente 29 ml) y agregar agua destilada hasta llegar a un volumen final de 1 000 ml. Esterilizar en autoclave.

b) A partir del fenol cristalizado (para 500 g):

Agregar 140 ml de agua destilada directamente a la botella que contiene fenol. Una vez disuelto, agregar 10% de m-cresol y agitar 1 hora. Agregar 0,68 g de 8-hidroxiquinolina y agitar 1 hora más. Dejar a temperatura ambiente toda la noche.

Al día siguiente estabilizar el pH como en el caso del fenol líquido. Almacenar a 4°C en botellas de vidrio de color ámbar. En estas condiciones el fenol saturado es estable por uno o dos meses.

BIBLIOGRAFIA

Melton, D.A., P.A. Krieg, M.R. Rebagliati, T. Maniatis, K. Zinn y M.R. Green. 1984. Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acid Research* 12: 7035-7056.

Owens, R.A. y T.O. Diener. 1981. Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. *Science* 213: 670-672.

Boulton, R.E., G.J. Jellis, D.C. Baulcombe y A.M. Squire. 1986. The application of complementary DNA probes to routine virus detection with particular reference to potato viruses. en *Developments and applications in virus testing*. Jones R.A.C. y L. Torrance editores, Great Britain. pp. 41-53.

Los manuales de Capacitación comprenden el conocimiento actual en temas específicos para uso por los profesionales involucrados en investigación o producción, cuyas funciones incluyen la generación y difusión de los conocimientos a través de actividades de capacitación. Están constituidos por una serie de fascículos sujetos a revisiones y actualización periódica.

Hibridación de Ácidos Nucleicos

Principio

Los virus son complejos de proteínas y ácidos nucleicos infecciosos capaces de dirigir su propia replicación al infectar una célula hospedera específica. Los viroides se comportan de una forma similar, pero están compuestos solamente por ácidos nucleicos circulares sin cubierta proteica.

La estructura química de los ácidos nucleicos y su conformación molecular han hecho posible desarrollar recientemente las técnicas de hibridación que permiten detectar la existencia de los virus y viroides con niveles de sensibilidad y especificidad muy altos.

Los ácidos nucleicos son moléculas formadas por cadenas de monómeros llamados nucleótidos. Cada nucleótido contiene tres componentes característicos:

- a) Base nitrogenada. Puede ser derivada de una purina (adenosina o guanina) o de una pirimidina (citosina, uracilo y timina).
- b) Pentosa. La desoxirribosa en el caso del DNA y la ribosa en el caso de RNA.
- c) Ácido fosfórico. Proporciona la energía necesaria para la formación de los enlaces fosfodiéster en la cadena de nucleótidos.

Las bases nitrogenadas forman pares de bases mediante puentes de hidrógeno. La adenina se une con la timina o el uracilo mediante dos puentes de hidrógeno, mientras que la citosina se une con la guanina mediante tres puentes de hidrógeno.

Es posible obtener cadenas dobles de DNA, cadenas dobles de RNA y cadenas dobles mixtas de DNA-RNA. Estas cadenas dobles tienen una conformación tridimensional de doble hélice. Las dos hebras pueden separarse fácilmente cuando se rompen los enlaces de hidrógeno entre las bases apareadas.

La desnaturalización puede lograrse calentando la solución de DNA o añadiendo un álcali o ácido para ionizar las bases. Si la solución se enfría lentamente o se contrarresta el grado de pH, las hebras de DNA vuelven a aparearse y ocurre la renaturalización de la doble hélice. El desenrollamiento o fusión de DNA se traduce en un incremento de su absorbancia a 260 nm., efecto que se denomina hipercrómico.

La temperatura de fusión (T_m) se define como aquella en la cual se disocia la mitad de la estructura helicoidal.

El aspecto más importante de la doble hélice es la especificidad de sus bases; una hebra es complementaria a la otra. Si una muestra de ácido nucleico desnaturalizado se fija en un membrana de nitrocelulosa y además se pone en contacto, bajo ciertas condiciones de temperatura y fuerza iónica, con otra muestra desnaturalizada, ocurrirá la hibridación si las hebras son complementarias entre sí.

Desde 1983, el CIP ha adoptado esta técnica para trabajos de rutina debido a su alta sensibilidad y por la facilidad de poder analizar un gran número de muestras al mismo tiempo. Antes de poder aplicar esta técnica es necesario cumplir con una serie de requisitos:

- a) Producir un cDNA de hebra simple complementario a la secuencia del patógeno (en nuestro caso virus o viroide) a analizar.
- b) Disponer de una gran cantidad del cDNA. Esto se logra mediante su clonamiento en un vector (por ejemplo un plásmido) y su introducción en una bacteria *E. coli* donde el plásmido se multiplicará. El bacteriófago M-13 también ha sido utilizado como vector.
- c) Aislar el cDNA de la bacteria y marcarlo con un isótopo radiactivo. Recientemente dos compañías comerciales han desarrollado un marcador no radiactivo que puede ser utilizado en su lugar.

El principio básico de la prueba depende de la habilidad del cDNA de formar un híbrido con la molécula del patógeno inmovilizada en una membrana. Debido a la presencia del marcador radiactivo en el cDNA, éste híbrido puede ser detectado mediante una autoradiografía en una placa fotográfica. La presencia del híbrido radiactivo indica que la muestra original se encontraba infectada con el patógeno.

Preparación de Muestras Para la Detección de virus/viroides mediante Hibridación de Acidos Nucleicos

Antes de realizar el análisis de las muestras, leer cuidadosamente las instrucciones y verificar si se dispone de todo el material necesario para completar la prueba

1. Tratamiento de las membranas de nitrocelulosa

Advertencia: las membranas de nitrocelulosa son tóxicas; se debe tener mucho cuidado al manipularlas y en todo momento se debe utilizar guantes y pinzas. No tocar las membranas con los dedos ya que las impresiones digitales pueden producir reacciones inespecíficas.

Cortar las membranas en un tamaño adecuado según el número de muestras (12 x 16 cm para 150 muestras). Trazar cuadrados de 1 cm de lado con un lapicero. Remojar en agua destilada y lavar 2 veces durante diez minutos cada vez en SSC 20X*.

SSC20X

Cloruro de sodio	3.0M	175.32 g
Citrato de sodio dihidratado	0.3M	88.23 g

Disolver en 800 ml de agua destilada. corregir el pH a 7.0 con NaOH.

Agregar agua destilada hasta un volumen final de 1,000 ml

*Nota: para desarrollar la prueba utilizando el procedimiento no radiactivo, lavar las membranas como se indica pero utilizando SSC 10X.

Colocar las membranas sobre papel filtro y dejar secar completamente a temperatura ambiente o bajo una lámpara.

2. Preparación de las muestras

Cuando se colecten las muestras en bolsas de plástico, recordar siempre que deben ser identificadas apropiadamente.

a) Hojas y brotes:

Colectar las muestras en bolsas plásticas (hojas de la parte apical de la planta 1 ó 2 foliolos - y brotes de cualquier parte del tubérculo).

Nota: Las muestras de hojas o brotes nunca deben ser congeladas antes de ser procesadas. Se pueden guardar en una refrigeradora común a 4°C durante dos días como máximo. Los tubérculos almacenados a 4°C tienen que estar por lo menos dos semanas a temperatura ambiente antes de ser procesados.

Solución amortiguadora de extracción

Para Viroides:		Para Virus:	
Formaldehído al 37%	49.4 ml	SSC 5X	100 ml
SSC 10X	<u>50.6 ml</u>		
	100.0 ml		

Macerar la muestra en la bolsa con 2 volúmenes de solución amortiguadora de extracción (2 ml por gramo de muestra) y transferir la savia a un tubo de ensayo o Eppendorf. Para la detección de viroides, se añade a la muestra 1 volumen de la mezcla fenol/cloroformo 1:1 (V/V).

Dejar los tubos en la refrigeradora a 4°C durante toda la noche (si no se tuviera una centrifuga) o centrifugar inmediatamente durante 5 minutos a 10 000 rpm para separar las fases.

Con la ayuda de un pipetor o una pipeta pasteur, colocar de 3 a 5 µl o una gota del sobrenadante claro sobre la membrana de nitrocelulosa y dejar secar bien. Identificar las muestras en la membrana utilizando una hoja de datos como guía.

Colocar la membrana en un horno con vacío a 80°C durante 2 horas o fijar sobre un transiluminador UV por no más de 5 minutos. Guardar la membrana en un lugar seco hasta el momento de la hibridación.

Nota: Para desarrollar la prueba utilizando el sistema no radiactivo, es importante centrifugar siempre las muestras durante 5 minutos a 8 000 -10 000 rpm para separar las fases y obtener un sobrenadante más limpio.

Preparación de Sondas con ³²P Mediante el Sistema de Transcripción

Esta técnica de detección de virus o viroides está basada en la hibridación de una molécula altamente radiactiva de RNA complementario al patógeno, el cual ha sido previamente fijado en una membrana de nitrocelulosa. El híbrido resultante es detectado mediante una autoradiografía.

1. Marcaje (RNA-transcripto)

El sistema de transcripción es un proceso mediante el cual el mensaje genético contenido en una molécula de DNA es transcrito en forma de RNA. Este método está limitado a secuencias clonadas dentro de vectores específicos útiles para este fin.

La transcripción requiere de la presencia de un promotor (por ejemplo, SP6 ó T7) reconocido por la RNA polimerasa correspondiente, y la secuencia de cDNA tiene que estar ubicada luego del promotor.

Para asegurar la síntesis de únicamente la secuencia deseada, el plásmido es linearizado inmediatamente después de la secuencia clonada, de este modo, la transcripción empieza a continuación del promotor, sigue a lo largo de la molécula clonada y se interrumpe en el punto de linearización.

Si en la mezcla uno de los nucleótidos se encuentra en forma radiactiva o marcada, éste será incluido en la síntesis de la nueva molécula de RNA. La degradación del plásmido utilizado como molde por acción de una DNasa permite obtener el RNA marcado en forma pura. Para el marcaje se utiliza el "Riboprobe Gemini System II" (Promega) y nucleótido radiactivo "Uridine-5'-triphosphate" (^{32}P , actividad específica: 650 Ci/ mmol, concentración: 10 mCi/ml).

Advertencia: el desarrollo del método pide la utilización de material radiactivo. Usar guantes en todos los pasos y tener el cuidado necesario para un manejo seguro. El material radiactivo tiene que ser eliminado en recipientes apropiados y almacenados siguiendo las indicaciones de la institución responsable de la seguridad nuclear. El tiempo de vida media del ^{32}P es de 14 días; en consecuencia, el tiempo mínimo de almacenamiento para que la radiactividad sea nula es de aproximadamente 4 a 5 meses.

Mezclar en un tubo Eppendorf a temperatura ambiente en el mismo orden lo siguiente:

5X "transcription buffer"	4 ul
DTT 100 mM	2 ul
RNasin (Progena)	1 ul
GTP 10 mM	1 ul
ATP 10 mM	1 ul
CTP 10 mM	1 ul
$\alpha^{32}\text{P}$ -UTP 10 mCi/ml (70 uCi)	7 ul
RNA polymerase (SP6 ó T7, según el promotor contenido en el plásmido, 15-20 unidades/ μl)	1 ul
Plásmido linearizado (=1ug)	2 ul

Mezclar bien y centrifugar brevemente. Incubar a 38°C durante 120 minutos en baño maría. Agregar 1 ul RQ1 DNasa (1 unidad/ul) e incubar a 37°C durante 20 minutos. Luego adicionar 179 ul agua bidestilada (ddH₂O) y mezclar.

Agregar 100 ul de fenol saturado y 100 ul de cloroformo. Mezclar en agitador de tubos (vórtex) y centrifugar durante 2 ó 5 minutos.

Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf y agregar 200 ul de cloroformo. Mezclar en agitador de tubos (vórtex) y centrifugar durante 2 ó 5 minutos.

Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf y agregar 20 ul de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 550 ul de etanol frío.

Mezclar y poner a -70°C por 30 minutos o más. Luego descongelar 5 minutos y centrifugar durante 15 minutos a 14 000 rpm, aproximadamente. Eliminar el sobrenadante (chequear a 10 cm de distancia; el sobrenadante debe medir 0,5 mR; el pellet de 1 a 1,5 mR a 10X) y voltear el tubo Eppendorf para secar el pellet.

Resuspender el pellet en 100 ul de T₁₀E₁ con 1% de mercaptoetanol y mezclar bien. Guardar a -70°C hasta su utilización.

2. Medición de la incorporación

Cortar papel filtro 3MM Whatman en rectángulos de 2 por 0.5 cm. Colocar 1 ul de RNA marcado en el centro del papel y dejar secar completamente.

Lavar el papel filtro como sigue:

- 2 veces durante 5 minutos en TCA al 5%
- 1 vez durante 5 minutos en etanol al 70%
- 1 vez durante 5 minutos en etanol absoluto

Dejar secar completamente. Colocar el papel filtro dentro de la tapa de plomo utilizada para el transporte del nucleótido radiactivo. Colocar el contador Geiger sobre la tapa y medir la radiactividad como se muestra en el cuadro siguiente:

Medición de la radiactividad (cálculo de los CPM – "Counts per minute")						
mR	Ampl	mRx Ampl= mR totales	mR totales x 2500= CPM	CPMx 17.8= CPM/μl	400 000/ CPM/μl= μl/ml buffer hibridación	μl/ml x ml buffer hybrid.= μl totales

3. Hibridación

Poner la membrana en una bolsa plástica específica para este fin, sellar la bolsa y cortar una esquina. Para una membrana de 12 x 16 cm, poner 9.6 ml de solución amortiguadora de hibridación en la bolsa, cerrar e incubar en baño maría a 55°C durante 10 minutos.

Solución amortiguadora de hibridación

Solución stock	x 40 ml	Conc. final
Formamida desionizada	20 ml	50%
Cacodilato de sodio 200 mM	5 ml	25 mM
SDS al 20%	0,25 ml	0,125 %

Completar con H₂O hasta el volumen final

Desnaturalizar el "calf-thymus DNA" (stock: 6 mg/ml) calentándolo a 100 °C durante 5 minutos; colocarlo inmediatamente sobre hielo.

Agregar 1 ml de "calf-thymus DNA" en la bolsa y mezclar bien. Incubar a 55°C durante 10 minutos.

Agregar 2,4 ml de sulfato de dextran (previamente calentado a 55°C, stock al 50%) e incubar a 55°C durante 10 minutos más.

Agregar la cantidad adecuada de sonda (calculada como ya se indicó) para obtener una concentración final de 400 000 CPM/ml de solución amortiguadora de hibridación (por ejemplo: 9,6 + 1 + 2,4 = 13 ml).

Mezclar bien los componentes, sellar la bolsa plástica evitando la formación de burbujas de aire. Incubar, a 45°C en baño maría durante toda la noche.

Al día siguiente, retirar la bolsa, cortar una esquina y retirar la solución amortiguadora de hibridación (*cuidado, es altamente radiactiva y tiene que ser eliminada en un recipiente apropiado*).

4. Lavados

Los pasos de lavado se deben realizar en una bandeja metálica y utilizando un agitador rotatorio. Luego de su utilización, las soluciones de lavado deben ser eliminadas según lo indicado.

Solución amortiguadora de lavado No. 1

NaCl 0,36 M (21 g/l)

Tris base 20 mM (2,4 g/l)

HCl 1,48 ml/l (diluir 1,75 ml de HCl al 37%
en 10 ml de aguas y de éstos usar 8 ml)

SDS 0,1%

Solución amortiguadora de lavado No. 2

SSC 0,1X

SDS 0,1%

Solución amortiguadora de lavado No. 3

SSC 2X

Lavar como sigue:

2 veces durante 20 minutos en solución
amortiguadora No. 1 a temperatura ambiente

1 vez durante 30 minutos en solución
amortiguadora No. 2 en baño maría a 65 °C

2 veces durante 10 minutos en solución
amortiguadora No. 3 a temperatura ambiente

1 vez durante 20 minutos en 100 ml de
solución amortiguadora No. 3 con 20 µl de
RNasa (stock: 10 mg/ml) a temperatura
ambiente (concentración final de 2 µg/ml)

1 vez durante 20 minutos en solución
amortiguadora No. 2 en baño maría a 50 °C

Al terminar los lavados, secar las membranas bajo una lámpara que emane calor moderado o a temperatura ambiente.

5. Autoradiografía

Colocar la membrana seca en el cassette (trabajar cuidadosamente y con guantes; la membrana es radiactiva) y fijarla con cinta adhesiva en las esquinas para evitar que se mueva. Cubrir la membrana con plástico no electrostático para evitar la contaminación de la placa fotográfica.

Los siguientes pasos deben realizarse en un cuarto oscuro provisto de luz roja apropiada (luz con filtro Kodak GBX-2) y utilizando guantes:

- a) Colocar una placa fotográfica (Kodak X-Omat AR ó similar) sobre la membrana y cubrir con "intensifying screen".
- b) Cerrar el cassette.
- c) Poner a -70°C durante el tiempo adecuado, generalmente 24 horas.
- d) Retirar del congelador y desarrollar al momento.
- e) Sacar la placa fotográfica del cassette en un cuarto oscuro y cortar una esquina para identificar la posición original dentro del cassette.
- f) Desarrollar durante 2 minutos en "revelador" (solución de desarrollo) en una bandeja de metal a $22-23^{\circ}\text{C}$ agitando las membranas suavemente.
- g) Enjuagar brevemente en agua.
- h) Colocar las membranas en la solución fijadora durante 2 minutos.
- i) Lavar con abundante agua corriente (bajo el caño abierto) y finalmente enjuagar con agua destilada.
- j) Secar las placas.

Identificar los resultados colocando la placa fotográfica encima de la membrana y localizando la posición de las manchas de los positivos.

6. Preparación de soluciones

- a) SSC 20X (1 litro)

175.32 g de NaCl (3M)

88.23 g de citrato de sodio dihidratado (0,3M)

Disolver en 800 ml de agua destilada. Corregir el pH a 7,0 con NaOH. Llevar el volumen a 1 litro. Si es necesario, esterilizar en una autoclave.

b) Formamida desionizada (200 ml)

Mezclar 200 ml de formamida y 7 g de "mixed-bed, ion-exchange resin" (Bio-Rad AG 501-X8, 20-50 mesh) en un beaker. Agitar lentamente con un magneto durante 1 ó 2 horas a temperatura ambiente. Filtrar a través de papel filtro Whatman N°1. Repetir esta operación con 7 g más y filtrar. Dividir en alícuotas y guardar a -20°C.

c) SDS 20% (100 ml)

Disolver 20 g de "electrophoresis-grade SDS" en 90 ml de agua destilada. Calentar a 68°C para facilitar la disolución. Corregir el pH a 7,2 con HCl concentrado. Llevar el volumen a 100 ml. No se necesita esterilizar.

d) Acetato de sodio 3M pH 5,2 (10 ml)

Disolver 2.46 g de CH₃COONa (PM 82,03) en 8 ml de agua destilada y corregir el pH a 5,2 agregando CH₃COOH. Completar a 10 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

e) Solución amortiguadora cacodilato de sodio (200 mM)

Solución stock	x 100 ml	Conc. final
Cacodilato de sodio	2.72 g	170 mM
Acido cacodílico	0.414 g	30 mM
NaCl	10.4 g	1.8 M
EDTA		
(stock 500 mM, pH 8.0)	2 ml	10 mM

Disolver en agua destilada estéril y llevar al volumen final. Usar guantes y mascarilla en la preparación porque es muy tóxico.

f) T₁₀E₁ + mercaptoetanol 1%

Para 100 ml, diluir 1 ml de TrisHCl 1M pH 8,0 y 0,2 ml de EDTA 500mM pH 8,0 en agua destilada, autoclavar y luego agregar 1% del mercaptoetanol. Dividir en alícuotas y almacenar a -20°C.

g) TCA al 5%

Para la preparación de 500 ml, disolver en agua destilada estéril 25 g de ácido tricloroacético y 1.42 g de Na₂HPO₄. Agitar hasta que se disuelva completamente y llevar al volumen final. La concentración de Na₂HPO₄ será 0,02M.

h) Sulfato de dextran 50%

Disolver 50 g en agua destilada, llevar el volumen a 100 ml. Para disolver completamente, calentar en baño maría a 60-70°C. La solución es muy densa; almacenar a -20°C.

i) EDTA 500mM pH 8,0

Para la preparación de 100 ml, pesar 18.6 g de EDTA (PM 372.2) y diluir en agua destilada estéril. La disolución es muy lenta. Agregar NaOH en pastillas hasta obtener un pH de 8.0. Agregar agua destilada estéril hasta completar al volumen final.

j) Calf thymus DNA (6 mg/ml)

Disolver 1 g en 170 ml de agua destilada estéril en agitación por toda la noche a 4°C (poner alta la velocidad del agitador porque a medida que se va disolviendo, el DNA se vuelve más denso). Pasar con fuerza el DNA disuelto por una jeringa 2 ó 3 veces para romperlo más. Dividir en alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf y guardar a -20°C.

k) RNasa (10 mg/ml)

En 10 ml de agua destilada estéril agregar 50 ul de Tris-HCl 2M pH 7,5 (concentración final: 10 mM) y 40 ul de NaCl 4M (concentración final: 15 mM). Pesar 10 mg/ml de "Ribonuclease A" (Type 1A, Sigma R4875) y disolver en agitación. Poner a baño maría a 100°C durante 15 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente y luego dividir en alícuotas en tubos Eppendorf y almacenar a -20°C.

l) Soluciones requeridas

- Marcaje: Kit (Promega), nucleótido ^{32}P -UTP (ICN), RQ1 DNasa, DTT (100 mM), RNasin, fenol saturado, cloroformo, acetato de sodio 3M pH 5.2, etanol, T_{10}E_1 + M.E. 1%.
- Medición de la incorporación: TCA al 5%, etanol al 70%, etanol absoluto.
- Hibridación: formamida, cacodilato de sodio, EDTA, SDS, Calf thymus DNA (6 mg/ml), sulfato de dextran 50%.
- Lavado: SSC, SDS, RNasa (10 mg/ml).
- Revelado de placas fotográficas: solución de desarrollo ("developer"), solución fijadora ("fixer").

Preparación de fenol saturado

Precaución: *Trabajar bajo una campana extractora. Usar guantes gruesos, lentes especiales y una mascarilla. El fenol puede causar quemaduras y es muy tóxico cuando se realiza la mezcla.*

a) A partir del fenol líquido:

Agregar 0.1% de 8-hidroxiquinolina y 10% de m-cresol en el fenol líquido. Agitar 1 hora. Para estabilizar el pH, realizar de 3 a 4 lavados (agregar la solución amortiguadora, mezclar, esperar separación de fases y eliminar la solución) con solución amortiguadora Tris-HCl 1M pH 8.0, luego con 0.1M Tris-HCl pH 8.0 hasta que el pH de la solución de fenol sea mayor que 7.6.

Para preparar la solución amortiguadora Tris-HCl 1M pH 8.0, disolver 121.1 g de Tris en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8,0 utilizando HCl 0.1N (aproximadamente 29 ml) y agregar agua destilada hasta llegar a un volumen final de 1 000 ml. Esterilizar en autoclave.

b) A partir del fenol cristalizado (para 500 g):

Agregar 140 ml de agua destilada directamente a la botella que contiene fenol. Una vez disuelto, agregar 10% de m-cresol y agitar 1 hora. Agregar 0,68 g de 8-hidroxiquinolina y agitar 1 hora más. Dejar a temperatura ambiente toda la noche.

Al día siguiente estabilizar el pH como en el caso del fenol líquido. Almacenar a 4°C en botellas de vidrio de color ámbar. En estas condiciones el fenol saturado es estable por uno o dos meses.

- . 1981. Starch gel electrophoresis technique used with alfalfa and other *Medicago* species. *Can. J. Plant Sci.* 61:745-749.
- . 1983. Alfalfa, Luzerna. En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding. Part B.* Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 253-294.
- y Morgan, K. 1981. Peroxidase and leucine-aminopeptidase in diploid *Medicago* species closely related to alfalfa: Multiple gene loci, multiple allelism and linkage. *Theor. Appl. Genet.* 60:221-228.
- y Ostafichuk, L. 1983. Allozymes and genetic variability in *Medicago turbinata*, *M. truncatula*, and their hybrids. *Can. J. Genet. Cytol.* 25: 286-291.
- Rick, C. M. 1960. Hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum pennellii*: Phylogenetic and cytogenetic significance. *Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.)* 46:78-82.
- . 1983. Tomato. En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding. Part B.* Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 147-165.
- ; Tanksley, S. D. y Fobes, J. F. 1979. A pseudoduplication in *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.)* 76:3435-3439.
- Shields, C. R¹; Orton, T. J. y Stuber, C. W. 1983. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A.* Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 443-468.
- Smithies, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gels. *Biochem. J.* 61-629.
- Tanksley, S. D. 1979. An efficient and economical design for starch gel electrophoresis. *Rept. Tomato Genet. Coop.* 29:37-38.
- y Jones, R. A. 1981. Application of alcohol dehydrogenase allozymes in testing for the genetic purity of F₁ hybrids of tomato. *HortSci.* 16:179-180.
- ; Medina-Filho, H. y Rick, C. M. 1981. The effect of isozyme selection on metric characters in an interspecific backcross of tomato: Basis for an early screening procedure. *Theor. Appl. Genet.* 60:291-296.
- Vallejos, C. E. 1983. Enzyme activity staining. En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A.* Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 469-516.
- y Tanksley, S. D. 1983. Segregation of isozyme markers and cold tolerance in an interspecific backcross of tomato. *Theor. Appl. Genet.* 66:241-247.
- Wetter, L. R. 1977. Isozyme patterns in soybean-*Nicotiana* somatic hybrid cell lines. *Molec. Gen. Genet.* 150:231-235.

Capítulo 38

Detección de viroides y virus con técnicas de ADN recombinante

L. F. Salazar*

* Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.

Introducción

Aun cuando las técnicas inmunológicas (e.g., ELISA) han demostrado alta sensibilidad para el diagnóstico de virus en las plantas, no son aplicables a la detección de viroides o de ciertos virus cuya entidad infectiva ocurre naturalmente como ácido nucleico desprovisto de la cubierta proteínica. Asimismo, la dificultad de producir antisueros para algunos virus —ya sea por la inestabilidad de sus partículas, por su íntima asociación con ciertos tejidos u orgánulos del huésped, o por su baja concentración— limitan el valor de la serología en esos casos.

Recientemente, los avances logrados en la investigación de los ácidos nucleicos han mejorado las técnicas de hibridación de moléculas complementarias ADN-ADN y ARN-ADN. La capacidad de hibridación de los ácidos nucleicos complementarios es la base para desarrollar métodos de diagnóstico de viroides y virus. Para facilitar la aplicación del método, el ácido nucleico que debe detectarse se fija a un soporte sólido (filtro o membrana) para que la sonda ("probe") en solución pueda hibridarse sobre ese ácido nucleico ya fijado en la membrana. Por esta razón la técnica se conoce también como gota adsorbida ("dot blot"). El desarrollo y la aplicación de esta técnica se describen en el presente trabajo.

Detección del PSTV por Hibridación de Ácidos Nucleicos

La detección del viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTV) mediante ensayos de infectividad en tomate (Raymer y O'Brien, 1962) o por electroforesis (Morris y Wright, 1975) en geles de poliacrilamida es muy laboriosa, poco sensible y costosa; por consiguiente, el diagnóstico del PSTV constituye un ejemplo de la necesidad de aplicar las nuevas técnicas del ADN recombinante. Estas técnicas son de especial valor cuando se aplican a plántulas provenientes del cultivo de tejidos. La técnica, en general, está basada en la hibridación de un ADN complementario del PSTV (PSTVcADN) estando el PSTV adherido a un soporte sólido. Cuando el PSTVcADN es altamente radioactivo, los híbridos ADN-ARN pueden detectarse por autoradiografía (Owens y Diener, 1981). Sin embargo, existe la posibilidad de utilizar un "marcador" no radioactivo (Langer et al., 1981), aunque los intentos iniciales de usarlo en el CIP no han sido del todo satisfactorios (CIP, 1983).

Construcción de sondas PSTVcADN y clonamiento molecular

El clonamiento molecular y la caracterización del PSTVcADN de doble cadena (ds) se hizo más fácil cuando se conoció la secuencia del ARN del PSTV (Gross et al., 1978). Posteriormente, un dsPSTVcADN fue sintetizado e insertado en el sitio específico para la endonucleasa Pst I del plásmido pBR322. Todos los clones recombinantes obtenidos por este sistema contenían una copia incompleta del PSTV (Owens y Cress, 1980). Los análisis en que se empleaban enzimas de restricción sugirieron que dos clones (pDC 22 y pDC 29) tenían secuencias parcialmente traslapadas; por ello fueron combinados para intentar la construcción de un clon que tuviese la longitud total del PSTV. El nuevo fragmento fue clonado en el plásmido pBR322 y los clones resultantes demostraron (Diener et al., 1982) que contenían la longitud y la secuencia del PSTV (dsPSTVcADN). Este ADN se mantiene en el plásmido pBR322, y después de purificarlo de la bacteria *E. coli*, se marca con ^{32}P y se utiliza para detectar el PSTV.

Diagnóstico del PSTV por hibridación de ácidos nucleicos

El procedimiento para el diagnóstico del PSTV en tejido vegetal (Salazar et al., 1983) se ha esquematizado en la Figura 38.1.

Reactivos y materiales. Se necesitan los siguientes elementos:

1. Sonda PSTVcADN marcada con ^{32}P mediante síntesis de reparación; los detalles para la extracción y el marcado de la sonda están ampliamente difundidos (Maniatis et al., 1982).
2. Membranas de nitrocelulosa; ej; BA85 (Schleicher & Schuell, New Hampshire, USA).
3. Reactivos indicados en el procedimiento.
4. Materiales para autoradiografía.

Homogeneización de la muestra. El bófer utilizado tiene, relativamente, una alta concentración iónica que permite la liberación del PSTV-ARN del núcleo, en tanto que el dietilditiocarbamato (DIECA) y el ditiotreitól (DTT) inhiben la oxidación enzimática de los polifenoles. Hay varias alternativas para homogeneizar el tejido; se pueden utilizar homogeneizadores cónicos de vidrio, morteros, o pequeñas bolsas de plástico. Este

- b. Utilizando el dsARN como una sonda de sentido (+) o (-) para detectar el ARN de sentido opuesto (ej: el genoma viral ssARN) por hibridación in situ (en los geles).
- c. Usando sondas virales de ssARN (+) para determinar la presencia de cadenas de ARN (-).
- d. Construyendo sondas de DNA complementario empleando el dsARN como modelo.

El uso del dsARN como sonda marcada resultaría análogo al proceso de detección del PSTV y tendría gran aplicación especialmente en aquellos virus difíciles de purificar. En virus fácilmente purificables en grandes cantidades, la utilización de sondas de ssARN (viral) podría aplicarse siempre y cuando la purificación del ácido nucleico se realice cuidadosamente. En ambos casos, disponer de grandes cantidades del ácido nucleico para construir las sondas es un requisito indispensable que se puede satisfacer manteniendo hospedantes infectados con el virus que se probará.

Conclusiones

La técnica descrita en este capítulo es aplicable a cualquier situación donde sea necesario detectar agentes virales y subvirales. Por requerir sólo de pequeñas cantidades de tejido vegetal, es de un valor incalculable para eliminar patógenos en varias etapas del cultivo de tejidos.

Esta técnica se utiliza rutinariamente en algunos programas de producción de material vegetal básico libre de virus; sin embargo, las técnicas inmunológicas de uso extendido, especialmente ELISA, ofrecen alta sensibilidad y son fácilmente aplicables para detectar virus en pequeñas cantidades de tejido. Solamente en situaciones en que los virus que se deben detectar no pueden diagnosticarse por serología, las técnicas del DNA recombinante o la detección viral por procedimientos relacionados deberían considerarse y, eventualmente, implementarse.

Referencias

CIP (Centro Internacional de la Papa). 1983. Annual report. Lima, Perú. 164 p.

Diener, T. O.; Salazar, L. F.; Owens, R. A. y Cress, D. E. 1982. New potato spindle tuber test: Implications for the future. Proceedings of the International Congress Research for the Potato in the Year 2000. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. p. 71-76.

Detección de viroides y virus...

Gross, H. J.; Domdey, H.; Lossow, C.; Jank, P.; Raba, M.; Alberty, H. y Sanger, H. L. 1978. Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature (Londres)* 273:203-208.

Harrison, B. D. y Robinson, D. J. 1982. Use of complementary DNA to detect tobacco rattle virus in potato foliage. Proceedings of the International Congress Research for the Potato in the Year 2000. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. p. 93-94.

Jordan, R. L. y Dodds, J. A. 1983. Hybridization of 5'-end-labelled RNA to plant viral RNA in agarose and acrylamide gels. *Plant Mol. Biol. Repr.* 1:31-37.

Langer, P. R.; Waldrop, A. A. y Ward, D. C. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labelled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.)* 78:6633-6637.

Lizárraga, R. L.; Salazar, L. F.; Roca, W. M. y Schilde-Rentschler, L. 1980. Elimination of potato spindle tuber viroid by low temperature and meristem culture. *Phytopathology* 70:754-755.

Maniatis, T.; Fritsch, E. F. y Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York. 545 p.

Morris, y T. J. Wright, N.S. 1975. Detection on polyacrylamide gel of a diagnostic nucleic acid from tissue infected with potato spindle tuber viroid. *Am. Potato J.* 52:57-63.

——— et al. 1983. Viral specific dsRNA: Diagnostic value for plant virus disease identification. *Plant Mol. Biol. Repr.* 1:27-30.

Owens, R. A. y Cress, D. E. 1980. Molecular cloning and characterization of potato spindle tuber viroid cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.)* 77:5302-5306.

——— y Diener, T. O. 1981. Sensitive acid rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. *Science* 213:670-672.

Palukaitis, P. y Symons, R. M. 1980. Nucleotide sequence homology of thirteen tobamovirus RNAs as determined by hybridization analysis with complementary DNA. *Virology* 107:354-361.

Raymer, W. B. y O'Brien, M. J. 1962. Transmission of potato spindle tuber viroid to tomato. *Am. Potato J.* 39:401-408.

Salazar, L. F.; Owens, R. A.; Smith, D. R. y Diener, T. O. 1983. Detection of potato spindle tuber viroid by nucleic acid spot hybridization: Evaluation with tuber sprouts and true potato seed. *Am. Potato J.* 60:587-597.

Wahl, G. M.; Stern, J. y Stark, G. R. 1979. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl paper and rapid hybridization using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.)* 76:3683-3687.

condiciones del CIP y de Beltsville, Estados Unidos, este proceso es altamente sensitivo: hasta 10 veces más, por lo regular, que la electroforesis en geles de poliacrilamida.

En la Figura 38.2 se observa una serie de extractos de semillas infectadas y sanas en las cuales el PSTV ha sido diagnosticado por hibridación de ácidos nucleicos.

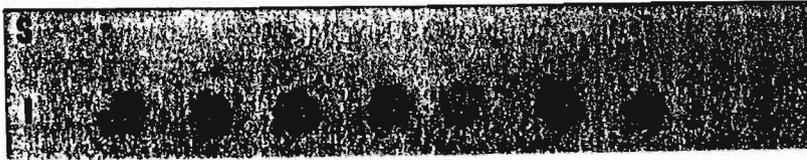


Figura 38.2. Resultados de una prueba típica para la detección del PSTV por hibridación de ácidos nucleicos. S = muestra de semilla botánica de papa libre de PSTV (20 semillas en 0.2 ml de bófer). I = siete lotes de semilla botánica de papa infectada con el PSTV.

Otros Usos Posibles del Método de Hibridación

Este método sería muy útil para diagnosticar, además de los viroides, los virus convencionales para los cuales las pruebas inmunológicas no sean prácticas. Asimismo, los virus con partículas lábiles o aquéllos cuyas cubiertas proteínicas son muy poco antigénicas podrían detectarse fácilmente con este sistema. Evidentemente, no se requiere de una sonda que contenga la secuencia completa del virus que se diagnostica, sino de una que sea suficientemente específica y alcance, por lo menos, la sensibilidad de detección de métodos inmunológicos como ELISA. La ventaja de la aplicación de esta técnica ha sido demostrada con el 'tobacco rattle virus', el cual ocurre a menudo como ácido nucleico sin cubierta proteínica (Harrison y Robinson, 1982). En otros virus, a los cuales los métodos inmunológicos son fácilmente aplicables (Palukaitis y Symons, 1980), este método parece tener un gran valor para identificarlos y para determinar relaciones entre ellos y sus cepas. Sin embargo, no se ha demostrado aún su aceptación como criterio de diferenciación.

La aplicación de esta técnica para evaluar plántulas que posean resistencia a los virus ya ha sido mencionada aunque los detalles del proceso no

1. Flavell, R. B. Trabajo presentado en 'IARC and Biotechnology', International Rice Research Institute (IRRI), Los Baños, Filipinas, abril 1984

han sido revelados. Puesto que el método sólo requiere pequeñas cantidades del tejido que se debe probar, la hibridación de ácidos nucleicos es de un valor incalculable para la detección de viroides y virus en plántulas provenientes del cultivo de tejidos. Es ella especialmente valiosa en el diagnóstico del PSTV tanto antes y después de cortar los meristemas como en plántulas provenientes de ellos durante el proceso de eliminación del viroide por tratamiento en frío (Lizárraga et al., 1980).

La eliminación del PSTV es muy difícil y laboriosa y requiere de un método como el antes descrito, que permita una detección temprana; ahorra también mucho tiempo, y reduce la posibilidad de contaminar tejidos sanos porque facilita la eliminación temprana del material afectado. Su sensibilidad asegura que el material seleccionado no contiene el viroide ni siquiera en concentración baja, condición en que es imposible detectarlo por métodos tradicionales como las plantas indicadoras (el tomate) o la electroforesis.

Diagnóstico de Virus por Determinación de Ácidos Nucleicos Virales

El método anteriormente descrito es aplicable a aquellos virus que pueden diagnosticarse construyendo —o de preferencia, clonando— una sonda específica y marcada. El clonamiento es un requisito indispensable para mantener una sonda de dsADN estable y en cantidades ilimitadas.

Hasta hace muy poco tiempo, en el diagnóstico de virus de plantas no se había estudiado el posible valor de los segmentos homogéneos de ARN de doble cadena (dsARN) que corresponden al doble del tamaño del genoma viral (ARN de una sola cadena, ssARN) y que siempre están presentes en plantas infectadas (Jordan y Dodds, 1983). Este dsARN, así como otros de menor tamaño cuya secuencia es homóloga a la del dsARN, son formas replicativas (RF) en el proceso de infección viral (Morris et al., 1983). Estos tipos de dsARN son altamente específicos y, además, no existe en las plantas sanas ningún otro dsARN de alto peso molecular; por tanto, aquéllos resultan de gran valor en el diagnóstico viral.

Para detectar infecciones virales puede aplicarse este método en varias formas:

- a. Determinando la presencia del dsARN mediante electroforesis, en geles combinados de agarosa y acrilamida, o por serología.

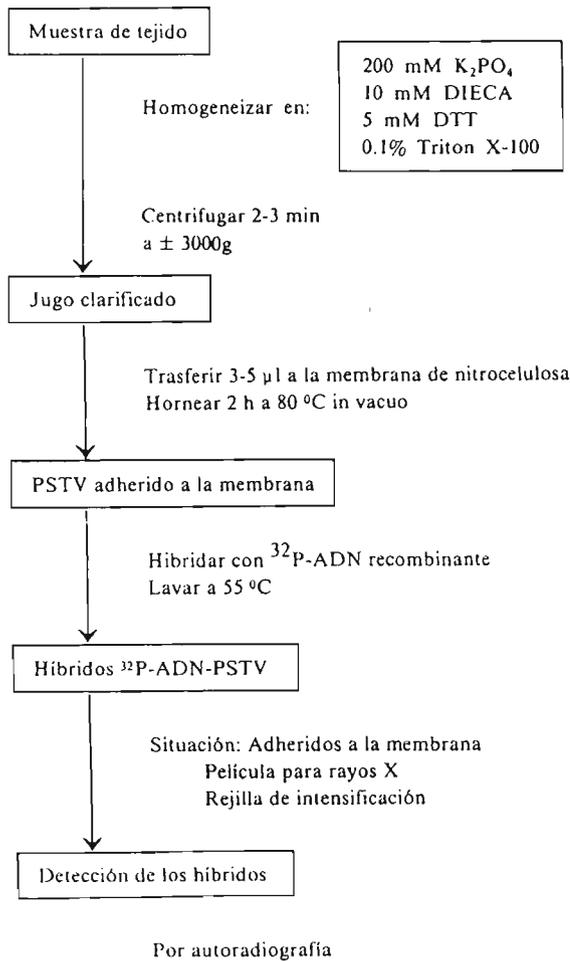


Figura 38.1. Esquema del procedimiento de detección del PSTV por hibridación de ácidos nucleicos.

último recurso, bastante simple, evita el uso de gran cantidad de material de vidrio y, lo que es más importante, reduce la posibilidad de contaminar el tejido.

La cantidad de bófer que se utilizará depende del material que se prueba y de la sensibilidad del sistema, la cual se determina generalmente probando una serie de diluciones. En el CIP se utilizan de 1 a 1.5 ml de buffer

por gramo de tejido (hojas, tubérculos o brotes de tubérculos) ó 0.2 ml por cada 20 ó 30 semillas. La clarificación por centrifugación (2000-3000 rpm) es conveniente pero no absolutamente necesaria.

Trasferencia de las muestras a la membrana de nitrocelulosa. De cada muestra, una gota de 3 a 5 μ l del extracto se coloca cuidadosamente en la membrana de nitrocelulosa. Para identificar la posición de cada muestra se toma como referencia una de las esquinas de la membrana (un pequeño corte es suficiente). Las membranas que ya contienen las muestras deben secarse en un horno, preferiblemente al vacío, a 80 °C durante 2 horas.

Hibridación. La reacción de hibridación se puede realizar como se describió anteriormente (Wahl et al., 1979). La prehibridación no parece tener un efecto marcado y puede remplazarse por un breve mojado de la membrana en el buffer de hibridación (5-10 min a 20-25 °C). El bófer de hibridación está compuesto de formamida 40% (v/v), NaCl 0.18M, cacodilato de sodio 10 mM, EDTA 1 mM, dodecilsulfato de sodio 0.1%, y 400 μ g/ml de ARN de transferencia obtenido de levadura; el pH del bófer es 7.0. La hibridación tarda 24 horas a 55 °C en el bófer de hibridación que contiene 10% de sulfato de dextrano y PSTVcADN marcado con 32 P por medio de síntesis de reparación (1 a 2.5 x 10⁶ cpm/ml). La relación entre el volumen del bófer y el área de la membrana es de 1 ml por cada 35 cm². El PSTVcADN marcado se desnaturaliza por calentamiento durante 2 min a 100 °C en presencia de 50% de formamida, antes de añadirlo a la reacción de hibridación.

Autoradiografía. Las membranas se lavan a 55 °C con cinco cambios de un tampón de NaCl 0.36 M, Tris-HCl 10 μ M (pH 7.5), y dodecilsulfato de sodio 0.1%. Dos lavados adicionales con el mismo tampón diluido 10 veces son también necesarios.

La autoradiografía se genera en un lapso de 24 a 48 hr a -70 °C utilizando película apropiada para autoradiografía, por ejemplo Kodak X-Omat, y rejillas de intensificación como las Dupont Cronex Lightning-Plus. El proceso es muy simple: sólo requiere asegurar la membrana, la rejilla de intensificación y la película, y envolver el conjunto con papel de aluminio.

Lectura e interpretación de los resultados. Los resultados son observables normalmente a simple vista; sin embargo, las muestras que contienen una baja concentración del viroide reaccionan muy levemente. Estas reacciones son más fácilmente distinguibles si se observan los negativos ligeramente inclinados o sobre una mesa iluminada con fondo claro. Bajo las

TECNICA USADA EN EL LABORATORIO DE CITOGENETICA DEL CIP PARA DETERMINAR EL NUMERO DE CROMOSOMAS EN PAPA.

Dr. K.Watanabe-M.Orrillo. (1991)

INTRODUCCION

Para una correcta determinación del número de cromosomas es necesario contar con técnicas citológicas que den buenos resultados, con un número aceptable de metafases contables.

No hay una técnica universal, cada laboratorio toma una o varias de acuerdo a las exigencias de cada cultivo. Cromosomas metafásicos obtenidos de raíces, es el método más común en la citogenética de plantas.

Es necesario conocer la ploidía de una especie, clon, genotipo etc. siendo una gran ayuda en la determinación taxonómica, y de gran importancia en los programas de mejoramiento.

1.-MATERIALES: Sembrar en macetas pequeñas, con musgo bien fino, vermiculita o Promix, tubérculos bien brotados (también se pueden usar cuttings de plantas bien enraizadas, semillas germinadas, plantas de in-vitro). La colección de raíces se realiza en plantas bien pequeñas de unos 5-10 cm de altura. Unas horas antes de colectar es conveniente regar bien las plantas. La colección de las raíces se hace generalmente temprano, en la mañana.

2.-PRE-TRATAMIENTO: Usando una pinza de punta bien fina se colecta puntas de raíces, aproximadamente 10 mm y se coloca en vials conteniendo una solución de Ambush 50 EC, 15ul en agua helada a pH 5.8, por 24 horas a 4 °C. Caso de no tener disponible el Ambush utilizar agua helada por 48 horas a 4° C, colocando las botellitas conteniendo las raíces en un thermo con hielo. O usar 8-hydroxiquinoline.

3.-FIJACION: Es optativo, se puede obviar este paso si es que se desea ver las muestras inmediatamente, caso de querer guardar las muestras por más tiempo se fijaran en alcohol 96 % 3p : ácido acético 1p; y se deja a medio ambiente.

Si se quiere guardar en fijador hacerlo en alcohol de 70% y en refrigeración.

Los fijadores se preparan al instante.

4.-HIDROLISIS: Con HCl 1N a 60 °C de temperatura, por 8-10 minutos; el ácido se calentara previamente, transcurrido el tiempo de hidrolisis se procedera a quitar el ácido y a lavar con agua destilada.

5.-COLORACION: Con lacto-propiónico orceina u orceina-acética, se procede a colocar las raíces en pequeños petris conteniendo el colorante.

6.-SQUASH: Se colocan las raíces en un porta-objeto, usamos solamente 1-2 mm de la punta, con una gota del mismo colorante (también podemos usar ácido acético al 45 %), se coloca un cubre-objeto y asegurando uno de los extremos procedemos con el borrador de un lápiz o la punta de él a presionar suavemente, o dando golpecitos, pero firmes, extendiendose así el tejido. Colocar el porta-objeto entre papel de filtro y presionar fuerte con el dedo pulgar, pero tratando de evitar cualquier movimiento lateral del porta-objeto.

Preparación de Lacto-propiónico orceina: Disolver 1 g de orceina en una mezcla de 23 ml de ácido láctico y 23 ml de ácido propiónico a temperatura ambiente, completar a 100 ml con agua destilada, agitar bien y filtrar (Haskell y Wills, 1968).

NOTA: Para obtener buenos resultados es necesario tener muy buenas raíces, finas, no muy gruesas; las plantas deben estar en perfecto estado de desarrollo.

Otro pre-tratamiento que da buenos resultados es con agua helada, en lugar de Ambush se utiliza agua destilada helada por 48 horas a 4°C y colocando los vials que contienen las raicillas en un termo en el cual se ha colocado cubitos de hielo con agua, el resto del procedimiento es igual.

Otras técnicas utilizan 8-hydroxiquinoline 0.002 M, 0.029g para 100 ml de agua destilada, previamente se disuelve HQ en unas gotas de alcohol y se agrega el agua poco a poco, muy lentamente, haciendo uso de una bagueta por donde se deja deslizar el agua destilada. Por un mínimo de 3 horas, óptimo una 5 horas.

CONTEO DEL NUMERO DE CLOROPLASTOS EN LOS ESTOMAS

1. Colectar foliolos terminales de una misma planta.
2. Obtener tejido epidérmico de zona próxima las nervaduras, e inmediatamente colocarla sobre un porta-objetos una gota de solución de KI - I y cubrir con un cubre-objeto.
3. El contaje de cloroplastos se realiza en las células guardia de los estomas.

Preparación de KI-I

1. 1 g de KI
2. 1 g de I
3. Disolver en 100 ml de Etanol al 70%

Ref.

Guía de Investigación CIP 10 1995

"Técnicas biológicas para determinar el número de cloroplastos en las células guardias de los estomas"

Advances in Potato Cryopreservation by Vitrification

A.M. Golmirzaie and A. Panta¹

PROGRAM REPORT 95-96

The Cryopreservation Technique

Results

Conclusions

Selected Reading

One way to safeguard plant genetic resources against erosion is to use cryopreservation -storing plant material at ultralow temperature (-196°C) in liquid nitrogen (N).

Cryopreservation has been applied to more than 80 plant species and is considered a safe and less labor-consuming conservation method than in vitro maintenance. Stored material can be conserved indefinitely without genetic erosion. Because all chemical reactions cease in liquid N, no cell division occurs and cell degeneration or genetic changes cannot take place.

Potato cryopreservation work began in 1977. It has been carried out with excised meristems, pollen, shoot tips, cell cultures, and protoplast-derived cell colonies. Entire plants capable of undergoing normal tuberization have been obtained from cultures cryopreserved for 4 yr. These findings justify the application of cryopreservation to the long-term conservation of potato.

The in vitro Potato Base Collection (PBC) held at CIP contains more than 6,000 accessions and is increasing rapidly with new, improved material developed by geneticists. To reduce the cost and labor involved in maintenance, in 1995, in a United Nations Development Program collaborative project with Cornell University, CIP started testing cryopreservation by vitrification, a method developed by P. Steponkus. With this method, shoot tips (the meristem dome with several leaf primordia) are dehydrated by exposure to concentrated solutions of sugars and cryoprotectants, and are then frozen rapidly, thus preventing intracellular ice formation. The use of shoot tips has an advantage over other tissues because they can be regenerated into plants that are more faithfully identical to mother plants.

This article describes attempts to cryopreserve 183 potato genotypes and to assess the feasibility of this approach for storing the PBC.

The Cryopreservation Technique

In vitro growth of mother plants

The following genotypes to be cryopreserved were taken from the PBC: *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* (61), *S. chaucha* (1), *S. phureja* (38), *S. stenotomum* (57), *S. goniocalyx* (9), natural hybrids of *S. goniocalyx* x *S. stenotomum* (10), and *S. stenotomum* x *S. goniocalyx* (4), plus 3 other accessions whose species determination is under way. This material is now being conserved in in vitro long-term storage by slow growth at low temperature in a medium containing sorbitol as an osmotic growth retardant. Plants from long-term storage were micropropagated by single-node stem segments in tubes containing an MSA medium (Murashige-Skoog salts, 0.4

mg/L thiamin, 2 mg/L glycine, 0.5 mg/L nicotinic acid, 0.5 mg/L pyridoxine, 0.1 mg/L gibberellic acid, 2.5% sucrose, and 4 g/L SIGMA phytigel).

Improving in vitro growth of mother plants

We did this work with recalcitrant accessions-those that after being frozen two or three times did not survive. Plants coming from long-term storage were subcultured two or three times in magenta jars containing semisolid MSA propagation media and covered with a transparent polypropylene film with a filter (SIGMA, C6920) to increase exchange of air. The phytigel, the gelling agent of the MSA medium, was replaced by agar. The medium was poured into magenta jars in two layers: first a semisolid MSA medium (15 ml) containing agar, and then liquid MSA medium (10 ml). Plants were propagated by placing 9 single nodes on the medium in each jar. Several subcultures were required to increase the vigor of weak genotypes.

Cryopreservation by vitrification

The vitrification method, based on Steponkus's method, involves removing axillary shoot tips (1.5 mm long) from plantlets grown in vitro for 30-45 d. The shoot tips consist of 4-5 leaf primordia and the apical dome.

They are first precultured in a modified Murashige-Skoog medium (supplemented with 0.04 mg/L kinetin, 0.5 mg/L indoleacetic acid, and 0.2 mg/L gibberellic acid) containing 0.09 M sucrose for 24 h under proper incubation conditions for micropropagation. Next they are incubated in the same medium containing 0.06 M sucrose for 5 h at room temperature. The shoot tips are dehydrated by placing them in a vitrification solution containing ethylene glycol:sorbitol:bovine serum albumin (50:15:6 wt%) for 50 min at room temperature.

The shoot tips are then transferred to 0.25-ml propylene straws with 150 μ l of vitrification solution, and the straws are rapidly quenched in liquid N. Following storage in liquid N, the shoot tips are thawed, expelled from the straws into a hypertonic (1.5 osmolal) sorbitol solution at room temperature, and incubated for 30 min.

The shoot tips are then plated on a semisolid potato meristem medium containing Murashige-Skoog salts supplemented with 0.04 mg/L kinetin, 0.1 mg/L gibberellic acid, and 25 g/L sucrose, and maintained under normal incubation conditions for micropropagation. After 4-6 wk, survival was evaluated by counting plantlets growing from shoot tips.

With this procedure, all 183 selected genotypes were frozen and stored in liquid N. For each genotype 120 shoot tips were stored (Figure 1), and for dehydration control 20 shoot tips were loaded into straws (2 repetitions of 10 samples), where they continued to thaw without freezing.



Figure 1. Tank used at CIP for storage of cryopreserved potatoes. Tank capacity is 4,800 cryovials of 2 ml.

One day after freezing, 2 straws containing 10 shoot tips each were removed from the liquid N and the shoot tips were thawed. Survival was evaluated 6 wk after thawing (Figure 2). For accessions that did not respond even when evaluated three times, the stored shoot tips were discarded and the assay was repeated once or twice more, using dehydration times of 45, 55, and 60 min.

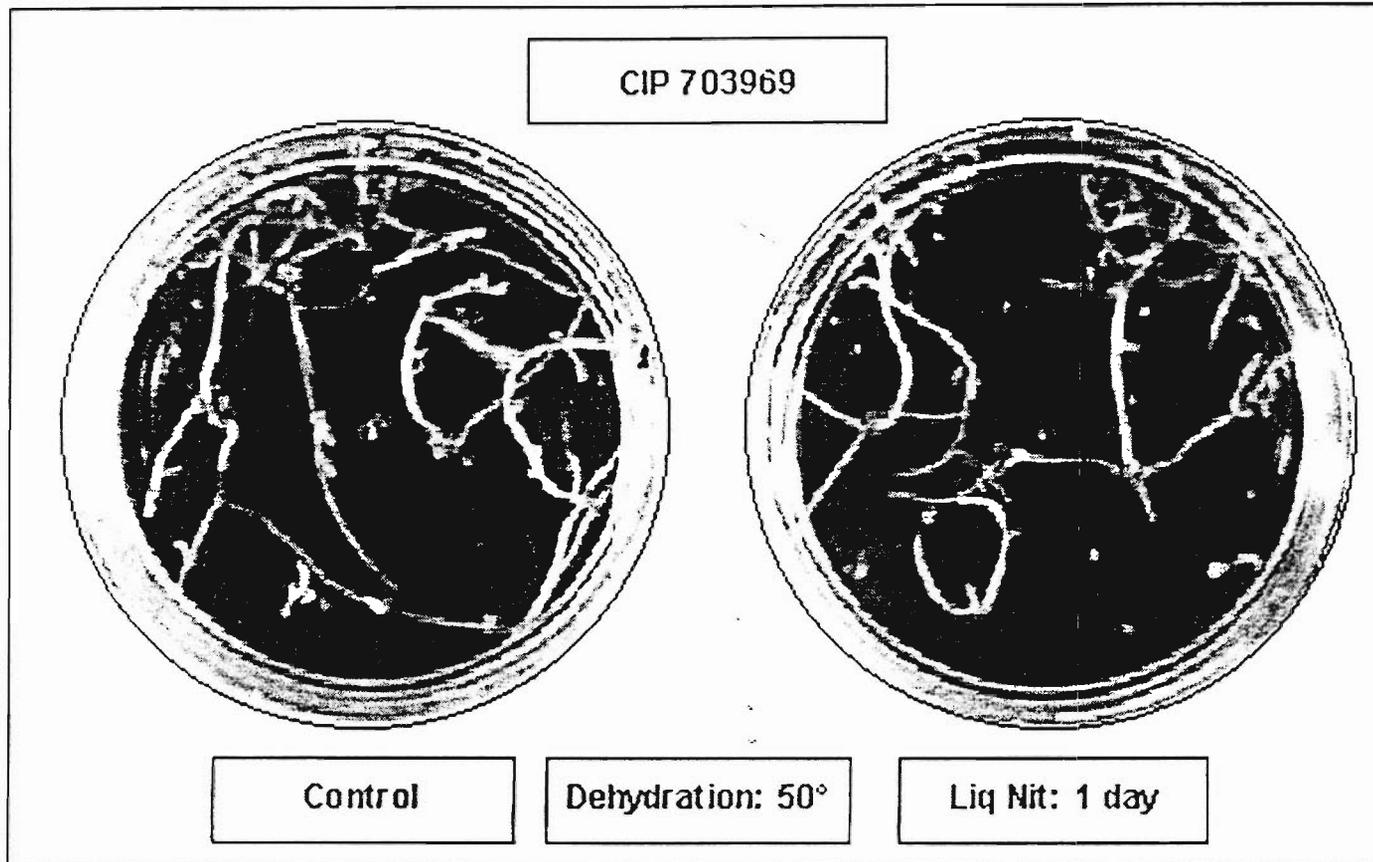


Figure 2. Plantlets of *S. tuberosum* subsp. *andigena* genotype after 6 wk of plating. Left: plate showing 70% survival from dehydrated shoot tips and shoot tips not frozen. Right: plate showing 60% survival after post-thaw of shoot tips.

Post-thaw recovery

Survival of 80 genotypes was evaluated by thawing 2 repetitions of 10 shoot tips of each genotype 3 mo after freezing. Shoot tips were thawed at room temperature and transferred to a recovery medium. After 6 wk, survival was evaluated by counting the number of regrowth plantlets. The plantlets were then transferred to an MSA medium.

Cryopreserving apical shoot tips from vigorous in vitro plants

Seven genotypes chosen randomly were micropropagated by several subcultures of apical tips in magenta jars. The growth time between subcultures was 3 wk. After 7 subcultures, 140 apical shoot tips from vigorous plants of each genotype were isolated. They were processed by the vitrification method using 50 min of dehydration.

Results

In vitro growth of mother plants

Some genotypes that were propagated in tubes containing a semisolid MSA medium showed symptoms of weakness, especially those that showed 0-20% survival after vitrification. They grew slowly, plantlets were thin, and leaves were small. Some showed a loss of apical dominance after 3 wk of propagation. The lack of vigor of these plants could be due to the sorbitol content in the medium used for long-term storage, which could have affected the plants' hormone balance. This

assumption needs more research to be confirmed. After culturing these genotypes in magenta jars, using at least 3 subcultures, plants were more vigorous, stems were stronger, leaves were bigger, and the lack of apical dominance was disappearing.

Post-thaw recovery

With thawing after 1 d of freezing, 69% of the genotypes tested were successfully recovered. Different survival levels were observed, which could be related to the vigor of mother plants or genotype dependence (Figure 3). With shoot tips isolated from more vigorous mother plants and with minor changes in dehydration time, the percentage of surviving genotypes increased to 75%. This increase resulted from changes in dehydration times (45, 55, and 60 min) for the recalcitrant accessions.

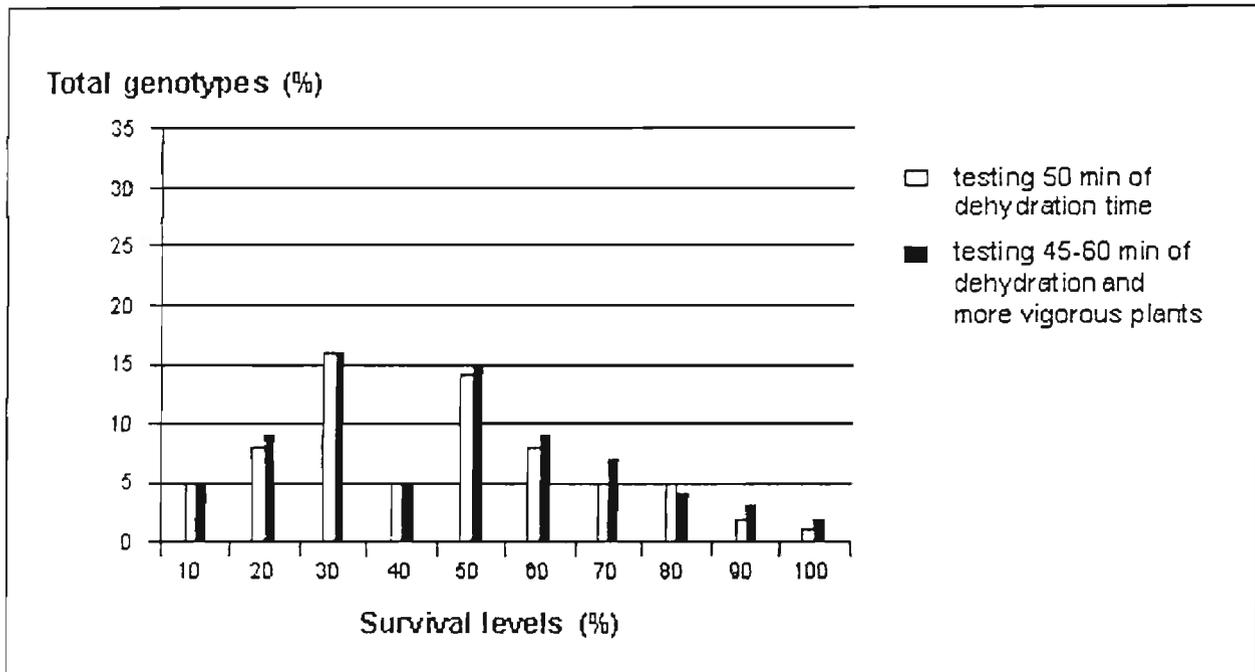


Figure 3. Survival percentage of potato shoot tips of 183 genotypes comparing the vitrification method using 50 min of dehydration vs. testing other periods of dehydration (45, 55, and 60 min) and more vigorous plants, CIP, 1995-96.

We obtained 10 more surviving accessions by making these modifications. Table 1 shows survival expressed by species or genotype group. The percentage of surviving genotypes varies from 72 to 80. The lowest average survival rate (29%) was found in *S. tuberosum* subsp. *andigena* and *S. goniocalyx* genotypes. The highest (47%) belonged to the natural hybrid *S. goniocalyx* x *S. stenotomum*. More research is needed to confirm whether this variation is due to differences between species.

Genotype	Ploidy	Genotypes evaluated (no.)	Surviving genotypes (%)	Average survival rate (%)
<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i>	4x	61	74	29
<i>S. phureja</i>	2x	38	74	41
<i>S. stenotomum</i>	2x	57	72	33
<i>S. goniocalyx</i>	2x	9	78	29
<i>S. chaucha</i>	3x	1	— ^a	30
Natural hybrids				
<i>S. goniocalyx</i> x <i>S. stenotomum</i>	2x 2x	10 4	80 75	47 45
<i>S. stenotomum</i> x <i>S. goniocalyx</i>				
Undetermined species		3	— ^a	50
Total		183	75	

a. Because of the low number of genotypes evaluated, survival percentage was not considered.

Table 1. Survival percentage of 183 genotypes and recovery rate of each species or group after cryopreservation by the vitrification method, CIP, 1995-1996.

We evaluated 80 genotypes for survival 3 mo after freezing. In the first evaluation (1 d after freezing), the average survival was 46%; after 3 mo it was 40%. This difference was not statistically significant. Theoretically, the survival rate should not change even if the plant material were stored for many years. To confirm this hypothesis, we plan a third evaluation after 1 year of freezing.

Cryopreserving apical shoot tips from vigorous in vitro plants

After we froze about 100 accessions, it became evident that plant vigor is a bottleneck in the cryopreservation process, and that the survival rate obtained by using axillary shoot tips varies by genotype. With apical shoot tips from vigorous plants, seven genotypes tested showed higher

CIP is now cryopreserving 145 potato accessions and trying to recover 100% of the genotypes to be cryopreserved. To reach this goal, we are improving the vitrification method and testing other methods, such as dehydration and encapsulation, and droplet methods that have been tested by other researchers with a wide range of crops.

We expect to be able to safely store the Potato Base Collection (approx. 4,000 accessions) using cryopreservation. Since this germplasm will eventually form a foundation for potato breeding work for future generations, we plan to emphasize genetic stability studies.

Selected Reading

Bajaj, Y.P.S. 1987. Cryopreservation of potato germplasm. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol.3: Potato. Springer-Verlag, Berlin. p. 472-486.

Benson, E.E., M. Wilkinson, A. Todd, U. Ekuere, and J. Lyon. 1996. Developmental competence and ploidy stability in plants regenerated from cryopreserved potato shoot-tips. *Cryo-Letters* 17:119-128.

Steponkus, P.L., R. Langis, and S. Fujikawa. 1992. Cryopreservation of plant tissues by vitrification. *Adv. Low-Temp. Biol.* 1:1-16.

1 CIP, Lima, Peru.

survival percentages (Table 2). The survival of two recalcitrant genotypes was over 50%, and the average survival rate increased from 31% to 67%. We planted five plants recovered from each genotype to evaluate phenotypic characters under greenhouse conditions.

Species	Genotype (CIP number)	Survival percentage using:	
		Axillary shoot tips ^a	Apical shoot tips from vigorous plant ^b
<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i>	703859	50	88
<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i>	700874	10	45
<i>S. phureja</i>	703579	30	70
<i>S. phureja</i>	703596	80	90
<i>S. phureja</i>	703600	0	55
<i>S. stenotomum</i>	703446	0	65
<i>S. stenotomum</i>	702586	50	55
Average		33	67

a. Survival evaluated by number of regrowth shoot tips from 2 repetitions of 10 frozen shoot tips.

b. Survival evaluated by number of regrowth shoot tips from 4 repetitions of 10 frozen shoot tips.

Table 2. Survival percentage of seven potato genotypes after cryopreservation by the vitrification method, comparing the use of axillary shoot tips with apical shoot tips from vigorous plants, CIP, 1995-1996.

Conclusions

The success obtained in this work shows the feasibility of applying cryopreservation techniques to the long-term storage of a wide range of potato genotypes. In this work, survival was evaluated strictly by the number of regrowth shoot tips; in other works, recovery has been evaluated by including leaf expansion without regrowth.

We also demonstrated that survival rate can be dramatically increased by improving the pregrowth conditions of plant material and by using apical shoot tips. Studies on the influence of different phenotypic and physiological characters of plants on the freezing process would help enhance their viability.

Evaluación de dos métodos de "tamizado" para probar la resistencia al Virus del Enrollamiento de la Papa (PLRV) en poblaciones de mejoramiento de papa, *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*

E. Mihovilovich, R. Rivera, W. Amorós, y M. Bonierbale

Objetivo

- Identificar una prueba de tamizado práctica y confiable, que permita la identificación temprana de progenitores genéticamente superiores de resistencia al PLRV, y la eliminación de las familias más susceptibles previo a los ensayos de campo en el programa de selección.

Experimentos

- Inoculación de plántulas con alta presión de áfidos (aprox. 80 áfidos por plántula).
- Inoculación de plántulas con bajas presión de áfidos (aprox. 20 áfidos por plántula).
- Inoculación de tubérculos brotados con un número estándar de 20 áfidos por plántula.
- Infección Natural en Campo :

San Ramón (Alta Presión)

Majes (Baja Presión)

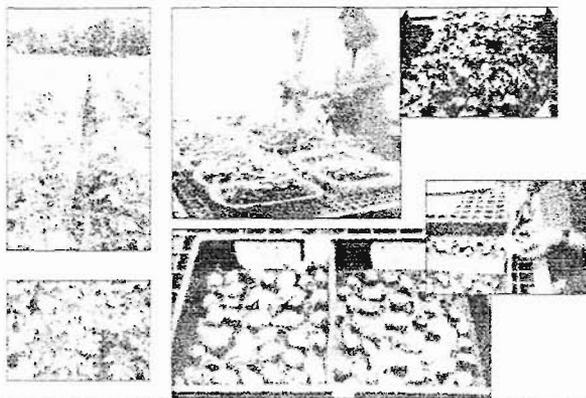
Diseño de BCA con 3 repeticiones de 40 individuos familia repetición

Diseño Genético II de Carolina del Norte de progenitores *tuberosum* con resistencia al PLRV

	C80.315 (S)	88.052 (R)	C93.139 (S)	88.106 (R)	LR93.050 (MR)	C80-206 (S)
C92.140(S)	X	X	X	✓	✓	X
92.118 (MR)	X	X	X	✓	X	X
92.111 (S)	✓	✓	✓	X	X	X
C91.640 (R)	✓	✓	X	X	X	X
C91.612(MR)	X	X	X	X	X	✓

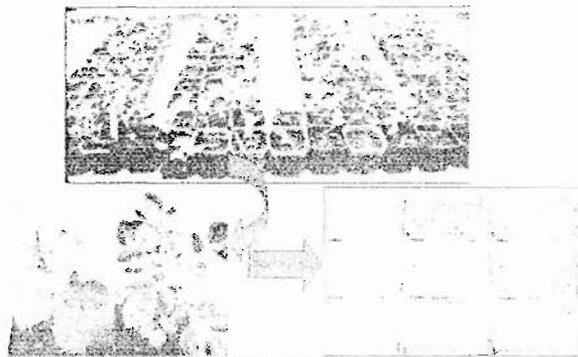
R= resistente, MR= medianamente resistente, S= susceptible

Métodos de Tamizado para resistencia al PLRV

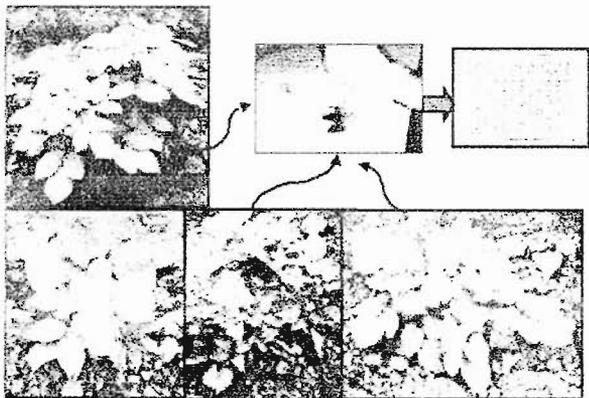


Transplante y Evaluación

➤ Transplante a macetas en invernadero



➤ Transplante a Campo



Estimador del Porcentaje de Resistencia

$$R = \frac{\text{N}^\circ \text{ plantas no infectadas (- al DAS-ELISA)}}{\text{N}^\circ \text{ total de plantas evaluadas/familia/repetición}}$$

Transformación a arco seno para normalizar los datos (sentencia SAS)

$$\text{Arcsin}(R) = \text{ARSIN}(\text{SQRT}(R/100)) * 180 / 3.1416$$

```
PROC ANOVA;  
CLASS REP Familia;  
MODEL arcasin(R) = Familia REP;  
RUN;  
QUIT;
```

Análisis de Varianza Ponderada usando la empírica transformación logística

- Condición Las respuestas de individuos dentro de las familias son mutuamente independientes
- Entonces el número de individuos negativos a ELISA familia (R) es una variable binomial al azar.

$$Z = \log [E (m-R)] \sim N (\log \theta (1-\theta), \{m \theta(1-\theta)\}) \quad (\text{Cox \& Snell, 1989}).$$

m = número de individuos familia

θ = probabilidad de éxito o E (R) = R/m

- El estimador de la varianza es $V = m^{-1} R (m-R)$

- Analisis Ponderado en SAS

```
proc glm data = one3 ;
  class rep madre padre;
  weight 1/V;
  model Z = rep madre padre padre*padre;
run;
```

Porcentaje de infección de 9 familias tamizadas bajo condiciones de invernadero e infección natural en campo

Familia	Inoculación en plántulas		Inoculación de brotes		
	Baja presión de áfidos	Alta presión de áfidos			
C82 140 x C1833 025	16	41	31	31	13
C82 140 x C8 042	13	58	39	21	6
C82 140 x C8 052	20	56	33	33	20
C82 140 x C8 108	34	52	52	52	26
C81 630 x C 89 315	29		40		
C82 140 x C30 129					
C81 632 x C30 066					
C82 140 x C8 108				39	
C82 140 x C89 315					
Promedio	26	72	50	44	27
CV (%)	13	9	9	18	21

Correlación entre métodos

Método de Tamizado		Inoculación de Plántulas		Inoculación de brotes	
		Alta presión	Baja presión	Alta presión	Baja presión
Inoculación en Plántulas	Alta presión	0.80	0.76	0.69	0.64
	Baja presión		0.87	0.77	0.44
Inoculación de brotes (C81 632 x C30 066)				0.76	0.75
Inoculación de brotes (C81 632 x C30 066)					0.61

Conclusiones

- Los métodos de tamizado de familias de plántulas, y tubérculos brotados ofrecen dos alternativas eficientes y prácticas para el tamizado para resistencia al PLRV.
- La selección del método dependerá del tipo de material disponible: familia de tubérculos, o de plántulas de semilla botánica.
- Ambos métodos resultan útiles para llevar a cabo pruebas de progenies, y selección de familias resistentes en una sola campaña (infección primaria) en condiciones de invernadero.
- La presión de áfidos a aplicar, dependerá del ciclo de mejoramiento, y base genética de resistencia de la población.

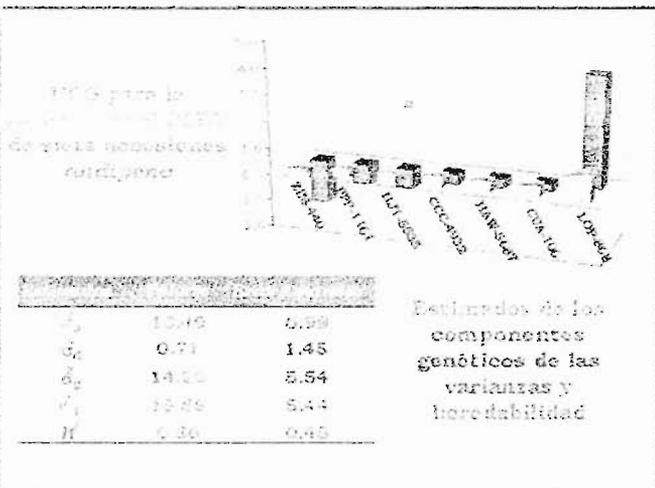
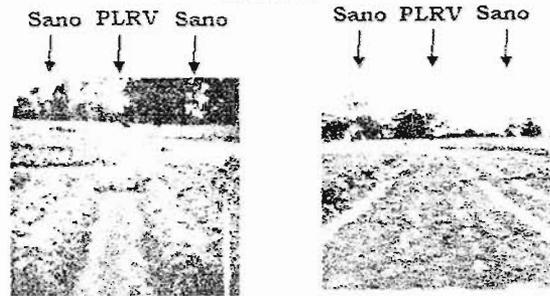
Caracterización genética y molecular de altos niveles de resistencia al PLRV en *S. tuberosum* subsp *andigena*

André Velásquez L.

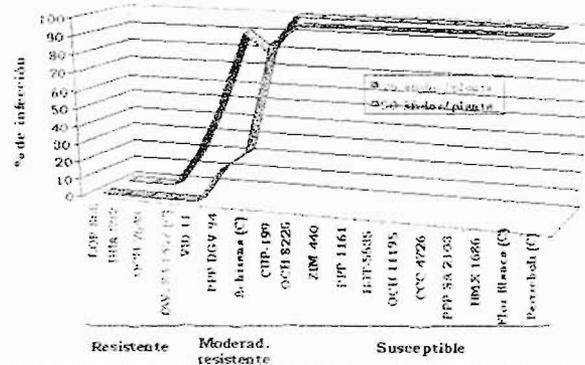
Proyecto de tesis para optar el título de Biólogo - Avances

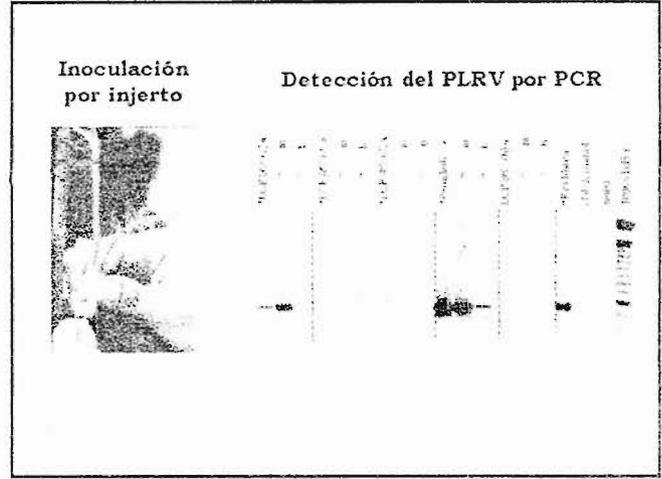
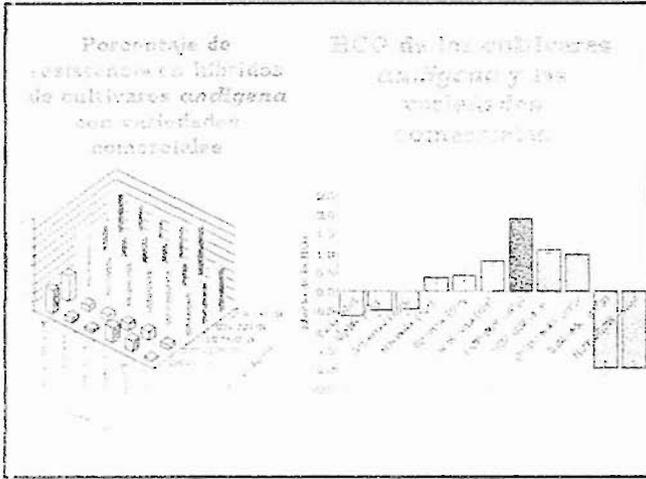
Justificación

Comparación en el rendimiento entre plantas sanas y plantas infectadas con el PLRV

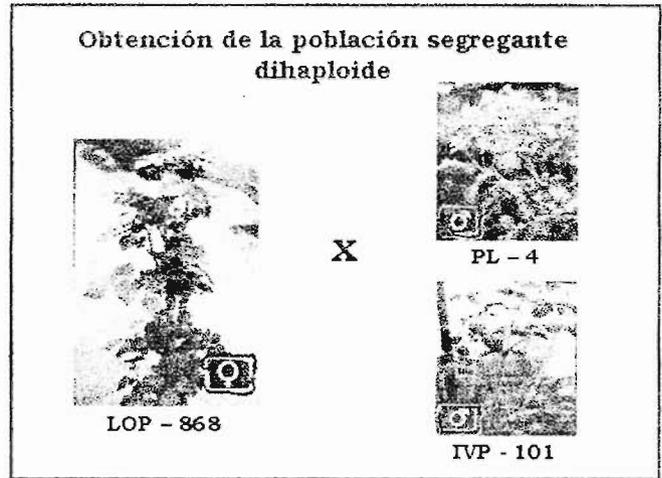


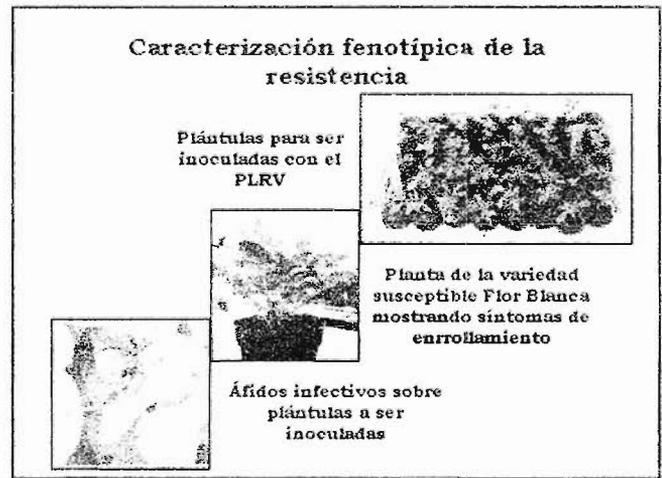
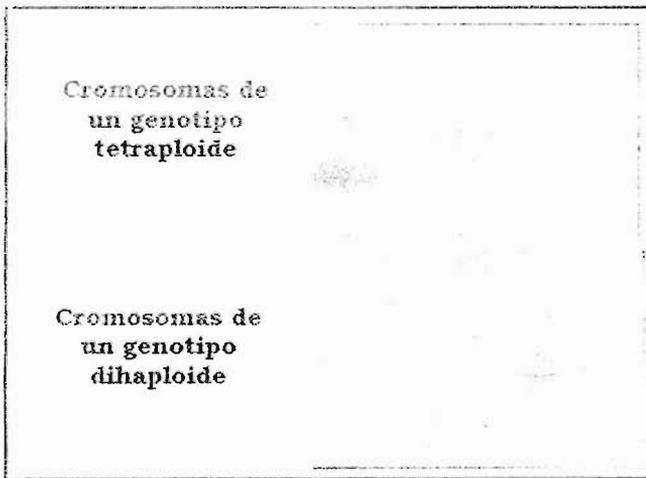
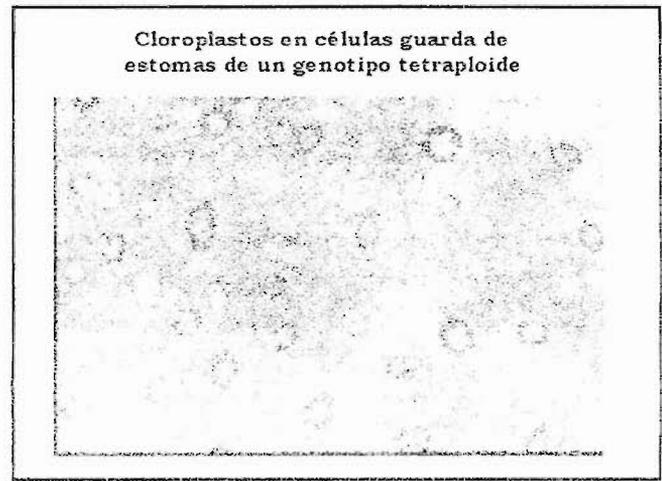
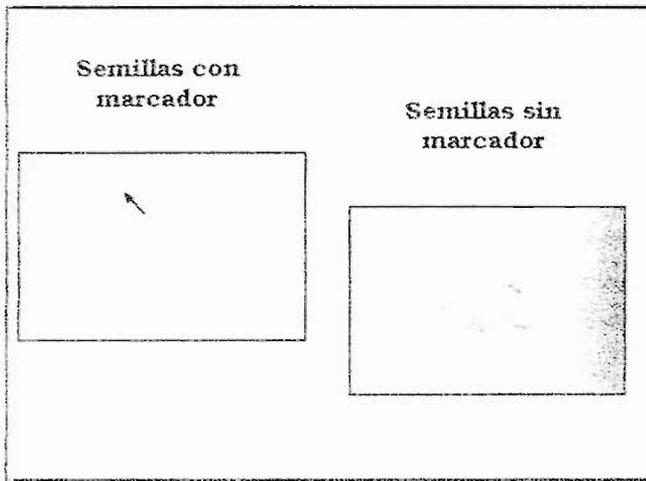
Porcentaje de infección de diferentes cultivares *andigena* y testigos utilizando diferentes presiones de infección



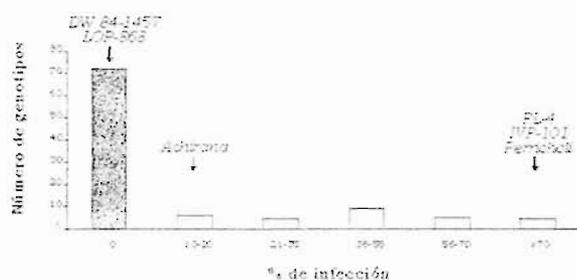


- Objetivos**
- Determinar la acción génica de la resistencia al PLRV en LOP - 868.
 - Encontrar marcadores moleculares en fase de acoplamiento con la resistencia al PLRV.





Distribución de la resistencia al PLRV



Análisis de la segregación

1R : 1S (gen dominante en estado simple)		Infectado	χ^2 (Prob=0.05)
Observado	72	27	0.00001
Esperado	49.50	49.50	
5R : 1S (gen dominante en estado duplé)		Infectado	χ^2 (Prob=0.05)
Observado	72	27	0.01083
Esperado	82.50	17.50	
3R : 1S (dos genes duplicados)		Infectado	χ^2 (Prob=0.05)
Observado	72	27	0.00001
Esperado	74.25	24.75	

Caracterización molecular

Prueba de independencia: Primer S047 (STM0030)

Alelo	Test	Observado		Esperado		Total	χ^2
		R	S	R	S		
a ₁	alelo	13	11	13	10	23	0.8939
	sin alelo	17	10	17	10	27	
	total	25	20	25	20	45	
a ₂	alelo	10	9	11	8	19	0.7358
	sin alelo	15	11	14	12	26	
	total	25	20	25	20	45	
a ₃	alelo	15	9	13	11	24	0.3162
	sin alelo	10	11	12	9	21	
	total	25	20	25	20	45	
a ₄	alelo	12	14	11	12	26	0.1376
	sin alelo	13	6	11	8	19	
	total	25	20	25	20	45	

Resultados

- Se tiene una población segregante dihaploide proveniente de LOP - 868 con 134 genotipos.
- La distribución de la resistencia al PLRV es bimodal con una proporción de 3 sanos : 1 infectado.
- Esto se ajusta a lo esperado para dos loci con efectos duplicados.
- Una prueba de NASH y PCR confirmarán los fenotipos y la distribución en la que se basa el modelo.
- Se evaluará un mayor número de SSR en la búsqueda de asociación de éstos con la resistencia al PLRV.