



INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA

DEPARTAMENTO NACIONAL
DE BIOTECNOLOGÍA

INFORME ANUAL 2008

Compilación y edición general:
Eduardo Morillo V.

Quito – Ecuador
Mayo, 2009



INDICE	pg.
Presentación	3
Personal DNB 2008	4
Ámbito estratégico	5
PROYECTO BIOTECNOLOGÍA (D212-023)	6
<i>Resultado 1: Mejoramiento de la infraestructura de los laboratorios EESC y EECH</i>	
A1: Readequación de aéreas operativas de los laboratorios	10
A2: Adquisición de equipamiento e insumos	12
<i>Resultado 2: Consolidación de biotecnologías mediante actividades de Investigación</i>	
A3: Monitoreo de la Homogeneidad Genética de la variedad de Quinua INIAP- Tunkahuan en campo de agricultores	16
A4: Validación de dobles haploides en maíz por marcaje molecular	23
A5: Caracterización molecular de cepas de antracnosis	25
<i>Resultado 3: Prestación de servicios biotecnológicos para usuarios externos e internos</i>	
A6: Genotipaje e identificación molecular	27
A7: Generar protocolos para la propagación in vitro de diversas especies	29
A8: Propagación in vitro de microplantas	30
<i>Resultado 4: Capacitación</i>	
A9: Taller institucional de Biotecnología	31
A10: Talleres de diagnóstico con agroproductores para la oferta de servicios	36
PROYECTO: MULTIPLICACIÓN DE PLANTAS Y ESTUDIOS ESPECIALES IN VITRO	40
<i>Resultado 1: Propagación in vitro</i>	
A1: Multiplicación de plantas libres de virus para producción de semilla prebasica	42
A2: Multiplicación de plantas irradiadas de papa (para precocidad)	43
A3: Multiplicación de plantas irradiadas de papa (para resistencia)	47
A4: Limpieza de virus en 10 variedades nativas de papa	50
A5: Mantenimiento in vitro de 31 clones promisorios de yuca del CIAT	52
A6: Multiplicación in vitro de naranjilla	53
A7: Multiplicación in vitro de mora y naranjilla	55
<i>Resultado 2: Estudios especiales en cultivo de tejidos</i>	
A1: Ensayos de cultivo de anteras en cuatro genotipos de maíz	57
PROYECTO: OTRAS ACTIVIDADES COLABORATIVAS CON PROGRAMAS Y DEPARTAMENTOS	62
<i>Resultado 1: Establecer actividades colaborativas o servicios con programas y departamentos del INIAP</i>	
A1: Caracterización molecular de la colección nacional de maní	63
A2: Caracterización molecular de germoplasma de mora con RAPDs y AFLPs	66
A3: Caracterización molecular de la colección nacional de frejol arbustivo con fines de uso y mejoramiento genético	71
PROYECTO: GESTIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA Y LA BIOSEGURIDAD	73
<i>Resultado 1: El INIAP participa en redes y grupos de trabajo relacionados con Biotecnología y Bioseguridad</i>	
A1: Participación en la coordinación de REDBIO	75
PROYECTO: PROGRAMA DE AGROBIOTECNOLOGÍA DEL PROCIANDINO	76
<i>Resultado: Contribuir al fomento de la Agrobiotecnología en los INIAs a través de un programa con PROCIANDINO</i>	
A1: Realizar un estado de arte de la agrobiotecnología en el Ecuador	78
FIGURAS	80
ANEXOS	84

PRESENTACION

El 2008 constituye el año de consolidación del Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) y particularmente de la unidad EESC. Los avances y resultados alcanzados son tangibles; a nivel de infraestructura, gracias al financiamiento de los proyectos de Apoyo al Plan de Gobierno (SENPLADES), se han ampliado los laboratorios del instituto en las tres unidades operativas del DNB (EESC, EECH y EETP). Específicamente para el Dpto. de Biotecnología de la EESC, los laboratorios de Biología Molecular y Cultivo de tejidos cuentan con nuevas áreas que ofrecen las facilidades necesarias para operatividad, investigación y prestación de servicios. El proceso de equipamiento de los laboratorios está prácticamente finalizado, sobresaliendo la implementación de una plataforma de alta tecnología para análisis moleculares de fragmentos y genotipificación, y un laboratorio de propagación in vitro que deberá responder a la creciente demanda de plantas. Así mismo, el proceso de fortalecimiento ha venido acompañado de la conformación de un grupo de trabajo especializado en biotecnología que deberá consolidarse e incrementarse a corto plazo para responder a la creciente demanda de servicios e investigación, no solo por parte de usuarios internos al instituto, sino externos. En el 2009 existen nuevos retos, y los esfuerzos se centralizaran en la oferta, promoción y prestación de servicios de los laboratorios, de manera de contribuir a la sostenibilidad del Departamento y rentabilizar la gran inversión realizada en el 2008. La prestación de servicios de los laboratorios es un proceso en fase avanzada de implementación definiéndose, al momento, el siguiente menú de servicios: a) genotipaje automatizado para marcadores microsatelites y AFLPs, b) clonaje y secuenciación de ADN, c) Diagnostico por métodos de PCR para virus y patógenos, d) Propagación masiva de plantas in vitro y, e) erradicación de virus y limpieza de material. Este menú de servicios podrá incrementarse en función de las necesidades del sector productivo a identificarse mediante la realización de talleres de consulta con agroproductores y académicos a nivel nacional.

Este informe presenta los resultados y avances logrados por el Departamento de Biotecnología de la EESC durante su primer año de gestión desde la oficialización de la creación del Dpto. Nacional de Biotecnología en Enero del 2008. Se presentan los resultados alcanzados en cada una de las actividades ejecutadas en cinco proyectos o grupos de actividades:

- *Fortalecimiento de los laboratorios de Biotecnología y sus prestaciones de servicios (Proyecto BIOTECNOLOGÍA, SENPLADES D212-023)*
- *Multiplicación de plantas y estudios especiales in vitro*
- *PROCIANDINO, Componente de Agrobiotecnología*
- *Otras actividades colaborativas con programas y Departamentos*
- *Gestión de la Biotecnología y la Bioseguridad*

Esperamos que este informe sea un aporte no sólo para los directivos, investigadores y técnicos del INIAP, sino para otros actores externos al instituto vinculados directa o indirectamente con la investigación agropecuaria y más específicamente con la agrobiotecnología.

PERSONAL EN EL AÑO 2008

Personal en la sede del Departamento Nacional de Biotecnología (EESC):

Biol. Eduardo Morillo, Ph.D	Resp. Dpto. Biotecnología EESC y Líder DNB
Ing. Agr. Jacqueline Benitez ¹	Cultivo de tejidos, propagación e investigación
Ing. Biot. Gabriela Miño	Biología molecular (Proyecto BIOTECNOLOGÍA)
Ing. Biot. Karina Garcia ²	Biología molecular, P. Fortalecimiento-Leguminosas
Egda. Patricia Garrido	Becaria-Proyecto Mora-lulo (FONTAGRO)
Egda. Paola Gonzalez	Becaria-Proyecto BIOTECNOLOGÍA
Egda. Maria Aguilar	Becaria-Proyecto BIOTECNOLOGÍA-CEA
Egda. Johanna Duque	Becaria-Proyecto BIOTECNOLOGÍA-CEA
Egdo. Victor Almeida	Tesista-Proyecto CEA
Egda. Fernanda Salazar	Tesita-Proyecto CEA
Egdo. Carlos Delgado	Tesista

¹ Desde Marzo 2008 – Traspaso del Dpto. de Producción de Semillas

² Desde Septiembre 2008

ÁMBITO ESTRATÉGICO DEL DNB

Misión

Implementar y proporcionar biotecnologías modernas de fitomejoramiento, fitotecnia, patología molecular y caracterización de la agrobiodiversidad, que contribuyan en los procesos de investigación del Instituto; que le permita ser competitivo en el ámbito nacional e internacional y ser actor en políticas de biotecnología y bioseguridad.

Visión

El Departamento Nacional de Biotecnología del INIAP, a través de sus productos y servicios, contribuye a que el Instituto sea líder a nivel nacional en la innovación y desarrollo agrobiotecnológico y protagonista en la toma de decisiones relacionadas con agrobiotecnología (ABT) y bioseguridad.

Objetivos

General:

Centralizar y fortalecer las actividades de investigación en Biotecnología en el INIAP, en pro del mejoramiento productivo del país y la generación de conocimiento al servicio del sector público y privado.

Específicos:

- Innovar y aplicar biotecnologías en los procesos de caracterización genética, fitomejoramiento asistido, fitotecnia, patología molecular y cultivo *in vitro*
- Apoyar a los programas y departamentos que ejecuten actividades con componentes biotecnológicos
- Ejecutar proyectos y establecer vínculos con organismos nacionales e internacionales, universidades y empresa privada en ABT
- Coordinar actividades a nivel nacional para optimizar y promover el mejoramiento permanente de recursos (infraestructura, equipamiento, etc.)
- Capacitar a técnicos e investigadores en el uso de agrobiotecnologías
- Coordinar actividades con redes, instituciones y organismos nacionales e internacionales en relación con ABT
- Establecer convenios con universidades que permitan capacitar a estudiantes y egresados en el manejo y uso de ABT

Valores

- Infraestructura, equipamiento y recursos de alta tecnología
- Uno de los mejor equipados laboratorios del país
- Oferta de servicios e investigación
- Capacidad técnica y científica para la formulación y ejecución de proyectos
- Personal altamente capacitado

Políticas

- Formulación de proyectos de investigación y desarrollo agrobiotecnológico
- Participación en instancias relacionadas con gestión de la ABT y agrobioseguridad
- Reclutamiento de personal especializado en biotecnología con alto potencial en investigación
- Capacitación continua del personal
- Actividades colaborativas con actores en Biotecnología dentro y fuera de la institución

Proyecto: Fortalecimiento de los Laboratorios de Biotecnología y sus prestaciones de servicios (PROYECTO BIOTECNOLOGÍA)

Código: D21.00.050.001 (SENPLADES D212-023)

Responsable: E. Morillo

Instituciones participantes: INIAP (Dptos. Biotecnología EESC y EECH)

❖ Introducción

El gran auge de la Biotecnología en la investigación agropecuaria se evidencia en los últimos 20 años con múltiples aplicaciones. En el caso del Ecuador, como en el resto de la región, el desarrollo de la biotecnología está en aumento. Según un diagnóstico de Wendt & Izquierdo (2002), Ecuador tiene un alto potencial para el desarrollo de la agrobiotecnología, debido a varios factores:

- Una alta biodiversidad (no suficientemente investigada y documentada),
- Recurso humano capacitado en el extranjero con nuevos conocimientos, ideas y contactos con instituciones de investigación a nivel internacional,
- Mejoramiento en la infraestructura (varios laboratorios se encuentran en una fase de implementación o reestructuración que conlleva a la adquisición de nuevos equipos, mejor formación académica en el ámbito de la biotecnología y el aumento de capacidades para la realización de proyectos de investigación).

La Biotecnología está empezando a tomar fuerza, proyectos que involucran procesos biotecnológicos están siendo desarrollados tanto en el sector público como en el privado. Las entidades privadas se han orientado mayoritariamente al mejoramiento de productos alimenticios, seguido de la ecología (protección al medio ambiente), animales y salud humana. Las entidades públicas, se encuentran distribuidas en los diferentes sectores, con el de alimentos al cabeza, seguido del de salud humana, animales y agrícola. La empresa privada es quien cuenta con la mayor infraestructura (44%), 13% lo ocupan las Fundaciones y ONGs, Universidades (11%) y 11% los Institutos de Investigación.

En el área agrícola se observa un incremento del uso de biotecnologías en el país. Varias empresas privadas utilizan herramientas biotecnológicas (flores, banano por ejemplo). Este interés también se ve reflejado en el INIAP, donde con pocas excepciones, el uso de biotecnologías estaba hasta recientemente casi restringido a la conservación y caracterización de recursos fitogenéticos. Así, biotecnologías como la de cultivo de tejidos han contribuido en varios ámbitos a la misión del banco de germoplasma; conservación *in vitro* de especies de semilla recalcitrante, micropropagación, erradicación de virus, entre otros. En la última década se implementa un laboratorio de Biología Molecular, y se da inicio a la utilización de marcadores moleculares en estudios de caracterización de germoplasma e identificación genética de variedades comerciales. Se evidencia entonces un interés creciente de mejoradores y técnicos de otros departamentos (programas de mejoramiento, protección vegetal) por beneficiarse de las biotecnologías, particularmente del uso de técnicas moleculares. No se puede tampoco dejar de mencionar de la inminente aplicabilidad de estas tecnologías en la detección de cultivos transgénicos o productos derivados de la biotecnología del ADN recombinante (OVMs), tema en el que el país tiene una posición definida en su nueva constitución política.

En el caso particular del INIAP su reto actual es el de incorporar métodos modernos como las biotecnologías, que permitan cumplir con mayor eficiencia y actualización los objetivos de la institución. El fortalecimiento de los laboratorios del Departamento Nacional de Biotecnología es fundamental para cumplir con este reto y contribuye a la consolidación institucional en esta área de punta, de necesaria valoración nacional y cuya aplicación es imprescindible en el ámbito actual de investigación. Este macroproyecto busca consolidar el DNB a través del fortalecimiento técnico operativo de los laboratorios de Biotecnología EESC y EECH con el fin de mejorar su capacidad operacional en pro del sector agropecuario del país. En el INIAP los beneficiarios son investigadores, técnicos y estudiantes en recursos genéticos, programas de fitomejoramiento (reducción en el tiempo de obtención de variedades mejoradas), y otros (Protección vegetal, identificación de OVMs o productos biotecnológicos, diagnóstico de enfermedades por marcaje molecular, identificación genética de variedades, entre otros). En el

ámbito externo al instituto, el proyecto beneficiara a actores del sector agroproductivo con la oferta de biotecnologías para su implementación en sus programas de investigación y producción.

❖ **Objetivos del proyecto**

General:

Fortalecer la infraestructura técnica y operativa de los laboratorios de Biotecnología del INIAP (EESC y EECH) para el beneficio de la investigación agropecuaria del país y la oferta de biotecnologías al sector académico y privado.

Específicos:

- Mejorar la infraestructura técnica-operativa de los laboratorios EESC y EECH para la implementación de tecnologías de punta articulada con un programa institucional a mediano plazo
- Implementar una plataforma automatizada de genotipaje para la caracterización fina de ADN mediante actividades de investigación y prestación de servicios
- Implementar biotecnologías con el fin de detección de genes de interés
- Realizar estudios de patología molecular que aportan al conocimiento de la diversidad genética de patógenos que afectan a cultivos de importancia local
- Implementar servicios biotecnológicos de acuerdo a los requerimientos técnicos y productivos del sector privado y preparar un equipo de investigadores especializados en biotecnología mediante capacitación y difusión de resultados

❖ **Palabras clave**

Biotecnología agrícola, equipamiento, infraestructura, servicios, capacitación

❖ **Indicadores del proyecto**

- Se contribuirá al incremento de la productividad agropecuaria mediante el establecimiento de un programa institucional en biotecnología que será operativo desde el 2008
- Se aplicarán diferentes herramientas Biotecnológicas a especies de importancia para el país y ofertar servicios a productores y empresa privada.
- Se planificará y se apoyara el desarrollo armónico de otras unidades de biotecnología de acuerdo a las necesidades y demandas institucionales
- Se dará inicio a un proceso de racionalización y expansión en Biotecnología mediante la coordinación de actividades, el fortalecimiento de capacidades y el equipamiento de la institución.
- Se apoyará las iniciativas de los programas de mejoramiento genético en incursionar en la selección asistida mediante el uso de marcadores moleculares
- Se coordinará con el Departamento de Protección Vegetal la ejecución de estudios de Patología Molecular destinado a la caracterización de microorganismos y plagas.
- Se incursionará en nuevas áreas en donde las herramientas biotecnológicas puedan jugar un rol protagónico para la solución de problemas relacionados con la agricultura
- Se formará un equipo de técnicos e investigadores capacitados en agrobiotecnología

❖ **Resultados, avances y discusión**

1. Se dispone en el laboratorio de la EESC de equipo de alta tecnología para genotipificación y análisis de fragmentos de ADN: un LI-COR modelo 4300S y un secuenciador a capilaridad modelo ABI-PRISM 310.

2. Los trabajos de ampliación y adecuación de la infraestructura del laboratorio de la EECH se entregaron a conformidad en Octubre 2008.

3. A mediados de septiembre se iniciaron los trabajos de ampliación de los laboratorios EESC con la construcción de 340m² en dos bloques destinados a los laboratorios de Biología Molecular y Cultivo de Tejidos en planta alta, y áreas de oficinas y bodega en planta baja. Los trabajos se iniciaron con un mes de retraso por el trámite administrativo. La entrega de la obra está prevista para mediados de enero 2009.

4. Se han avanzado actividades de investigación bajo la modalidad de tesis de grado (detalladas posteriormente en sus actividades respectivas) integrando el uso y perfeccionamiento de equipamiento adquirido con el proyecto.

5. Existe la demanda de usuarios internos y externos por servicios de los laboratorios de Biotecnología. Investigadores y profesionales del sector académico y privado solicitan servicios en genotipificación, análisis moleculares y propagación masiva de material limpio.

6. Se realizó un primer seminario-taller de promoción de los servicios de los laboratorios de Biotecnología, y diagnóstico de necesidades del sector agroproductivo. Este evento se realizó el 10 de Noviembre en Guayaquil y contó con la participación de 52 productores, agroempresarios, exportadores, investigadores y técnicos. El evento se realizó en el Hotel Ramada de Guayaquil el 10 de noviembre de 2008, y contó con la colaboración del Centro de Biotecnología de la ESPOL (CIBE). Los objetivos del evento fueron: 1) Promocionar los servicios que prestan los nuevos laboratorios de Biotecnología del INIAP, y; 2) Realizar un diagnóstico de las principales demandas del sector productivo e identificar los aspectos en los que el INIAP y la ESPOL podrían contribuir a la solución de los problemas más acuciantes de la producción agrícola en la provincia. Se brindó además información sobre el trabajo de investigación, desarrollo y transferencia tecnológica que realizan estos dos centros biotecnológicos en la actualidad (Mas detalle sobre los resultados alcanzados en el detalle de la actividad).

7. Se finalizó la adquisición de equipos previstos en el proyecto para el primer año de ejecución del mismo. En diciembre se realizó el traspaso de equipos adquiridos con el proyecto, de la EESC a la unidad EECH.

❖ **Conclusiones y recomendaciones:**

El proyecto de Apoyo al Plan Agropecuario "Fortalecimiento de los Laboratorios de Biotecnología y sus prestaciones de servicios (BIOTECNOLOGIA)" está en su segundo año de ejecución real aunque en su tercer año de ejecución fiscal (Se iniciaron actividades en noviembre 2007). El proyecto es operativo a través de cuatro componentes integrales: 1) Mejoramiento de la infraestructura de los laboratorios; 2) Consolidación de biotecnologías mediante actividades de investigación, 3) La prestación de servicios biotecnológicos para usuarios externos e internos, y, 4) Capacitación. En 17 meses de operatividad, el proyecto ha centrado esfuerzos en el cumplimiento de los componentes 1 y 2, alcanzándose porcentajes de avance del 90% para estos objetivos. Para el 2009 se tiene planificado la consecución del componente 3 una vez que se dispone de nuevo equipamiento e infraestructura. Como producto del proyecto, en la actualidad el INIAP dispone de nuevos laboratorios de Biotecnología en la EESC y la EECH, con readecuación de áreas antiguas y nuevo equipamiento y capacidad tecnológica. El proceso de adquisición de equipos para los dos laboratorios esta avanzado en un 90%, sobresaliendo la compra de dos secuenciadores genómicos de última generación para la implementación de una plataforma semiautomatizada de genotipificación que le permite al INIAP ofertar un servicio con tecnología de punta inexistente en el país. La prestación de servicios de los laboratorios es un proceso en fase avanzada de implementación definiéndose el siguiente menú de servicios: a) genotipaje automatizado para marcadores microsatelites y AFLPs, b) clonaje y secuenciación de ADN, c) Diagnostico por métodos de PCR para virus y patógenos, d) Propagación masiva de plantas in vitro y limpieza de material. Este menú de servicios podrá incrementarse en función de las necesidades del sector productivo que están detectándose mediante la realización de talleres de consulta con agroproductores y académicos a nivel nacional. Finalmente en relación al

componente de capacitación, el personal involucrado con el proyecto ha participado en eventos científicos de Agrobiotecnología además de realizar pasantías y entrenamientos especializados.

❖ **Bibliografía citada**

Wendt J. e Izquierdo J. (2002). Manejo y gestión de la biotecnología agrícola apropiada para pequeños productores: estudio de caso Ecuador. Publicacion REDBIO Internacional, FAO. 73p.

Resultado 1: Mejoramiento de la infraestructura de los laboratorios
Actividad A1: **Readecuación de las áreas operativas de los Laboratorios EESC y EECH**
Responsable: E. Morillo, D. Peña (EECH)

❖ **Introducción**

Con el fin de disponer en INIAP de laboratorios con una infraestructura adecuada para la implementación de equipos de alta tecnología, y la posterior prestación de servicios e investigación en los campos de procesos biotecnológicos agropecuarios, el proyecto BIOTECNOLOGIA programó realizar una readecuación y ampliación de los Laboratorios de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina y de la Estación Experimental del Austro (antes EECH).

❖ **Propósitos y resultados por lograr**

Disponer de infraestructura adecuada para la implementación de servicios en investigación biotecnológica en los Laboratorios de Biotecnología de la EESC y la EECH.

❖ **Objetivos:**

- Ampliar las áreas operativas de los Laboratorios de Biotecnología de las EESC
- Ampliar las áreas operativas de los Laboratorios de Biotecnología de las EECH

❖ **Hipótesis:**

La ampliación de los laboratorios de Biotecnología permitirá fortalecer los procesos de investigación y prestación de servicios biotecnológicos del INIAP

❖ **Materiales y métodos**

Para la ampliación de los Laboratorios se requiere de un diseño arquitectónico. Este trabajo se realizó mediante la contratación de un especialista, quien realizó los planos y la propuesta económica de la ampliación.

En base al diseño arquitectónico y los rubros económicos se presentó la proforma de la ampliación de los Laboratorios. Se convocó a concurso de merecimientos en los dos Laboratorios, siendo acreditado en EECH el Arq. Andrés Criollo y en EESC el Arq. Gustavo Muñoz. Los montos de los contratos fueron de 96.091,00 USD y 36.083.57 respectivamente.

❖ **Resultados, avances y discusión**

EECH: El laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Chuquipata (EECH) disponía de una infraestructura física de 107 m², con las siguientes áreas: 1) Laboratorio de biología molecular con un solo ambiente, y, 2) Laboratorio de cultivo de tejidos, constaba de una sala para desinfección del material y preparación de medios de cultivo, una pequeña área de aislamiento y autoclavado, una sala de siembra y una sala de crecimiento de plantas. Con financiamiento del proyecto se realizó la adecuación del laboratorio existente en planta baja para implementación del laboratorio de Biología Molecular con división de áreas, y se realizó un diseño para la construcción de una segunda planta destinada al Laboratorio de Cultivo de Tejidos (Anexo 1). En Diciembre del 2008 se realizó la entrega de la obra de la ampliación de los Laboratorios de Biotecnología a la ocasión de la inauguración de la nueva Estación Experimental del Austro (Anexo 2).

EESC: Se contrató con el proyecto un fiscalizador para la obra de ampliación de los laboratorios de la EESC, quien emitió informes técnicos previos la entrega de la misma. Los trabajos de ampliación de los laboratorios de Biotecnología de la EESC se entregaron a satisfacción en Febrero del 2009. Las nuevas instalaciones de los laboratorios EESC tienen la siguiente distribución:

Bloque sur: para el laboratorio de Cultivo de Tejidos en la planta alta, con cinco áreas operativas: preparación de medios, autoclavado, dos salas para siembra y un cuarto de cultivo; y una bodega en la planta baja. Este laboratorio está destinado a la producción de vitroplantas y a la investigación.

Bloque norte: en la planta alta se han diseñado cuatro nuevas áreas para el laboratorio de Biología Molecular: sala de autoclavado, sala de gases, sala de genotipaje y sala de preparación. En la planta baja se ubica el area de oficinas (jefatura, secretaria, técnicos y estudiantes) y una bodega. Una fotodocumentacion de las nuevas instalaciones se muestra en el anexo 3.

❖ Conclusiones y recomendaciones

En relación a los laboratorios de la EECH, los trabajos de ampliación y adecuación han sido entregados a conformidad con lo establecido. En la planta baja del laboratorio se implementó el laboratorio de Biología Molecular y oficinas, y en la planta alta se adecuó el laboratorio de Cultivo de tejidos. El proyecto ha invertido cerca de 80mil USD en el 2008 en esta unidad mediante el financiamiento de personal técnico (un profesional y una persona de apoyo por un año), equipamiento, vehiculo y la ampliación y adecuación delos laboratorios. Con esta alta inversión, se espera que le laboratorio de Biotecnologia de la EECH empiece a producir y a prestar servicios biotecnológicos de calidad en el 2009.

Los laboratorios del Dpto. de Biotecnologia de la EESC requieren de trabajos complementarios para una operatividad apropiada y en vista de la inauguración de sus nuevas instalaciones en el segundo semestre del 2009. Entregados los trabajos de ampliación, el Dpto. de Biotecnologías dispone de una superficie superior a los 500m² lo que lo convierten en la actualidad en uno de los laboratorios de biotecnología de mayor superficie en el país, y con potencial para la adecuada implemnetacion de biotecnologías de punta.

Resultado 1:	Mejoramiento de la infraestructura de los laboratorios
Actividad A2:	Adquisición de equipamiento e insumos
Responsable:	E. Morillo, G. Miño

❖ Introducción

La biotecnología agrícola ofrece a Ecuador y los países de América Latina un importante potencial de beneficios y, de hecho, algunos de ellos ya los están aprovechando y de manera bastante significativa. La situación, sin embargo, es de bastante diversidad, tanto en lo que hace a las capacidades de investigación como a la posición en que los países se encuentran para hacer un pleno aprovechamiento de lo que les ofrecen las nuevas tecnologías. En la práctica, solo algunos de los países de la región serán capaces de justificar las inversiones necesarias para ser innovadores, ya sea en el área general o con respecto a aspectos específicos como pueden ser las tecnologías nuevas implementadas en nuestro país. En este contexto general, los procesos de equipamiento de laboratorios de biotecnología tienen que estar acorde con las tecnologías modernas o de punta existentes en los países desarrollados, y facilitar así la implementación de tecnologías de alto nivel y la prestación de servicios de calidad.

❖ Propósitos y resultados por lograr

Se busca equipar los laboratorios de Biología Molecular y Cultivo de tejidos con equipos de alta tecnología para la prestación de servicios biotecnológicos, e implementar una plataforma automatizada de genotipaje con equipos de tecnología de punta.

❖ Objetivo:

- Adquirir equipos e insumos para Biotecnología e implementarla en los nuevos laboratorios de la EESC y EECH.

❖ Hipótesis:

Los equipos e insumos adquiridos permiten fortalecer los laboratorios de biotecnología para sus prestaciones de servicios biotecnológicos.

❖ Materiales y métodos

Para la implementación de una plataforma de genotipaje semiautomatizada se realizó la adquisición de dos secuenciadores, cada uno de los cuales maneja diferentes tecnologías de fluorescencia y de detección de fragmentos de ADN:

- Un LI-COR modelo 4300s LI-COR: El LI-COR 4300 es un nuevo sistema de análisis de ADN con una tecnología innovadora y su diseño permite varias aplicaciones como secuenciación de ADN, análisis de microsatélites, AFLP, TILLING, screennig o detección rápida de polimorfismos (SNPs, inserciones, deleciones o variaciones del tamaño de los microsatélites) bien en poblaciones con mutaciones inducidas (TILLING) o naturales (ECOTILLING). El software específico de microsatélites, SAGA-GT, permite la gestión de proyectos con imágenes formato tiff así como el genotipado automático con algoritmos tipo "allele fingerprinting", no susceptibles a error por la presencia de bandas específicas. El software específico de AFLPs, SAGA-MX, automatiza la interpretación de los patrones así como las combinaciones de primers para la obtención de datos polimorficos.
- Un secuenciador ABI-PRISM 310 de un capilar: es un analizador genético automatizado de alta tecnología que permite realizar una amplia gama de secuenciación y análisis de fragmentos además se puede realizar análisis de ligamientos, detección de SNPs, descubrimiento y la validación de nuevas secuencias, detección de mutaciones, estudio de genes, identificación de microorganismos, genotipaje de virus, y muchas otras aplicaciones. Funciona de forma automática inyectando las muestras en un capilar previamente cargado con un polímero de acrilamida permitiendo resolver fragmentos de

ADN de cadena sencilla que se diferencian en una única base. A una altura determinada el láser detecta la fluorescencia emitida por cada cadena sencilla de ADN fluorescente y traduce esta emisión de fluorescencia en la secuencia correspondiente. Una vez desarrollada la electroforesis de la primera muestra, el capilar se vacía rellenándose nuevamente con polímero fresco. Se inyecta a continuación una segunda muestra, se procede a desarrollar nuevamente la electroforesis y así sucesivamente (Rodríguez, 2008).

Ha existido así mismo la capacitación en el manejo de estos equipos, es muy necesario el entrenamiento con personal capacitado para la implementación y puesta en marcha de los equipos. Para el LI-COR se recibió una capacitación especializada por parte del Dr. Michael van Waes en Abril del 2008 (una semana), en la que realizó la instalación del equipo y se recibió la capacitación teórica-práctica del manejo y aplicaciones del genotpiador. Finalizada la capacitación, se inició a trabajar en la estandarización de protocolos para Microsatélites y AFLPs, así como el adiestramiento en la lectura y análisis de datos con el software SAGA exclusivo para SSR y AFLPs.

Para el secuenciador ABI se recibió una capacitación por parte de la Ing. Luz Adriana Cifuentes, de la empresa EXOGENA, Colombia (representante de Applied Biosystems para Ecuador) del 2 al 6 de Febrero del 2009. Los objetivos de la capacitación fueron el entrenamiento operativo del ABI-310, manejo y adiestramiento en el software Data Collection, calibración y mantenimiento del equipo, y análisis de resultados en el software GeneMapper y SeqScape para análisis de fragmentos y secuencias respectivamente.

Además se realizó la adquisición de otros equipos implementando y fortaleciendo las áreas de Biología Molecular y Cultivo de Tejidos de la EESC y EECH. La cantidad de equipos adquiridos, su utilización y la distribución de los mismos se detallan en el cuadro 1. Una fotodocumentación de los equipos adquiridos para la EESC se presenta en el anexo 4.

Cuadro 1. Lista de equipos adquiridos con el proyecto BIOTECNOLOGIA en el 2008.

CANTIDAD	EQUIPO	UTILIZACIÓN	EESC		EECH	
			BM	CT	BM	CT
3	Agitadores Vórtex	Agitar por vibración circular a tubos y soluciones	X		X	X
2	Agotadores Magnéticos (Shakers)	Agitar soluciones de medios para cultivo de tejidos y para la tinción de plata de geles de poliacrilamida en Biología Molecular		X	X	
1	Autoclave Horizontal Semiautomática	Autoclavar material y soluciones necesarias para el Laboratorio	X			
1	Balanza Analítica	Pesar reactivos e insumos con un rango de medida de 0.01 gr	X			
2	Balanza Precisión 2000 gr	Pesar reactivos e insumos hasta 2000 gr con un rango de medida de 0.1 gr	X			
1	Baño María	Conferir temperatura uniforme a una sustancia líquida o sólida o para calentar muestras a una temperatura y tiempo determinada			X	
2	Cabina de Flujo laminar Horizontal	Mantener un flujo constante para trabajar bajo condiciones de asepsia		X		X
3	Agitadores Vórtex	Agitar por vibración circular a tubos y soluciones	X		X	X
2	Agotadores Magnéticos (Shakers)	Agitar soluciones de medios para cultivo de tejidos y para la tinción de plata de geles		X	X	

1	Autoclave Horizontal Semiautomática	Autoclavar material y soluciones necesarias para el Laboratorio	X			
1	Balanza Analítica	Pesar reactivos e insumos con un rango de 0.01 gr	X			
2	Balanza Precisión 2000 gr	Pesar reactivos e insumos hasta 2000 gr con un rango de medida de 0.1 gr	X			
1	Baño Maria	Conferir temperatura uniforme a una sustancia líquida o sólida o para calentar muestras a una temperatura y tiempo determinada			X	
2	Cabina de Flujo laminar Horizontal	Mantener un flujo constante para trabajar bajo condiciones de asepsia		X		X
1	Cámaras de Termoterapia (Fitotron)	Permite el crecimiento, germinación de plantas, semillas, bajo condiciones controladas de temperatura y tiempo		X		
1	Centrifuga Refrigerada de placas pcr	Centrifugar placas pcr y tubos falcom. Tiene un rango de temperatura de 0 a 50°C, y una velocidad hasta 3500 rpm	X			
1	Destilador de agua	Producir agua destilada a partir de agua potable	X			
1	Esteriomicroscopio	Observar muestras de cultivo de tejidos y meristemas				X
1	Extractor de gases y humos (Sorbona)	Capturar, contener y expulsar las emisiones generadas por sustancias químicas peligrosas	X			
1	Fotodocumentador (Transiluminador e impreso térmica)	Documentar las imágenes provenientes del transiluminador.	X			
2	Fuentes de Poder	Administrar una corriente constante de voltaje para realizar electroforesis vertical	X		X	
1	Horno Esterilizador	Esterilizar material de Laboratorio	X			
3	Incubadora (Estufa de Cultivo)	Incubar muestras microbianas, patógenas, bacterias competentes y microplantas	X	X	X	
1	Microcentrifuga de tubos eppendorf	Separar fases de distintas densidades o para precipitar células o moléculas que se encuentran inmersas en una fase líquida	X			
2	phMetros	Medir de pH para soluciones preparadas	X	X		
4	Platos Agitadores Calentadores. Hotplate	Calentar, agitar, preparar soluciones en el Laboratorio	X	X	X	X
1	Secuenciador ABI PRISM 310 de un capilar	Realizar secuenciación de cadenas de ADN y análisis de fragmentos por electroforesis capilar	X			
1	Secuenciador DNA Analyzer 4300 s LI-COR	Analizar el ADN mediante análisis de microsátélites, AFLP, TILLING, screennig o detección rápida de polimorfismos	X			
1	Sellador de placas	Sella placas PCR para evitar la evaporación de muestras.	X			
1	Tanque de Crioconservación	Permite almacenar nitrógeno líquido	X			

1	Termobloque	Calentar tubos eppendorf de 1.5ml a determinadas temperaturas.			X	
2	Termocicladores a Gradiente. Biometra	Permite realizar PCR con temperaturas a gradiente.	X			

❖ Resultados, avances y discusión

El proceso de fortalecimiento del proyecto apuntó a la implementación de equipos biotecnológicos de alta tecnología, para la puesta en marcha de una plataforma de genotipaje en el laboratorio de biología molecular.

Con la ampliación de los laboratorios de biotecnología se dispone de áreas operativas adecuadas para el funcionamiento de equipos de alta tecnología, necesarios para la optimización de procesos y prestación de servicios

Los insumos y reactivos adquiridos servirán para las diferentes actividades del Departamento de Biotecnología como para la prestación de servicios en el campo de biología molecular como en análisis de genotipaje mediante el DNA Analyzer 4300 LI-COR.

Mediante la capacitación especializada realizada por los instructores y capacitadores, los técnicos del Departamento tienen un conocimiento inicial apropiado en el manejo de los equipos así como su análisis de datos mediante el software implementado. En la capacitación del ABI se realizó una evaluación del manejo operatorio del secuenciador dando un certificado exclusivo para el manejo del equipo, sin este certificado no se puede manipular ni manejar el equipo.

❖ Conclusiones y recomendaciones

- La adquisición de equipos e insumos para el Departamento de Biotecnología permitió la implementación y fortalecimiento de las nuevas áreas de los laboratorios de EESC y EECH, obteniendo Laboratorios equipados de alta tecnología en el país para la prestación de servicios e investigación biotecnológica.
- La adquisición de equipos permitió la implementación del Laboratorio de Biología Molecular en la EECH y el fortalecimiento de los existentes en la EESC, siendo implementado en este último una plataforma de genotipaje con dos equipos de alta tecnología en análisis molecular como son el LI-COR y un ABI-PRISM.
- La implementación de la plataforma de genotipaje permite realizar en el laboratorio de Biología Molecular de EESC análisis moleculares de alta confiabilidad y exactitud, siendo el único laboratorio que presta servicios de genotipaje de este tipo en el país.
- En la capacitación del secuenciador ABI se obtuvo el certificado de manejo de equipo por parte de Applied Biosystems para Eduardo Morillo, Gabriela Miño y Karina García.

❖ Bibliografía citada:

Rodríguez, 2008. Secuenciación automática de ADN. Servicio de Secuenciación automática de ADN. Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB - CSIC). <http://www.iib.uam.es/servicios/seq/otros/SecuenciaADN/biomed1.htm#capilares>

Resultado 2:	Consolidación de biotecnologías mediante actividades de investigación
Actividad A3:	Monitoreo de la Homogeneidad Genética de la variedad de Quinua INIAP-Tunkahuan en campo de agricultores
Responsable:	E. Morillo, P. González

❖ Introducción

La evidencia de flujo de genes entre cultivos y sus parientes silvestres es un proceso con implicaciones importantes en materia de conservación de la diversidad genética y el mejoramiento. La introgresión entre poblaciones silvestres y formas domesticadas es un fenómeno recurrente en la mayoría de especies, tanto autógamas como alógamas, y que puede llevar a la incorporación de genes en una población desde una u otras poblaciones (Papa, 2005). En la última década, se ha centralizado mucha atención en la hibridación cultivo-maleza como un potencial canal para el escape de transgenes en poblaciones naturales (Ellstrand et al. 1999). Es importante señalar que la documentación disponible es inferior en los centros de origen, y particularmente en la región Andina no existen casos documentados de flujo de genes espontáneos entre cultivos y formas silvestres. En este contexto, las observaciones e información actuales hacen que la quinua sea una especie de interés potencial para abordar esta temática. En efecto, en zonas andinas del Ecuador se observa una mezcla en la producción de quinua, incluyéndose la presencia de granos oscuros y pequeños en la producción de la variedad INIAP-Tunkahuan u otras variedades criollas, estimándose un porcentaje de mezcla en 2 a 5% del rendimiento del cultivo, pero que según últimas informaciones estaría en progresivo aumento (J. Ortega¹, com. pers. 2007). El origen de este problema es desconocido y ocasiona pérdidas en la comercialización de este cultivo. Podría explicarse por mezclas indeseadas ocurridas al momento de la cosecha, debido a la presencia de quinuas silvestres o ashpas quinuas en campos de producción, o también por contaminación genética de las variedades cultivadas que se encuentran en simpatria con quinuas maleza.

❖ Propósitos y resultados por lograr

El propósito de esta actividad es hacer uso de marcadores moleculares ideales en genética de poblaciones (microsatélites), que proporcionaran la información necesaria para determinar si existen cambios relativos en las frecuencias alélicas en la variedad INIAP-Tunkahuan en campo de agricultores, así como identificar la existencia de alelos cuya presencia pueda atribuirse a fenómenos de flujo genético con las especies silvestres; lo cual permitirá inferir si existe una “contaminación genética” de la variedad o si es una mezcla mecánica que podría darse durante la cosecha.

❖ Objetivos

General:

Monitorear la integridad genética de quinua (*Chenopodium quinua W.*) de la variedad INIAP-Tunkahuan de materiales provenientes de las principales zonas productoras de la sierra ecuatoriana a través de marcadores moleculares.

Específicos:

- Analizar la variabilidad genética de la variedad INIAP-Tunkahuan liberada por INIAP y la producida en campo de agricultores.
- Determinar si existen interacciones genéticas entre formas silvestres y cultivadas de quinua en campo de agricultores, y si este mecanismo es bi-direccional
- Establecer si la introgresión genética a partir de formas silvestres explica la mezcla de grano observada en campo de agricultores

❖ Hipótesis:

Ho. La mezcla que se observa en campos de producción no se explica por un proceso de flujo genético entre formas silvestres y cultivadas de quinua.

❖ Materiales y métodos

Material vegetal: El muestreo se realizó en las provincias de Imbabura (cantón Otavalo, localidad San Rafael), Carchi (a 240 Km al norte de Quito, cantón Espejo y la localidad San Gabriel), Bolívar (cantón Guaranda, localidad Guanujo), y la provincia de Chimborazo (cantón Colta, las localidades Tanquis y La puntilla), obteniéndose 180 muestras correspondientes a veinte lotes de producción y tres poblaciones silvestres. Se realizó una inspección de los lotes de producción a fin de identificar si existía simpatria de formas silvestres y variedades criollas o comerciales; (complejo *weed-crop*), además se muestrearon poblaciones de quinua silvestre de lugares cercanos a los cultivos y bordes del camino. Para el muestreo de lotes de producción se realizó el muestreo de 10 plantas, tanto cultivadas como quinuas maleza. Las muestras foliares se conservaron en silica gel para la extracción de ADN en laboratorio. En total del trabajo en campo, se obtuvieron 180 muestras, 92 correspondieron a quinuas cultivadas criollas o comerciales, 60 a quinuas malezas y 28 a poblaciones silvestres. A este set de materiales se incluyeron 10 muestras de la variedad Iniap-Tunkahuan conservadas en el Banco Nacional de Germoplasma del INIAP.

Genotipaje de microsatélites: Para la extracción del ADN genómico se utilizó el protocolo de Colombo et al. (1998). La integridad y concentración de ADN se determinó por fluorescencia con bromuro de etidio en geles de agarosa al 1% y utilizando un marcador de concentración de referencia (DNA Low Mass Ladder, Invitrogen Cat. No. 10068-013 GIBCO BRL). Se probaron 20 microsatélites de motif dinucleotídico de los reportados por Mason et al. (2005), de los cuales se seleccionaron ocho por su calidad de amplificación y polimorfismo en geles de acrilamida 6% teñidos con nitrato de plata según lo indicado en Morillo (2002) (Tabla 1). El coctel de amplificación en reacciones contenía 10 ng de DNA, 1.5 mM MgCl₂, 1X buffer PCR, 0.4 mM dNTP's, 5 mM de primer R y F, y 0.04 u/ul de Taq polimerasa (Invitrogen M11615-010). El programa de amplificación utilizado fue: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización cíclica a 94°C por 45 seg, 45 seg de anillamiento a 45 - 56°C, 1 min de elongación cíclica a 72°C, y un ciclo final de elongación a 72°C por 10 min, por último la estabilización de 10°C por 5 min.

Tabla 1. Microsatélites y primers de quinua utilizados en el presente estudio (Mason et al. 2005).

No.	Locus	Secuencia Motif	Size (pb)	Tm (°C)
1	QCA015	(AC)17	190	49.3
2	QCA026	(TG)12	187	48
3	QCA030	(CA)13	177	45.6
4	QCA034	(CA)16	170	50.8
5	QCA040	(CA)13	198	51
6	QCA046	(CA)18	165	54.8
7	QCA055	(TG)14	198	53.5
8	QCA056	(TG)13	172	45

Para el genotipaje se utilizó el método M13-Tailing (Ref. IRDye 829-05565) en un secuenciador LI-COR 4300S (Li-Cor, Lincoln, NE, USA). La reacción de PCR contuvo 10 ng de DNA, 2.5 mM MgCl₂, 1X buffer PCR, 0.4 mM dNTPs, 0.01 mM primer Forward-M13, 0.15 mM primer reverse, 0.01 μM del marcaje de fluorescencia (700 u 800 nm), 0.083 μ/μl de Taq polimerasa. Se probaron combinaciones en dúplex de los 8 primers seleccionados (Tabla 1), determinándose dos combinaciones de primers posibles: 1) QCA34 x QCA40 con un marcaje de 800 nm; y, 2) QCA46 x QCA55 con un marcaje de 700 nm. La adquisición de imágenes del gel fue efectuada por el LI-COR 4300S e importada para su análisis y lectura al software SAGA GT- microsatélites versión 3.3 (LI-COR Ref. 46539.). La matriz de datos obtenida se importó a Microsoft EXCEL para posteriormente realizar los análisis estadísticos correspondientes.

Análisis estadístico: Los datos de genotipos fueron transformados a datos binarios de ausencia o presencia de cada alelo para su importación a los programas NTSYS ver. 2.02 (Rohlf, 1995), y el macro GENALEX Versión 6.0 (Peakall et al. 2005). En el primero se realizaron análisis de Agrupamiento y de Coordenadas Principales (PCO) y en el segundo se realizó:

- a) Un análisis molecular de varianza (AMOVA) (Excoffier et al. 1992) con el fin de determinar el porcentaje de varianza que aporta a la diferenciación entre poblaciones (en nuestro caso: cultivado, silvestre y malezas),
- b) El cálculo de la distancia genética de Nei, medida que tiene la propiedad de que cuando los "loci" en estudio son neutrales, y aparecen nuevas mutaciones en nuevos alelos (modelo de los alelos infinitos), la distancia aumenta linealmente con el tiempo (Hedrick, 2000).

Para analizar la existencia de flujo genético reciente entre los grupos silvestre, cultivado y maleza se utilizó el método de asignación de genotipos o método Bayesiano con el software STRUCTURE 2.1 (Pritchard et al. 2000). Este programa utiliza algoritmos de agrupamiento Bayesianos con los métodos en cadena de Montecarlo MCMC (Monte Carlo Markov Chain) y la asignación de genotipos a un número predeterminado de poblaciones (K) de un número de muestras (X) en base al equilibrio de Hardy-Weinberg y equilibrio de ligamiento. Este método asume un modelo de K poblaciones, cada una caracterizada por un set de frecuencias de alelos para cada locus. Los individuos en la muestra son asignados probabilísticamente a poblaciones, o asignados a dos o más poblaciones si sus genotipos indican que tienen genotipos similares. La magnitud y dirección del flujo genético están basados en la proporción de ancestros estimados de cada individuo (q) y cada población (Q) (Martínez-Castillo et al. 2007).

❖ Resultados

Presentamos los resultados obtenidos del análisis de 77 muestras obtenidas de lotes y poblaciones silvestres en las provincias de Chimborazo, Imbabura, Carchi y Bolívar, correspondientes a (Tabla 2):

- 49 plantas en lotes de producción (22 de grano blanco, 7 de grano moteado (gris) y 20 de mallas, ósea de grano negro),
- 10 plantas de la variedad INIAP-Tunkahuán del Banco Nacional de Germoplasma, colectadas en la provincia de Carchi en 1986
- 21 plantas silvestres

Tabla 2. Status de las muestras de quinua empleadas en este estudio

Origen de la planta	Estatus de Colecta			Total
	Silvestre	Cultivado	Maleza	
Colecta 2008	21	39	7	67
Banco Germoplasma INIAP	0	10	0	10
Total	21	49	7	77

Diversidad Global: Los patrones de amplificación de microsatelites corresponden a los esperados para una especie tetraploide de herencia disómica. Esto se confirma por la observación de un máximo de tres bandas por los locus QCA55, QCA15, QCA56, QCA26, QCA30, mientras que los locus QCA034 QCA046 y QCA040 amplificaron un máximo de dos alelos por individuo. Se obtuvieron también amplificaciones nulas para los ocho loci a pesar de ensayos sucesivos de amplificación. En total se registraron 84 alelos para los 77 individuos evaluados cuyos pesos oscilan entre 165 a 199 pb. El rango superior de diferenciación alélica entre alelos fue de 44 pb. A nivel de diversidad alélica, el loci que presento mayor variabilidad fue el QCA26 con 18 alelos mientras que otros (QCA30, QCA40 y QCA46) presentaron una variabilidad más modesta con cinco alelos. En la figura 1, se muestran patrones de amplificación para los primers QCA46 y QCA55, observándose la existencia de alelos compartidos entre quinuas silvestres y plantas cultivadas en campo de agricultores.

Alelos privados y alelos compartidos entre formas silvestres y cultivadas de quinua: El grupo de quinuas cultivadas (c), silvestres y mallas revelaron un número similar de alelos (42, 41 y 40 alelos respectivamente). Sin embargo se detectaron alelos privados de acuerdo al status de las plantas, así el grupo de cultivadas presento 26, las quinuas malezas 11 y las silvestres 15, como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Número de alelos registrados, frecuentes y privados para quinua según su status de colecta: cultivado (c), maleza (m) y silvestre (w).

Parámetro	Status		
	C	M	W
No. Alelos	42	40	41
No. Alelos Freq. >= 5%	29	40	35
No. Alelos privados	26	11	15

En la mayoría de locus SSR se observaron alelos compartidos entre la quinua cultivada de grano blanco y la quinua silvestre, a excepción de los locus QCA56, QCA26 y QCA46. Además se observó la presencia del alelo QCA30-195pb, frecuente en las poblaciones silvestres de quinua en muestras de lotes de producción en la provincia de Bolívar, Imbabura y Chimborazo a bajas frecuencias, y ausente en la variedad INIAP-Tunkahúan del banco de germoplasma (Tabla 3). Así mismo, los locus QCA55 con el alelo 198 y el locus QCA15 con el alelo 204 se encuentran presentes en muestras de quinua cultivada, así como en las poblaciones silvestres, correspondiendo a posibles alelos introgresados (Tabla 3 y Fig. 1).

Tabla 3. Frecuencias de presencia de alelos SSR compartidos entre quinuas cultivadas, maleza y silvestres.

LOCUS	ALELO	QUINUAS CULTIVADAS	QUINUAS MALEZA	QUINUAS SILVESTRES
QCA15	204	0,727	0,375	0,571
QCA26	179	0	1	0,941
QCA30	195	0,745	1	1
QCA55	198	0,326	0,625	0,81
QCA55	236	0,093	0,125	0,714
QCA34	140	1	1	1
QCA40	206	0,894	1	1
QCA40	216	0,957	1	0,667
QCA46	161	0	1	0,947

Diferenciación genética entre quinuas cultivadas, malezas y silvestres: El parámetro F_{st} se mide en una escala de 0 a 1, mientras mayor es el valor menos intercambio genético hay entre las poblaciones. Una variación de 0,05-0,15 sugiere una mínima diferenciación, de 0,15-0,25 cuando es moderada, y superior a 0,25 cuando hay gran diferenciación genética. Como se puede observar en la tabla 4, el cálculo del F_{st} determinó una diferencia genética moderada de 0.224 entre los grupos de quinua cultivado y silvestre, mientras que respecto a las quinuas maleza o mallas el valor fue bajo (0.118), en cambio entre las quinuas malezas y las quinuas silvestres el valor obtenido fue de 0.216 (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de diferenciación F_{st} entre quinuas cultivadas, maleza y poblaciones silvestres

STATUS	Cultivado	Silvestre
Cultivado	-----	-----
Maleza	0.1182	0.216
Silvestre	0.2244	-----

Estructura genética: El Cluster análisis resolvió un árbol en el que se distinguen dos grupos principales: el grupo G1 que incluye a las quinuas cultivadas y el grupo G2 que incluye a las quinuas silvestres (muy posiblemente correspondientes a la especie *C. hircinum* Schrad.). En el grupo G1 se reconocen dos subgrupos: un primero (A) que agrupo a quinuas de grano blanco, moteado, negro (mallas), y accesiones de la variedad Tunkahuan del Banco de Germoplasma del INIAP; y el subgrupo B representado por dos muestras, una malla y una de grano moteado.

En el grupo G2 se determina al subgrupo C que incluye a la población silvestre *C. hircinum*, el subgrupo D que comprende plantas muestreadas en lotes de producción pero designada genéticamente como maleza (ver resultados test de asignación) y *C. hircinum*. En el subgrupo E se ubica una muestra asignada como maleza por que proviene de un lote de producción de quinua cultivada. Así mismo se obtuvieron diez pares de muestras con un 100% de similitud genética. Así mismo el PCO (Figura 2), a través de la primera coordenada que extrae el 34.7 % de la variación total distingue a las quinuas silvestres de las quinuas cultivadas del resto, mientras que el componente 2 que extrae el 11.9 % aporta a una diferenciación entre quinuas cultivadas, explicando entre ambas un 46.6% de la variación total. En la representación en dos dimensiones se pudo diferenciar dos grupos a través de la primera coordenada, G1 que incluye a las quinuas cultivadas (de grano blanco, grano moteado, grano negro), diferenciándose las plantas de la variedad Tunkahúan del Banco Nacional de Germoplasma en la parte inferior de la segunda coordenada (en círculo), y el grupo G2 que incluye a las quinuas silvestres y malezas o mallas provenientes de lotes de producción. Obsérvese la posición intermedia entre ambos grupos de la muestra q182 que corresponde a una malla o quinua maleza.

Análisis de asignación genética: Para el análisis de asignación genética cuando $K=3$, ESTRUCTURA distingue tres grupos en el material en estudio: cultivado, silvestre y maleza. Los resultados del test asignaron a 29 genotipos al grupo silvestre, 28 al grupo maleza, 15 al grupo cultivado y 5 individuos (q136, q111, q129, q173, q182) no fueron asignados a ninguno de los tres grupos, obteniéndose valores de asignación (q) intermedios (desde 0.594 hasta 0.399), por lo que estos individuos pueden considerarse como genotipos de naturaleza híbrida. De 21 plantas con estatus de colecta “no cultivado”, todas fueron asignadas al grupo silvestre; de 36 plantas muestreadas en estado “cultivado”, 21 fueron asignadas al grupo maleza y de 20 plantas con estatus de colecta “maleza”, 8 fueron asignados al grupo silvestre (Figura 3).

Mientras que el análisis realizado para $K=2$ (exceptuando las quinuas silvestres), ESTRUCTURA distinguió a dos grupos genéticos: cultivado y maleza. De estas, 36 accesiones se colectaron en estado cultivado y 20 plantas en estatus maleza. El test de asignación genética clasificó a 47 genotipos al grupo cultivado y 9 al grupo maleza y no se obtuvieron grupos de asignación (q) intermedios (Fig.6). Un segundo análisis con $K=2$ (exceptuando las quinuas cultivadas), ESTRUCTURA distinguió a dos grupos genéticos: silvestres y malezas. El test de asignación genética determinó que: 29 genotipos pertenecen al grupo silvestre, 32 al grupo maleza y 1 individuo (q182) no fue asignado a ninguno de los dos grupos, teniendo valores de asignación (q) intermedios, por lo que esta muestra es considerado un genotipo híbrido (Figura 4).

❖ Discusión

De acuerdo a las observaciones de campo, la mayor magnitud de flujo de genético en quinua ocurriría en los campos de producción, zonas foco de nuestro estudio y en las cuales se pudo observar que las plantas de quinua cultivada coexisten con plantas maleza de quinua denominadas mallas, llamadas así porque morfológicamente es parecida a las quinuas cultivadas, a excepción de su fruto que es de grano negro característica de las poblaciones silvestres. Lo observado en el campo, fue confirmado con datos moleculares, donde el polimorfismo de los SSRs analizados reveló una clara diferenciación genética entre las quinuas silvestres y cultivadas, y una afinidad genética entre las quinuas malezas (mallas) y las quinuas silvestre, resultado que sugiere la naturaleza híbrida de las quinuas maleza. Estos resultados corroboran claramente la hipótesis de flujo genético, similar a lo reportado por Wilson & Manhart (1992), en el estado de Washington, USA (región donde la quinua fue introducida), donde el 30% de la progenie de la especie *Chenopodium berlandieri* (silvestre) creciendo como maleza y en contacto espacial con la *Chenopodium quinoa*, correspondían a genotipos híbridos interespecíficos de tipo F1 ocurriendo de forma espontánea. Otro resultado que confirma la hipótesis es la identificación de alelos SSR compartidos entre los tres grupos (cultivado, silvestre y maleza), las cuales determinaron que los loci QCA55 con el alelo 198 y el locus QCA15 con el alelo 204, se encuentran presentes en quinuas cultivadas como en las poblaciones silvestres. Mientras que las muestras q128 y q129 (quinuas malezas) presentaron alelos típicos de especies silvestres a nivel del locus QCA55. Estos resultados sugieren la posibilidad de hibridación introgresiva entre la quinua y especies silvestres relacionadas pero distantes, como el caso de *C. hircinum* (especie silvestre). Además que la barrera genética

entre estas especies no es tan estricta, lo cual tiene una fuerte implicación para la utilización in situ de cultivos transgénicos de quinua en un futuro cercano (Ellstrand, 2002). Además que las hibridaciones naturales entre la quinua transgénica y las especies silvestres podrían llevar a cambiar el pool génico de las mismas (Ellstrand, 2002). Estas posibles bandas introgresadas podrían en el futuro ubicarse en el mapa genético de la quinua y determinar si incluyen genes de importancia para el cultivo, como puede ser resistencia a factores abióticos o bióticos.

Adicionalmente el test de asignación genética realizado con ESTRUCTURA, asignó a las 77 accesiones en los tres grupos de quinua establecidos (cultivado, silvestre y maleza), a más determinar la existencia de cinco individuos híbridos entre los grupos de quinua maleza y cultivada, resultado que explica el bajo índice de diferenciación genética entre estos dos grupos ($F_{st} = 0.1182$). Así mismo el análisis de la distancia genéticas de Nei (no mostrados), determinó un valor intermedio ($D = 0.161$) entre las quinuas cultivadas y malezas y un valor bajo ($D = 0.051$) entre quinuas silvestres y malezas, resultados que sugieren la existencia de flujo genético en el área de estudio, lo cual podría darse por los mecanismos naturales de dispersión de las semillas entre las especies cultivadas y sus parientes silvestres. El análisis de nuestros resultados está ratificado, por Wilson & Manhart (1992), quienes concluyeron que existe una tasa de flujo genético alta, considerando que se tratan de especies alógamas facultativas, y predicen con una alta probabilidad el hecho de que estas poblaciones híbridas, parcialmente fértiles, puedan introgresar genes en las poblaciones naturales.

❖ Conclusiones y recomendaciones

Los SSRs analizados revelan una clara diferenciación genética entre las poblaciones silvestres y cultivadas de quinua, y una gran afinidad entre las mallas o quinuas maleza y quinuas silvestres. Se encontró una clara estructuración genética entre los dos acervos genéticos (cultivado y silvestre), determinada por los siguientes parámetros: a) la presencia de alelos exclusivos de cada grupo genético, b) distinción a nivel de análisis de agrupamiento y multivariado, donde se puede observar una clara separación entre las dos poblaciones cultivada y silvestre, mientras que el grupo maleza es distribuido entre los tres grupos cultivado, maleza y silvestre resultados que fueron similares con el test de asignación genética, c) un moderado y significativo valor del F_{st} entre las tres poblaciones. Estos datos sugieren que las quinuas cultivadas están en continua hibridación con las poblaciones silvestres que coexisten con ellas en campo, segregando las quinuas malezas. Además como se observó en los sitios de colecta el tipo maleza se encuentra en abundancia con los cultivos de quinua de la serranía ecuatoriana.

Estos resultados demuestran que la quinua a pesar de ser una especie predominantemente autógama, tiene una propensión al flujo de genes. Se detectó la existencia de posibles alelos introgresados: alelos 195 del locus QCA030, 204 del QCA015 y el 198 del locus QCA055. Se recomienda realizar secuenciación de estas bandas para corroborar la hipótesis de flujo versus la de polimorfismo ancestral compartido.

❖ Bibliografía citada

- Colombo, C., Second, G., Losada-Valle, T. & Charrier, A. (1998). Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz) by RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 11: 105-113.
- Ellstrand, N., Prentice, H., Hancock, J. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annu. Rev. Ecol. Syst* 30, 539-563.
- Excoffier, L., P. E. Smouse y J. Quattro, 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Hedrick, W., 2000. *Genetics of Populations*. USA, Jones and Bartlett Publishers, Inc.
- Martínez, C., Villarreal, D., Gepts, P., Delgado, V., & García, P. (2006). Structure and Genetic Diversity of Wild Populations of Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Crop Science*: 46, 1071–1080.
- Mason, S. Stevens, M. Jellen, N. Bonifacio, A. Fairbanks, D. y Coleman, C. 2005. Development and use of microsatellite markers for germplasm characterization in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Crop Science* 45: 1618-1630.

- Morillo E. 2002. Protocolos de Marcadores Moleculares. Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. EESC. Quito, Ecuador
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 106(84,284): 238-292.
- Nei, M., 1978. The theory of genetic distance and evolution of human races. *Japanese Journal of Human Genetics*. 23: 341-369.
- Papa, R. 2005. Gene flow and introgression between domesticated crops and their wild relatives. *The role of biotechnology*, pp: 71-75
- Peakall, R., and Smouse, P. (2006). GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.
- Pritchard J., Stephens M., Donnelly P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*: 155, 945-959.
- Rohlf, J. (2002). Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Department of Ecology and Evolution State University of New York. New York-United States of America.
- Wilson, H., Manhart, J. 1993. Crop/Weed gene flow: *Chenopodium quinoa* Willd and *C. berlandieri* Moq. *Theor. Appl. Genet.* 86: 642–648

Resultado 2: Consolidación de biotecnologías mediante actividades de investigación
Actividad A4: Validación de dobles haploides en maíz por marcaje molecular
Responsable: M. Aguilar, E. Morillo

❖ **Introducción**

La producción de plantas dobles haploides u homocigotas, permite obtener líneas con mayor grado de vigor híbrido (heterosis), motivo por el cual se aumenta enormemente la posibilidad de encontrar mayor número de líneas con una alta habilidad combinatoria, y se facilita la generación de mejores híbridos comerciales. Mediante el empleo del cultivo *in vitro* de anteras se puede obtener plantas haploides y dobles haploides, sin embargo no se puede asegurar que todas éstas sean homocigotas pese a que se parte de una célula gamética (polen inmaduro). Esto se debe a que la pared de la antera está conformada por células somáticas o diploides, que pueden dar paso a genotipos heterocigotos. Mediante genotipaje de marcadores codominantes como los microsatélites (SSR), es posible diferenciar genotipos homocigotos de heterocigotos cuando la producción de plantas somáticas a partir de anteras esté funcionando en rutina. La presente actividad tuvo por objeto realizar un screening de un set de 15 primers SSR para seleccionar aquellos con mayor grado de heterocigidad en las cuatro líneas de maíz en estudio (Ver actividad cultivo de anteras). Estos locus podrán utilizarse en rutina para la validación entre las plántulas somáticas obtenidas en laboratorio entre genotipos homo y heterocigotos de maíz.

❖ **Propósitos y resultados por lograr**

Mediante genotipaje de marcadores microsatélites de cuatro líneas en estudio (I-101, I-601, AG003, y Dekalb5005) para su respuesta androgénica al cultivo de anteras, se busca seleccionar los primers con mayor grado de heterocigidad.

❖ **Objetivo:**

Discriminar entre un set de 15 primers SSR, los que mayor grado de heterocigidad presentan en los cuatro genotipos de maíz en estudio de su respuesta androgenica al cultivo de anteras.

❖ **Hipótesis:**

Ho: Los marcadores SSRs no permiten detectar heterocigosis en las líneas de maíz en estudio

❖ **Materiales y métodos**

Se utilizó el protocolo de extracción de ADN, reportado por Colombo et al. (1998) para muestras frescas. La cuantificación del ADN genómico se realizó en geles de agarosa al 1% en solución tampón TAE 1X y teñidos con bromuro de etidio. Las muestras fueron cuantificadas utilizando el marcador de peso molecular *Standard DNA Low Mass Ladder*. En base a la estimación de la concentración, se realizó la dilución de las muestras de ADN a una concentración de 5 ng/μl para los ensayos de amplificación de SSRs. El proceso de genotipificación de las muestras incluyó tres pasos que fueron: amplificación vía PCR utilizando microsatélites, electroforesis en geles de acrilamida y tinción de los geles con nitrato de plata siguiendo el protocolo reportado por Morillo (2002). Para la selección de primers informativos se realizaron pruebas de amplificación con 15 iniciadores disponibles en el laboratorio para la caracterización molecular de germoplasma de maíz. El control de amplificación se realizó en geles de agarosa al 2% y los productos fueron cargados posteriormente en geles denaturantes de acrilamida para la identificación de genotipos heterocigotos y homocigotos. El registro de datos se realizó por inspección visual directa en el gel anotando la presencia o ausencia de alelos. Para cada alelo, su peso molecular se estimó en base a su migración respecto a una molécula de referencia de tamaño conocido (marcador de peso molecular 100pb)

❖ Resultados, avances y discusión

Las extracciones realizadas permitieron obtener ADN de buena calidad y rendimiento, lo cual favoreció la obtención de buenos productos de amplificación SSR. Entre los 15 iniciadores evaluados, cuatro de ellos reportaron mayor grado de heterocigidad, estos fueron: phi-22, phi-24, phi-121 y phi-53. Estos primers servirán para diferenciar genotipos homocigotos de heterocigotos una vez que obtengan plantas somáticas de maíz a partir del cultivo de anteras. En la figura 5 se observan dos geles de poliacrilamida que muestran genotipos heterocigotos; pertenecientes a los híbridos I-601, AG003 y Dekalb-5005, mientras que la línea I-101 se mostró mayormente homocigota para los iniciadores evaluados. El número promedio de alelos para los 12 primers en las 4 accesiones de maíz fue de 2.78. Los primers seleccionados para el fin de nuestro trabajo fueron los que mostraron mayor heterocigidad observada (entre 0.75 y 1) en las cuatro variedades de estudio: Phi-121, Phi-24, Phi-22, Phi-50 y Phi-53 (tabla 1).

Tabla 1. Valores de heterocigosis esperada y observada para 12 locus

	Locus	Heterocigosis Esperada (He)	Heterocigosis Observada (Ho)
1	Phi-121	0.5	1.0
2	Phi-24	0.5	1.0
3	Phi-22	0.65	0.75
4	Phi-50	0.65	0.75
5	Phi-53	0.65	0.75
6	Phi-31	0.65	0.5
7	Phi-72	0.59	0.5
8	Phi-93	0.56	0.5
9	Phi-116	0.46	0.25
10	Phi-11	0.46	0.25
11	Phi-33	0.46	0.25
12	Phi-41	0.46	0.25
	Media	0.5424	0.5179

❖ Conclusiones y recomendaciones

Mediante geles de poliacrilamida se determinó que los iniciadores phi-22, phi-24, phi-121 y phi-53 revelaron mayor grado de heterocigidad en las cuatro líneas de maíz en estudio. Estos iniciadores servirán para la validación de genotipos homo y heterocigotos de las plántulas somáticas que se obtengan en el laboratorio.

❖ Bibliografía citada:

- Colombo, C., Second, G., Losada-Valle, T. & Charrier, A. (1998). Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz) by RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 11: 105-113.
- Morillo E. 2002. Protocolos de Marcadores Moleculares. Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. EESC. Quito, Ecuador

Resultado 2:	Consolidación de biotecnologías mediante actividades de investigación
Actividad A5:	Caracterización molecular de cepas de antracnosis
Responsable:	G. Miño, E. Morillo
Colaboradores:	W. Viera (Fruticultura), DNPV

❖ Introducción

La antracnosis, una enfermedad que afecta a varios cultivos de importancia, es causada por especies de hongos del género *Colletotrichum spp.* Los síntomas comienzan con pequeñas manchas acuosas que se convierten en lesiones necróticas de forma circular a irregular, de color crema oscura a negro con bordes amarillos, causando grandes pérdidas económicas en los cultivos de naranjilla, tomate de árbol y chirimoya. Para el control de la enfermedad se necesita conocer las características del agente patógeno y teniendo en cuenta de que existe poca información sobre el agente causal de la enfermedad en estos frutales, se busca en primera instancia identificar las especies del género presentes y caracterizar la diversidad genética de *Colletotrichum* aislados de hospederos de la región interandina del Ecuador.

❖ Propósitos y resultados por lograr

Este estudio abre la línea de patología molecular en el laboratorio. Busca probar protocolos existentes con el fin de identificar a nivel de especie aislamientos de *Colletotrichum* dada la amplia versatilidad de este patógeno en tomate de árbol, naranjilla y chirimoya, y posteriormente caracterizar su diversidad genética.

❖ Objetivos:

General:

Identificar y caracterizar la diversidad genética de aislados de antracnosis (*Colletotrichum spp.*) que están afectando a cultivares de naranjilla, tomate de árbol y chirimoya en la región interandina del Ecuador.

Específicos:

- Identificar molecularmente las especies de *Colletotrichum* presentes en cultivos de naranjilla, tomate de árbol y chirimoya.
- Determinar la variabilidad genética de las especies identificadas de *Colletotrichum* de los frutales en estudio

❖ Hipótesis:

No existe variabilidad genética en los aislados de *Colletotrichum sp.* que atacan a cultivares de chirimoya, tomate de árbol y naranjilla del callejón interandino del Ecuador

❖ Materiales y métodos:

Para la caracterización molecular de *Colletotrichum sp.* se necesita obtener el hongo aislado y purificado, actividad que se realiza en el Departamento Nacional de Protección Vegetal. Para la caracterización molecular se va a extraer el ADN patógeno mediante un protocolo reportado por el CIAT (2007). Para la identificación genética se va a realizar una amplificación del ADN ribosomal ampliamente utilizada en filogenia molecular, la región ITS, utilizando primers universales (CgInt y Calnt2 combinados con el cebador ITS4) y la metodología descrita por Álvarez et al (2005), la cual consiste en realizar un análisis de restricción de los amplicones con las enzimas *Hae III* y *Rsa I*, y asignar según el patrón obtenido la especie a la que

pertenece el aislamiento. Una vez identificados los aislamientos, la variabilidad intra-específica se analizará por marcadores RAPDs.

❖ **Resultados, avances y discusión:**

- Se disponen de siete aislamientos a partir de chirimoya, 12 de tomate de árbol y 23 de naranjilla.
- Al momento se han probado 4 protocolos de extracción de *Colletotrichum sp.* a partir de muestras de micelio de aislamientos purificados, obteniéndose buenos resultados con el protocolo de CTAB 4X (Colombo, 1998).
- Se dispone de los reactivos necesarios (primers y enzimas de restricción) para el inicio de las pruebas moleculares.

❖ **Conclusiones y recomendaciones:**

- Las pruebas preliminares de extracción de ADN sugieren que son necesarias cantidades considerables de micelio para obtener buenas concentraciones de ADN.
- Esta actividad es complementaria a la caracterización morfológica del patógeno y las pruebas de patogenicidad de los aislamientos. Toda la información permitirá ampliar el conocimiento sobre este patógeno en los cultivos mencionados con miras a un mejor control de la enfermedad.

❖ **Bibliografía citada:**

Álvarez, E., Ospina, C.A., Mejía, J.F., Llano, G.A, 2005. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. Fitopatol. Colombiana Vol. 28(1):1-8.

Resultado 3:	Prestación de servicios biotecnológicos para usuarios externos e internos
Actividad A6:	Genotipaje e identificación molecular
Responsable:	E. Morillo, G. Miño

❖ **Introducción**

El Departamento Nacional de Biotecnología pone al servicio de usuarios externos e internos al instituto, una plataforma de genotipaje automatizada con equipos de punta: un DNA Analyzer 4300 LI-COR que es un genotipador de detección rápida de polimorfismos (microsatélites y AFLPs) y un secuenciador ABI-PRISM 310 de un capilar para la secuenciación de ADN y análisis de fragmentos (SSRs). El servicio de genotipaje e identificación genética tiene por objetivo la puesta a punto de técnicas de biología molecular demandadas por los grupos de investigación y productores en el campo agrícola, permitiendo poner a disposición una adecuada tecnología en los laboratorios para la prestación de servicios en los campos de procesos biotecnológicos agropecuarios.

❖ **Propósitos y resultados por lograr**

En el área de Biología Molecular, mediante análisis de ADN se pueden realizar varios estudios de diversidad genética en las variedades de interés. Se pueden generar huellas digitales de ADN para diferentes variedades mejoradas o seleccionar plantas con alto valor nutritivo y económico mediante la detección de genes o con capacidad para detectar enfermedades y plagas de difícil diagnóstico.

❖ **Objetivos:**

- Implementar una plataforma de genotipaje automatizada para análisis moleculares de alta precisión y resultados muy confiables.
- Estandarizar el genotipaje en Microsatélites y AFLPs en el DNA Analyzer 4300 LI-COR, como el registro y análisis de fragmentos en el Software de alta tecnología SAGA.

❖ **Hipótesis:**

Una plataforma automatizada de genotipaje permite obtener datos confiables en el análisis molecular aplicado al campo de la agrobiotecnología.

❖ **Materiales y métodos**

La implementación y puesta en marcha del LI-COR se realizó a finales del mes de abril, se realizaron técnicas para la estandarización de protocolos en los marcadores moleculares de microsatélites y AFLPs, al igual que el genotipaje en el software de registro de datos y lectura de los geles.

La implementación y puesta en marcha del secuenciador ABI-PRISM 310 de un capilar se la realizó en febrero del 2009, para la instalación del equipo y el adiestramiento al personal técnico del Laboratorio.

❖ **Resultados, avances y discusión**

Los avances en los distintos campos de la ciencia ya han comenzado a expresarse en desarrollos concretos y ya se ha establecido un flujo continuo de nuevas tecnologías como la de los marcadores moleculares, con aportes significativos para la mejora de la productividad en el uso de los recursos disponibles para la investigación agrícola. Con la implementación del LI-COR se pudieron realizar varias aplicaciones dentro del campo de la agrobiotecnología como la

estimación de la base genética de mora cultivada y análisis de mutantes irradiadas de papa mediante la técnica de AFLPs, la caracterización molecular del germoplasma de maní y análisis de flujo genético de quinua, con la técnica de microsatélites.

❖ Conclusiones y recomendaciones

- La implementación de la plataforma de genotipaje automatizada permite obtener análisis moleculares de alta precisión y resultados muy confiables debido a la alta tecnología que poseen los dos secuenciadores adquiridos (LI-COR y ABI- PRISM 310), así como acelerar significativamente los análisis y la obtención de resultados.
- Mediante la estandarización en el manejo del equipo y en el genotipaje en Microsatélites y AFLPs en el DNA Analyzer 4300 LI-COR así como el registro y análisis de fragmentos y polimorfismos obtenidos por el Software SAGA se obtienen datos de alta calidad y exactitud con diferentes aplicaciones en agrobiotecnología.
- La implementación del secuenciador ABI permite obtener servicios de genotipaje en análisis de fragmentos y secuenciación de cadenas de ADN, siendo necesario para el 2009 adquirir experticia en el manejo del mismo para su empleo en el laboratorio en rutina.

Resultado 3: Prestación de servicios biotecnológicos para usuarios externos e internos
Actividad A7: Generar protocolos para la propagación *in vitro* de diversas especies
Responsable: J. Benitez

❖ **Introducción**

La gran mayoría de de especies vegetales, pueden entrar a la producción de cultivo *in vitro*, pero cada especie debe cumplir con ciertas condiciones de crecimiento como es el medio de cultivo, temperatura, luz, humedad relativa, etc. Por esta razón es importante antes de comenzar la producción masiva *in vitro*, iniciar una fase de investigación para ensayar protocolos y/o medios que ya están establecidos en la literatura generalmente y adaptarlos o mejorarlos para obtener el producto deseado.

❖ **Objetivo:**

Desarrollar protocolos de introducción, multiplicación y enraizamiento para las variedades que el mercado lo requiera, de acuerdo a la bibliografía encontrada y los requerimientos de usuarios externos e internos.

❖ **Hipótesis:**

El cultivo de tejidos es una biotecnología viable para la propagación masiva de plantas

❖ **Materiales y métodos**

Para esta clase de procesos se necesita principalmente un invernadero en el cual se adaptarán las plantas que vengan de afuera y se les someterá a un pre-tratamiento de desinfección antes de ingresar el laboratorio. Ya en el laboratorio se prueban protocolos de desinfección de acuerdo a la especie y posteriormente protocolos de micropropagación con el fin de establecer propuestas de producción masiva.

❖ **Resultados, avances y discusión**

Hasta el 2008 el laboratorio de Cultivo de tejidos esta en proceso de adecuación e implementación en las nuevas instalaciones, razón por la cual no se ha iniciado ningún trabajo a reportar.

❖ **Conclusiones y recomendaciones**

El Dpto. de Biotecnología, y más específicamente el laboratorio de Cultivo de Tejidos requieren urgentemente de un invernadero para el pre-tratamiento de plantas que ingresaran al régimen de laboratorio, así como para la adaptación de plántulas salientes del laboratorio.

Resultado 3:	Prestación de servicios biotecnológicos para usuarios externos e internos
Actividad A8:	Propagación <i>in vitro</i> de microplantas
Responsable:	J. Benítez

❖ **Introducción**

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica de reproducción en condiciones de total asepsia, en la cual a partir de pequeños segmentos de la planta se regenera en poco tiempo y en espacios reducidos cientos y miles de plantas genéticamente iguales.

Esta herramienta biotecnológica nos permite obtener plantas en cualquier época del año, además que complementada con la técnica de limpieza de virus se puede obtener material genético completamente limpio de microorganismos y con el mantenimiento de estas plantas se puede evitar la erosión genética y mantener grandes colecciones de plantas, que de manera tradicional sería muy costosa. El enorme potencial de estas técnicas ha permitido la creación de laboratorios comerciales que en nuestro país están dedicados a banano, piña, orquídeas y otras especies ornamentales para la exportación. La presente actividad surge ante la necesidad del sector productivo externo al instituto de contar con plantas en gran número y alta calidad fitosanitaria, por lo que representa un servicio del departamento al sector agroproductivo del país.

❖ **Propósitos y resultados por lograr**

❖ **Objetivo:**

Realizar la micropropagación masiva de material vegetal de manera comercial.

❖ **Hipótesis:**

La propagación *in vitro* permite acelerar los procesos de multiplicación de plantas

❖ **Materiales y métodos**

Ver actividad A7

❖ **Resultados, avances y discusión**

Hasta el 2008 el laboratorio de Cultivo de tejidos esta en proceso de adecuación e implementación en las nuevas instalaciones, razón por la cual no se ha iniciado ningún trabajo a reportar.

Resultado 4:	Capacitación
Actividad A9:	Taller institucional de Biotecnología (Fuente: Morillo, 2008)
Responsable:	E. Morillo
Colaboradores:	Dir. Investigaciones

❖ **Introducción**

En el INIAP, actividades en agrobiotecnología se desarrollaron de manera dispersa por parte de algunos programas y departamentos como los de Recursos Fitogenéticos y Producción de Semillas y programas de mejoramiento como los de cacao y leguminosas. En Enero del 2008 se oficializó la creación del Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) como ente centralizador y coordinador en esta temática, integrando a tres laboratorios a nivel nacional; ubicados en las Estaciones Experimentales Santa Catalina (EESC), Tropical Pichilingue (EETP) y Chuquipata (EECH), en los que se están conduciendo actividades biotecnológicas para investigación y oferta de servicios. Con el objetivo de proyectar una mejor articulación de las actividades entre los laboratorios del DNB, y un mejor enlace y colaboración entre el DNB y los Programas y Departamentos del Instituto, surgió la necesidad del departamento de realizar una reunión de diagnóstico y planificación en Biotecnología, que permita definir lineamientos generales del DNB a mediano plazo. La Dirección de Investigaciones aceptó tal planteamiento y se programó la reunión nacional de las unidades de Biotecnología y los Programas y Departamentos del INIAP en la Hostería Ushupud de Cuenca del 19 al 20 de junio del 2008.

❖ **Propósitos y resultados por lograr**

Lograr una mejor articulación de las actividades entre los laboratorios del DNB, y un mejor enlace y colaboración entre el DNB y los Programas y Departamentos del Instituto mediante la realización de un taller de planificación institucional en biotecnología.

❖ **Objetivos:**

- Socializar la estrategia institucional y líneas prioritarias de acción del Departamento Nacional de Biotecnología. Revisar los principales objetivos y actividades que los Programas están conduciendo y los planteamientos para presente y futuro.
- Discutir y articular proyectos y actividades biotecnológicas que actualmente se ejecutan en INIAP.
- Consensuar en proyecciones a mediano plazo y compromisos para una programación institucional en Biotecnología.

❖ **Hipótesis:**

La realización de un taller de planificación institucional en biotecnología permitirá una mejor articulación entre los laboratorios del DNB y los programas y departamentos del INIAP.

❖ **Materiales y métodos**

El programa del taller se presenta en el anexo 1. La primera fase del evento comprendió presentaciones orales por parte de los programas y departamentos con los siguientes puntos:

- Presentación de actividades y/o proyectos actuales y anteriores relacionados con Biotecnología
- Perspectivas de investigación con el Departamento de Biotecnología y demanda de servicios
- Demandas de apoyo a los laboratorios de Biotecnología

Las presentaciones realizadas se adjuntan en formato pdf en el CD anexo a esta memoria. Posteriormente se realizó un trabajo en grupos, para lo cual los participantes se agruparon por estaciones. Cada grupo tuvo la misión de recoger información sobre la competencia externa en servicios de ABT. Finalmente se realizó una plenaria de puntos relevantes propuestos por el personal de los laboratorios del DNB. Actuó como moderador del taller el Ing. Marcelo Racines del Dpto. de Planificación de la EESC.

❖ **Resultados, avances y discusión**

Participación: Asistieron al taller 31 participantes de los programas de Fruticultura, Palma Africana, Maíz, Leguminosas, Papa, Cereales, Cacao y Forestería, además de los Departamentos de Biotecnología, Recursos Fitogenéticos (DENAREF) y Protección Vegetal, quienes presentaron sus actividades y perspectivas a mediano y largo plazo en agrobiotecnología. También asistieron al evento los Directores de Investigaciones y de Planificación del Instituto y los Directores de las Estaciones Experimentales Santa Catalina, Pichilingue y Chuquipata.

Diagnostico de actividades en ABT ejecutadas por los programas y departamentos: Entre las aplicaciones de técnicas moleculares, se reporta mayoritariamente la caracterización molecular de germoplasma. Al momento están en marcha estudios por parte del departamento de Biotecnología de la EESC en coordinación con programas (Fruticultura, Leguminosas) y departamentos (DENAREF, Protección Vegetal). Como segunda aplicación se presenta el uso y validación de genes de interés a través de los programas de Papa (asociados a calidad y tizón tardío) y Leguminosas (resistencia a sequia y pudriciones radiculares). Otras aplicaciones como las tecnologías de mejoramiento asistido (MAS) se conducen al momento solo en el programa de Leguminosas de la EESC, el cual las ha integrado en rutina en sus esquemas de mejoramiento. Además el laboratorio de Biotecnología de la EESC, incursiona en la caracterización molecular de patógenos y en el servicio automatizado de genotipificación.

Perspectivas y demandas de los programas y departamentos: En cuanto a perspectivas de uso de las técnicas actuales de Biotecnología por parte de otros programas y departamentos, se observa el interés mayoritario en dos aplicaciones principalmente: la caracterización molecular de germoplasma y el mejoramiento asistido (MAS). En lo relacionado a la primera, se nota el interés de incursionar en la caracterización molecular de material genético de rubros de importancia pero que a la fecha no han sido evaluados, tales como cereales, frutales y palma africana. En lo referente a las tecnologías MAS, varios programas de mejoramiento como fruticultura, cereales, papa y maíz muestran interés en su uso y aplicación. Aparecen nuevas técnicas o aplicaciones moleculares como el clonaje y secuenciación de ADN, la detección de OGMS (laboratorio EESC), estudios de genética de asociación en cacao y certificación molecular (EETP). El programa de papa solicita la conservación de colecciones de ADN.

Entre las técnicas *in vitro*, se cita la criopreservación como alternativa de conservación de germoplasma a largo plazo por parte del Departamento de Recursos Fitogenéticos. Además se menciona el interés en técnicas de citogenética para detección del nivel de ploidía en papa. La propagación *in vitro* sigue siendo un tema de interés, principalmente para frutales y en algunos casos para plantas ornamentales (EECH), se ha evidenciado un interés en este tema por parte de la empresa privada.

Conocimiento de la competencia externa en servicios agrobiotecnológicos: de 27 laboratorios conocidos por el personal técnico participante en el taller, la mayor parte de aplicaciones agrobiotecnológicas se remiten a propagación meristemática de plantas (81%), seguido por el empleo de marcadores moleculares para genotipificación (33%). El resto de tecnologías (embriogénesis somática, MAS, transformación genética y diagnostico) tienen una menor incidencia según el conocimiento de los participantes. Información más concreta sobre la competencia externa se presenta en los avances del diagnostico del estado del arte de la Agrobiotecnología en el país que ejecuta el DNB en el marco del PROCIANDINO (ver actividad respectiva).

❖ **Conclusiones y recomendaciones**

Las principales conclusiones derivadas de la plenaria, se presentan estructuradas en tres puntos: estructura y organización del DNB, fortalecimiento de los laboratorios del DNB y líneas de acción.

A) ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN

A.1. Interacción del DNB con Programas/Departamentos, Secciones

Para fortalecer la interacción entre los laboratorios del DNB con Programas, Departamentos y Secciones, los proyectos que incluyen componentes biotecnológicos deben ser coordinados con personal del DNB. Para implementación de tecnologías de mejoramiento asistido (MAS), el programa debe definir los objetivos con un determinado rubro y el DNB coordinar y canalizar esos objetivos. Las iniciativas deben venir de los programas y mejoradores. Se recomienda que se eleve a política institucional, que los programas de mejoramiento integren en sus esquemas el empleo de biotecnologías, para el efecto deberían presentar un plan de mediano plazo en coordinación con los laboratorios del DNB.

Los rubros mayores deben contar con mejoradores actualizados, que combinen el mejoramiento tradicional y las técnicas biotecnológicas. Para otros rubros, el DNB a través de técnicos especializados deberá canalizar el empleo de biotecnologías con objetivos precisos.

A.2. Sistemas de gestión de calidad (normas)

Los laboratorios del DNB deben manejar manuales de procedimientos e implementar normativas de uso, tanto de equipos como de protocolos. Se deben implementar sistemas eficaces de eliminación de desechos tóxicos con la asesoría de entes especializados y acreditados en la materia y la capacitación del personal de laboratorio.

Por otro lado, los laboratorios deben perseguir como objetivo la acreditación de determinados servicios biotecnológicos, como el de genotipificación y el de multiplicación *in vitro*, con cualquiera de las técnicas que son actualmente utilizadas.

A.3. Especialización

El laboratorio de la EESC debe desarrollar actividades en investigación básica, además de la prestación de servicios y capacitación a usuarios internos siendo el principal laboratorio para el desarrollo de actividades moleculares, tanto por su equipamiento como por el nivel de capacitación. El laboratorio de la EETP, tiene una mayor experiencia en el área de multiplicación masiva de plantas, por lo que se prevé continúe en esa línea e incluya algunas herramientas moleculares. De igual forma el laboratorio de la EECH ha iniciado sus actividades en la línea de cultivo de tejidos y desarrolla actividades puntuales en el área molecular, la cual se espera se oriente hacia un servicio de diagnóstico mediante herramientas moleculares y se continúe con el trabajo de propagación masiva. En un muy corto plazo y en función de los proyectos y demandas, los laboratorios del DNB deberán definir su ámbito de acción en cuanto a tecnologías y rubros.

A.4. Políticas Institucionales

Las estaciones deben implementar una directriz u hoja de ruta a seguir en Biotecnología, lo cual promoverá el uso eficiente de la infraestructura y equipamiento de los laboratorios del DNB, antes de utilizar laboratorios de otras entidades (universidades por ejemplo).

Como política institucional debe promoverse el uso de biotecnologías en los esquemas de mejoramiento de los programas (tecnologías MAS).

En lo relacionado a OGMs, y en cara a una posible transición constitucional, la cual declara al país libre de organismos transgénicos, se considera que la política del INIAP deberá armonizarse en lo posible a las políticas nacionales. Independientemente de esto, el INIAP no debe ser un actor pasivo en relación al tema, peor aún, un Departamento de Biotecnología

agrícola no puede excluir la posibilidad de realizar investigación con tecnologías de DNA recombinante.

B) FORTALECIMIENTO DEL DNB

El DNB está en franco proceso de consolidación institucional. En vista del proceso de mejoramiento en infraestructura y equipamiento de los laboratorios del DNB (gracias a los fondos estatales de proyectos CEREPS y de Apoyo al Plan de Producción Agrícola del Gobierno), los jefes de laboratorios deben evaluar próximamente las nuevas capacidades adquiridas y discernir con mejor claridad su rumbo de especialización tecnológica y de rubros.

Se estima también que los programas de mejoramiento en rubros mayores podrían tener grupos multidisciplinarios con personal especializado en biotecnología. El personal técnico especializado en esta área de conocimiento, deberá centralizarse en los laboratorios del DNB y apoyar las actividades de mejoramiento en rubros mayores y menores.

Así mismo, en procura de la sostenibilidad del DNB, la institución debe priorizar el otorgamiento de nuevas partidas para el personal actualmente contratado con proyectos y especializándose en los laboratorios del DNB; así como facilitar su capacitación especializada.

B.1 Laboratorios (EESC, EETP, EECH)

Los tres laboratorios actualmente integrados bajo la figura del DNB (EESC, EETP y EECH) deben coordinar actividades, articularse y apoyarse en base a las fortalezas de cada unidad. En casos de implementación de nuevos laboratorios en otras estaciones experimentales, tal como en la EEBO, dichas unidades deberán enmarcarse dentro de la estructura del DNB, para articular actividades, evitar duplicidad de acciones y no representar esfuerzos aislados o iniciativas unilaterales. Previo a su consolidación como laboratorio biotecnológico de la Estación Experimental Boliche, su personal y dirección deben presentar un programa de trabajo del laboratorio que se está implementando a la Dirección de Investigaciones y al DNB en donde se visualice las potenciales demandas; para en base a éste, orientar sus actividades, potencializar su buen uso y buscar su sostenibilidad técnica.

C) LÍNEAS DE ACCIÓN:

Se definieron las siguientes prioridades para los próximos cinco años:

En Biología Molecular:

- Validación de marcadores moleculares ligados a genes de interés
- Evaluación del germoplasma
- Diversidad genética
- Identificación genética
- Detección de enfermedades
- Certificación de plantas
- Detección de transgénicos
- Identificación de marcadores o QTLs

En Cultivo de tejidos:

- Propagación de plantas por nuevos métodos biotecnológicos (biorreactores, inmersión temporal)
- Investigación y desarrollo de protocolos para especies nuevas o de potencial alimenticio, medicinal, agroforestal u otro
- Investigación y desarrollo aplicados al fitomejoramiento y empresa privada

COMPROMISOS Y LOGROS ALCANZADOS

Los programas y departamentos del INIAP deberán priorizar el uso de los laboratorios del DNB en proyectos de investigación antes que involucrar a laboratorios de otras entidades en tecnologías que son perfectamente ejecutables por el DNB. Para esto, es recomendable elaborar una directriz en conjunto con la Dirección de Investigaciones y la dirección de las estaciones implicadas. Solo si no existe disponibilidad en los laboratorios del DNB para una determinada actividad, se podrá recomendar la participación de laboratorios externos al instituto.

Los proyectos presentados por programas y departamentos que incluyan la aplicación de biotecnologías deberán ser coordinados con los laboratorios del DNB. Es recomendable que los laboratorios del DNB manejen los recursos para el desarrollo de estas actividades, pero esto puede acordarse entre los jefes de proyecto y los jefes de los laboratorios. Se debería incluir como participantes de los proyectos a los laboratorios con mejor respuesta tecnológica de acuerdo a los objetivos de los proyectos y a las fortalezas de cada unidad del DNB.

La prestación de servicios a usuarios internos del instituto debe ser clarificada. Existe el impedimento de que el INIAP no podría emitir facturas a su propio nombre. Sin embargo se mencionó que en ciertas Estaciones y para ciertos casos específicos, las Estaciones emiten facturas con cargo a proyectos; por lo cual es necesario unificar los criterios. Se mencionó también que los costos operativos actuales que mantienen los laboratorios son bastante altos, sobre todo en lo concerniente a tecnologías moleculares. Una buena opción para una determinada actividad es el manejo de recursos por parte de los laboratorios, pero esto no siempre es aplicable. En lo concerniente a usuarios externos, la situación es más clara, pero se recomienda que se revisen los porcentajes de recuperación de recursos de los laboratorios, ya que al dirigir el 50% del costo facturado por un servicio biotecnológico a la estación experimental, el laboratorio no logra recuperar la inversión realizada para el servicio. Esto es principalmente aplicable en lo relacionado con genotipificación e identificación genética de variedades comerciales.

Debe también considerarse que al igual que laboratorios privados, los laboratorios del DNB deben prestar servicios como una alternativa importante para el ingreso de recursos para su sostenibilidad y permanente actualización, no es financieramente saludable la dependencia única de fondos estatales o internacionales, los cuales en algún momento pueden disminuir o aun reducirse a niveles críticos

En lo relacionado a la adopción de agrobiotecnologías, la mayoría de programas muestra su interés en su adopción y/o consolidación, principalmente en lo relacionado a evaluación de germoplasma, dirigida a genes de interés agronómico y tecnologías MAS. Para consolidar estos objetivos, se acordó implementar como disposición institucional la adopción de biotecnologías en los programas de mejoramiento, al menos en los rubros de mayor importancia para el país. Esto es una meta ambiciosa que requiere no solo de buenas intenciones, sino que deberá ir acompañado de un proceso de capacitación de alto nivel del personal técnico de los programas, consolidación de equipos multidisciplinarios en lo relacionado con los rubros mayores, y especialización del personal de los laboratorios del DNB, capaz de consolidar un equipo de trabajo en biotecnología en el instituto.

❖ Bibliografía citada

Morillo E. 2008. Informe del seminario-taller de planificación institucional en agrobiotecnología. Dpto. de Biotecnología. INIAP-EESC. 17p.

Resultado 4: Capacitación

Actividad A10: Taller de diagnóstico con agroproductores para la oferta de servicios

Responsable: E. Morillo

❖ **Introducción**

El sector agroproductivo tiene en la biotecnología un conjunto de herramientas con enorme potencial para la solución de problemas relacionados con la producción. El proyecto BIOTECNOLOGÍA ha planteado la ejecución de talleres regionales en el país para la promoción de los servicios de los laboratorios, y el levantamiento de información de necesidades del sector agroproductivo en los que la prestación de servicios de los laboratorios de biotecnología puede tener oportunidad de incremento y posicionamiento.

❖ **Propósitos y resultados por lograr**

Realizar un diagnóstico de las principales demandas del sector productivo e identificar los aspectos en los que tanto el CIBE-ESPOL como el INIAP pueden contribuir a la solución de los problemas más acuciantes de la producción agrícola en la provincia del Guayas.

❖ **Objetivos:**

- Brindar información sobre el trabajo de investigación, desarrollo y transferencia tecnológica que realizan los laboratorios de biotecnología del INIAP y la ESPOL en la actualidad.
- Levantar información de las necesidades de los agroproductores en los que los laboratorios de biotecnología pueden contribuir mediante la prestación de servicios

❖ **Hipótesis:**

El diagnóstico de necesidades del sector agroproductor ofrece oportunidades para la prestación de servicios de los laboratorios de Biotecnología

❖ **Materiales y métodos**

El Seminario Taller se realizó en Guayaquil, el día 10 de noviembre de 2008, con la participación de 52 productores, agroempresarios, exportadores e investigadores y técnicos. Fue organizado por el INIAP y contó con la colaboración del CIBE-ESPOL. Luego de la apertura del Seminario-Taller, se desarrolló una sesión de presentaciones breves, con los siguientes temas y ponentes:

- La producción agrícola en el Ecuador. Situación actual, perspectivas y análisis comparativo. Dr. Ramón Espinel (Director Facultad de Agronomía, ESPOL)
- Presentación del INIAP- Dr. Eduardo Morillo (Jefe del Departamento Nacional de Biotecnología).
- Presentación de la Facultad de Agronomía de la ESPOL (Dr. Paúl Herrera, Centro de Estudios Rurales, ESPOL)
- Resultados de investigaciones del CIBE en Cultivo de Tejidos y presentación de SEBIOCA – Ing. Sofía Korneva, MSc (Especialista Principal)
- Resultados de investigaciones del INIAP sobre la multiplicación clonal de material de siembra de cacao.
- Presentación del CIBE-ESPOL – Dra. Esther Lilia Peralta (Directora CIBE).

La segunda parte del Seminario-Taller se dedicó al diagnóstico de las necesidades más urgentes del sector productivo y los servicios biotecnológicos de interés. El trabajo se realizó de

manera participativa en los tres grupos conformados, que respondieron a las siguientes temáticas:

- Grupo 1: Propagación (fundamentalmente mediante Cultivo de tejidos) y diagnóstico especializado de enfermedades. Moderador: Esther Lilia Peralta
- Grupo 2: Sistemas de producción orgánica – producción y uso de bio-productos (o bio-preparados) para la nutrición vegetal y el control de plagas. Moderador: Simón Cañarte
- Grupo 3: Obtención de nuevas variedades, mejoramiento, identificación genética. Moderador: Eduardo Morillo

Cada grupo conoció y enriqueció las conclusiones de los dos restantes, las cuales han servido de base para la redacción de este documento y la conformación de las proyecciones de trabajo del CIBE-ESPOL y el INIAP como respuesta a las demandas productivas. Los participantes del Taller recibieron trípticos y documentos informativos sobre el trabajo que se realiza en los centros organizadores y pudieron apreciar afiches sobre resultados relevantes y servicios disponibles.

❖ Resultados, avances y discusión

Grupo: Propagación, Cultivo de Tejidos y Diagnóstico de enfermedades:

¿Cuáles son los principales problemas de producción de su empresa?	¿Cuáles son las soluciones que sugiere?	¿Cómo puede ayudarnos un centro de biotecnología?
<ul style="list-style-type: none"> • Calidad y disponibilidad de semillas, materiales biológicos (agro-insumos) y bio-productos certificados. • Falta o deficiencias en las regulaciones para la certificación de material de siembra, tanto del modo convencional como del obtenido por vía biotecnológica. • Manejo agronómico de arroz, café, banano orito y morado, cítricos. • Falta de laboratorios de diagnóstico de enfermedades que sean confiables, rápidos y económicos (certificación de laboratorios) • Débil conocimiento de los problemas fitosanitarios: necesidad de inventarios, investigaciones y productos nuevos. • Necesidad de un manejo adecuado de plagas y enfermedades • Escasa disponibilidad de material genético mejorado y certificado. • Altos costos del material genético. • Poca disponibilidad de diagnóstico de suelo y de la calidad del agua. • Control inadecuado de 	<ul style="list-style-type: none"> • Certificación de los centros de multiplicación vegetal tanto por vía convencional como por vía biotecnológica. • Mayor interrelación entre la investigación científica, la parte académica (universidades) y los productores. • Mejorar los sistemas de transferencia tecnológica y capacitación. • Mejorar y desarrollar variedades resistentes a enfermedades, salinidad, condiciones climáticas, etc. • Establecer red de laboratorios para el diagnóstico fitosanitario, determinación de macro y micro-elementos, salud del suelo, calidad del agua e identificación controladores biológicos. • Red informática entre investigadores y productores. • Establecer una estructura adecuada de capacitación, extensión, divulgación y adopción de las tecnologías apropiadas. • Actualización y operatividad de las legislaciones relacionadas. • Creación de una entidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Promover el desarrollo de microempresas para la producción de bioinsumos (semillas certificadas, bio-fertilizantes y bio-plaguicidas). • Garantizar la introducción de resultados de las investigaciones hacia los productores junto con la capacitación respectiva. • Desarrollo de sistemas de evaluación y certificación de bio-productos. • Desarrollo de sistemas de información y divulgación de los investigadores hacia los productores. • Fortalecer la cuarentena y el diagnóstico de enfermedades y plagas emergentes. • Desarrollar e introducir métodos confiables y avanzados de diagnóstico.

materiales introducidos en la micropropagación (presencia de plagas).	pública que haga regir la legislación sobre el control de los centros de multiplicación vegetal.	
---	--	--

Grupo: Sistemas de Producción Orgánica y Bioproductos

¿Cuáles son los principales problemas de producción de su empresa?	¿Cuáles son las soluciones que sugiere?	¿Cómo puede ayudarnos un centro de biotecnología?
<ul style="list-style-type: none"> Rehabilitación de Fincas como consecuencia del mal manejo de agricultores Alto porcentaje de enfermedades debido al mal manejo, la falta de información y la existencia de las plantaciones de edad elevada. Falta de acceso a tecnologías. Falta de redefinición de sistemas productivos como por ejemplo sistemas de riego masivos. Contaminación suelo-agua Falta de evaluación de metales pesados y residualidad en alimentos. Falta de atención a la inocuidad de alimentos (presencia de químicos de pesticidas). Altos costos de insumos, dependencia tecnológica. Baja productividad (condiciones agroecológicas adversas al cultivo) Falta de capacitación y diagnósticos de fincas Falta de identificación previa de enfermedades; no existe un mecanismo de control preventivo. 	<ul style="list-style-type: none"> Utilización de microorganismos benéficos con diferentes fines. Aumentar la resistencia a plagas para evitar y erradicar el uso de químicos Identificación de variedades adaptadas a las diferentes zonas agroecológicas. Disponibilidad de laboratorios y/o diagnóstico <i>in situ</i> (fincas) e integral. Definición de un buen sistema productivo Clasificación y reciclaje de los desechos, mediante tecnologías rentables y viables económicamente. Manejo de residuos inorgánicos contaminantes Crear una red de información que involucre a todos (exportadores, empresarios, organismos gubernamentales). Identificación de genotipos de alta producción de todos los cultivos (por lo menos cinco variedades como mínimo). Transferencia tecnológica accesible. 	<ul style="list-style-type: none"> Generar información del Ecuador. Crear y mantener una red de información Capacidad de trabajo Transferencia tecnológica y divulgación de información. Generar material de siembra de calidad, económicamente accesible. Dar un valor agregado para poder diferenciar el contenido comercial Desarrollar protocolos de producción de bioinsumos adaptados a las condiciones locales. Asistencia de Laboratorio (diagnóstico <i>in situ</i>)

Grupo: Nuevas variedades, Mejoramiento e Identificación genética

¿Cuáles son los principales problemas de producción de su empresa?	¿Cuáles son las soluciones que sugiere?	¿Cómo puede ayudarnos un centro de biotecnología?
<ul style="list-style-type: none"> Percepción del productor (variedades tradicionales) Edad de la plantación y heterogeneidad intravarietal Deterioro de las condiciones del suelo (pérdida de rendimiento) Altos costos de producción y baja rentabilidad para el 	<ul style="list-style-type: none"> Promover cadenas de producción Uso de biotecnología y mejora genética, renovación con variedades competitivas en el comercio. Preparación de biofertilizantes y uso de la biodiversidad del suelo 	<ul style="list-style-type: none"> Usando herramientas biotecnológicas que contribuyan en el conocimiento y mejora genética de variedades Disminuir el uso de químicos mediante el desarrollo de biofertilizantes de alta

<p>productor</p> <ul style="list-style-type: none"> • Calidad de semillas • Falta de transferencia • Enfermedades y pérdida de resistencia • Cambio climático • Introducción de variedades foráneas • Variedades mejoradas insuficientes y transformación deficiente. • Biopiratería • Disponibilidad de variedades 	<ul style="list-style-type: none"> • Nuevos mercados, semilla certificada, mejor manejo agronómico y agricultura orgánica • INIAP y productores produzcan semilla de alta calidad. • Nuevas variedades y piramidación genética • SESA (actualmente Agrocalidad) más eficiente, alianzas estratégicas entre Ministerio de Agricultura, universidades e instituciones. • Certificación y política, registro de variedades. 	<p>eficiencia.</p>
---	---	--------------------

❖ Conclusiones y recomendaciones

Se han identificado necesidades en relación a las áreas temáticas propuestas para el diagnóstico en los que un centro de Biotecnología puede ofrecer respuestas concretas mediante tecnología e investigación. Esta información representa un insumo para el diagnóstico nacional que deberá completarse al cierre de la realización de eventos similares en la sierra norte y sur, al final de los cuales se dispondrá de valiosa información para la preparación de una publicación y un lineamiento y visión de los servicios del Departamento Nacional de Biotecnología.

❖ Bibliografía citada

Morillo E. y Peralta E. 2009. Diagnóstico de necesidades del sector agroproductivo en la provincia del Guayas: enfoque en agrobiotecnología. Documento en preparación.

PROYECTO: MULTIPLICACIÓN DE PLANTAS Y ESTUDIOS ESPECIALES <i>IN VITRO</i>
--

Responsable: J. Benítez, E. Morillo

Instituciones participantes: INIAP (DNB, programas y Dptos.)
--

❖ Introducción

Dentro de la Biotecnología, el cultivo de tejidos es una técnica que por largo tiempo ha contribuido a la producción de plantas vía micropropagación o cultivo de células como es el caso de las microesporas y producción de embriones somáticos, de una gran variedad de especies. La propagación *in-vitro* de plantas herbáceas, leñosas, medicinales, ha comenzado a ser ampliamente utilizada tanto en actividades de investigación como comercial es por ello que el INIAP, por medio del Departamento de Biotecnología desea obtener plantas de alta calidad a un costo razonable y que satisfaga la demanda tanto interna como externa de plantas *in vitro* de las diferentes especies que se requieran.

❖ Objetivos del proyecto:

- Ajustar protocolos de reproducción de plantas *in-vitro*, en las condiciones del laboratorio, para obtener optimización en todas las etapas.
- Realizar la multiplicación *in-vitro* de plantas de las especies que la demanda tanto interna como externa lo requieran, en el menor tiempo posible y al menor costo
- Establecer el protocolo para la producción de dobles haploides a partir del cultivo de anteras y polen en maíz.

❖ Palabras clave

Cultivo *in vitro*, micropropagación, androgénesis

❖ Indicadores del proyecto.

- Se dispondrá de protocolos establecidos de las diferentes especies
- Se dispondrá de información del número de plantas que puede el laboratorio producir *in vitro*.
- Se dispondrá de una determinada cantidad de plantas entregadas

❖ Resultados, avances y discusión

- El establecimiento de los protocolos de mora y Naranjilla, usando como base el Medio de Murashige-Skoog, se ha podido lograr un índice de multiplicación 1:4 para el caso de las dos especies.
- Se han entregado 9.877 plantas *in vitro* de papa para el Dpto. de Producción de Semilla y el Programa de Papa.
- Se continúan probando varias clases de protocolos para el cultivo de anteras y microesporas de maíz sin ningún resultado definitivo al momento.
- Una mayor información se encuentra en el detalle de las actividades que a continuación se exponen.

❖ Limitantes

En la actualidad, se puede señalar como limitantes los siguientes:

- El no poder mantener un equipo de trabajo estable. En esta clase de trabajos es necesario una persona entrenada que sea un apoyo logístico para los procesos de preparación de medios, micropropagación, identificación del material.
- Es necesario implementar un invernadero para los procesos de obtención de material parental limpio, que crezca en condiciones ambientales controladas para evitar la alta contaminación que se tiene cuando los explantes son tomados de campo directamente, por otro lado las plantas *in-vitro* que salen del laboratorio tienen que pasar por un proceso de adaptación antes de que sean enviadas a sus lugares definitivos, evitando así la alta mortalidad que se tiene cuando no pasan por este proceso.

❖ Conclusiones y recomendaciones.

En el año 2008, se ha trabajado en el establecimiento de los protocolos para mora y naranjilla y en el 2009 se pretende usarlos y producir estas dos especies para la entrega al Programa de Fruticultura de la Granja Tumbaco.

Con relación a la micropropagación se ha cumplido con los compromisos internos que se tienen tanto con el Dpto. de Producción de Semillas como con el programa de Papa en el suministro de plantas *in vitro* de papa para la producción de semilla prebásica que se realiza en los seis invernaderos existentes para este propósito.

Resultado 1: Propagación *in vitro*

Actividad A1: Multiplicación de plantas libres de virus para producción de semilla prebásica

Responsable: J. Benítez

❖ **Introducción**

Para iniciar un programa de producción de semilla de papa, es importante partir por la obtención de plantas de altísima calidad, que estén libre de enfermedades. Esto se lo consigue por la producción *in vitro* de plantas de papa las cuales crecen en condiciones controladas de asepsia en un laboratorio en donde usando las técnicas de limpieza de virus como la termoterapia y el cultivo de meristemas y pasando por un estricto control de calidad se logra obtener material indexado y listo para ser multiplicado y entregado a los programas de producción de semilla prebásica, y ser sembrado en invernadero. En el caso del INIAP tanto el Programa de Raíces y Tubérculos conjuntamente con el Departamento de Producción de Semillas son los encargados de la producción de esta categoría de semilla y por lo tanto son los usuarios directos de esta clase de material.

❖ **Objetivo:**

Entregar la cantidad requerida de plantas *in vitro* de las diferentes variedades de papa por los Dpto. de Producción de Semillas y el Programa de Raíces y Tubérculos

❖ **Materiales y métodos**

El siguiente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de tejidos Oscar Malamud. El trabajo de micropropagación de las variedades de papa: INIAP Superchola y Fripapa, Capiro, INIAP Estela, Natividad, Cecilia y Gabriela, Yema de Huevo, sigue la siguiente metodología: luego que las plantas son chequeadas con una prueba de Das ELISA y se determinan la no presencia de virus se procede a la multiplicación del mismo. En una cámara de flujo laminar completamente esterilizada, se procede a realizar los cortes de las plantas madres en pequeños nudos, los cuales son colocados en un tubo que contiene medio nutritivo de Murashige Skoog. Luego de sellados, los tubo de ensayo y debidamente identificados, estos son colocados en un cuarto de crecimiento a una temperatura de 20°C ± 2 °C para luego de dos meses ser pasados directamente a invernadero y colocados en turba en el Sistema Autotrófico-Hidropónico para su pre-adaptación a las condiciones del exterior.

❖ **Resultados, avances y discusión**

En el año 2008, se entregaron 9.877 plantas de papa libre de virus de las siguientes variedades: Un total de 6072 plantas para el Departamento de Producción de semillas, 2992 de la variedad Fripapa y 3080 de la variedad Superchola. Un total de 3885 plantas para el Programa de Papa: 1448 de Fripapa, 888 de Superchola, 470 de Estela, 270 de yema de huevo, 330 de Cecilia, 330 de Unica y 66 de Gabriela.

❖ **Conclusiones y recomendaciones**

El proceso de multiplicación de papa es un trabajo rutinario donde se tiene establecido un protocolo proporcionado por el Centro Internacional de la Papa desde el año 1986 y que hasta la actualidad solo ha tenido leves cambios al trabajar con variedades como la I-Fripapa que requiere menos cantidad de vitaminas con relación a la variedad Superchola que es muy exigente en todas ellas. Este protocolo, conjuntamente con el Sistema autotrófico hidropónico

adoptado por el INIAP desde el año 2002, facilita la adaptación de las plantas a condiciones de invernadero.

Resultado 1: Propagación *in vitro*

Actividad A2: Multiplicación plantas irradiadas de papa (para precocidad)

Responsable: : J. Duque, J. Benítez

❖ Introducción

A lo largo de la historia, la papa (*Solanum tuberosum*) como cultivo alimentario ha sido domesticada y mejorada hasta llegar a las variedades actuales. Para el mejoramiento genético de la papa se han empleado metodologías que van desde la simple selección visual, hasta el aprovechamiento del germoplasma silvestre de especies filogenéticamente relacionadas con la especie cultivada. Además por medio de cruces intervarietales se han obtenido un alto número de recombinaciones. Así mismo se ha incursionado en técnicas como el uso de dihaploides, el cultivo de tejidos, la hibridación somática, y el empleo de agentes mutagénicos (Hernández y Sosa, 1988). *Solanum tuberosum* posee grandes ventajas en el mejoramiento por su potencialidad productiva y diversidad genética, pero estas mismas características la convierten en un material genéticamente complejo para la obtención de nuevas variedades (Camadro y Mendiburu, 1988), además siguiendo la línea tradicional de mejoramiento toma mucho tiempo en la generación una nueva variedad, por algunos factores como una baja intensidad del crecimiento celular, un número de poblaciones pequeño y por ende un tiempo demasiado extenso para la selección (Pérez, 1998). Así en la búsqueda de mejorar o cambiar un carácter en variedades existentes sin alterar el resto del genotipo y en un tiempo más corto, el uso de biotecnologías como la mutagénesis (proceso de ocurrencia de mutaciones a nivel molecular), constituye un método alternativo de mejora genética que se está retomando y afianzando en algunos países, por lo que el INIAP busca implementarlo en dos variedades de papa de importancia local y comercial. Las variedades INIAP-Fripapa y Superchola, de amplia demanda en el mercado nacional (Vallejo, 2003), son variedades tardías (entre 150 y 160 días). Estudios sugieren que dos QTLs (segmentos de ADN estrechamente ligados a genes que afectan a un carácter cuantitativo como la precocidad) previamente identificados para resistencia a tizón tardío (*Phytophthora infestans*) y para madurez foliar en el cromosoma 5 corresponden a un gen con efecto pleiotrópico para ambos rasgos (Visker, 2005). En este contexto, el objetivo de este proyecto es generar mutantes con características de precocidad, desvinculando la asociación entre estos caracteres ya que por el mejoramiento convencional resulta largo y requiere progenies numerosas. Broertjes y Van Harten (1978) anteriormente y más recientemente Ahloowalia y Maluszynski, (2001) entre otros, nos ponen de manifiesto que las técnicas de mutagénesis inducida en combinación con el cultivo de tejidos y con métodos moleculares, pueden aplicarse en el mejoramiento de la papa como parte de la larga lista de nuevas variedades cultivadas con caracteres deseables propagadas vegetativamente. Según los datos de la FAO/IAEA (2009), se registran actualmente a nivel mundial 2570 variedades de plantas obtenidas por inducción con agentes físicos (rayos X y Gamma) y químicos (colchicina por ejemplo), de las cuales seis variedades corresponden a papa. Además la utilización de métodos moleculares facilita la búsqueda de polimorfismos entre una gran variedad de cultivos, pudiendo aplicarse en la caracterización de mutantes inducidos por radiación gamma (Lapade et al. 2002).

❖ Objetivos:

- Determinar la dosis adecuada de irradiación por cada variedad (INIAP-Fripapa y Superchola)
- Seleccionar a los mutantes precoces *in vitro* por medio de microtuberización inducida

❖ Hipótesis:

Ho: No se obtendrán mutantes con tuberización precoz de las variedades de papa INIAP-Fripapa y Superchola al ser sometidas a mutagénesis inducida

❖ Materiales y Métodos

Material vegetal: El material biológico comprendió plántulas cultivadas *in vitro* libres de virus de las variedades comerciales de papa INIAP-Fripapa y Superchola. La irradiación de las muestras vegetales se realizó en los laboratorios de la Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica (CEEA) en Aloag-Santo Domingo.

Irradiación de explantes *in vitro* para la determinación de la dosis adecuada de rayos

Gamma: Como explantes se utilizaron 25 yemas apicales y 25 laterales para cada dosis, de las plántulas *in vitro* aproximadamente de 45 días de edad tanto de la variedad INIAP-Fripapa como de Superchola. Los explantes fueron colocados en cajas petri desechables con unas gotas de agua desionizada estéril para evitar cualquier toxicidad que pueda presentarse en su entorno a causa de la radiación. Para la irradiación se utilizó un irradiador con fuente Co_{60} perteneciente a la Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica (CEEA), calibrado considerando el decaimiento radioactivo para que su dosificación (Grays/min) sea exacta el día de la irradiación. Los explantes fueron irradiados con diferentes dosis de rayos Gamma, (0, 20, 40, 60, 80 y 100 Grays) e inmediatamente traspasados a tubos de ensayo con medio sólido básico para el desarrollo de papa y cultivados por 30 días a $20^{\circ} C \pm 2$, con una humedad relativa de 70 – 80 %, con un fotoperiodo de 14 h. luz. La determinación de la dosis adecuada de irradiación se realizó luego de los 30 días, de acuerdo a las respuestas morfológicas que presenten las plántulas al ser evaluadas por medio del test de sensibilidad a la radiación (TSR). El test consiste en determinar la dosis letal media (DL50) y evaluar la sobrevivencia del 70% de la población (basados en pruebas preliminares), para lo cual se realizó un análisis de probabilidades con respecto a la sobrevivencia; además de evaluar la reacción a la radiación de la variable altura de planta.

Selección de mutantes *in vitro* con tuberización precoz: Con las dosis de rayos Gamma seleccionada para cada variedad y para cada tipo de explante, se procedió a irradiar 1000 explantes de la variedad INIAP-Fripapa y 500 explantes de la variedad Superchola del mismo modo descrito anteriormente y los explantes sembrados se colocaron bajo las mismas condiciones en cuarto de cultivo. A estos explantes se los denominó MV_0 o generación mutante inicial. Con el objetivo de estabilizar genéticamente a las plántulas irradiadas, se multiplicó *in vitro* las plántulas sobrevivientes hasta llegar a la tercera generación mutante (MV_1 - MV_3), tomando de tres a cuatro explantes por plántula y se llevó registros de su procedencia. Con el fin de seleccionar plantas precoces se indujo a tuberización *in vitro* a la totalidad de la población de la generación MV_3 . Se seleccionaron plántulas que tubercularon más tempranamente (con presencia de microtubérculos) *in vitro* respecto a las variedades sin irradiación.

❖ Resultados, avances y discusión

Determinación de la dosis letal media (DL₅₀) y la dosis adecuada de irradiación: La dosis letal media (DL₅₀) mostró valores bastante altos de dosificación, pero como es conocido que esta actúa como una prueba patrón que evita la posibilidad de hacer medidas en los extremos y reduce la cantidad de pruebas requeridas, se la consideró como una medida que únicamente nos da el límite bajo el cual se puede aplicar irradiación. Así, basados en la necesidad de alcanzar grandes poblaciones y sobre todo en pruebas preliminares, el criterio de selección fue encontrar una dosis que permita una sobrevivencia de la población del 70% (Cuadro 1).

Cuadro 1. Valores de dosificación (rayos Gamma) obtenidos por medio del análisis de probabilidades (PROBIT) al evaluar explantes provenientes de ápices y yemas *in vitro* de las variedades INIAP-Fripapa y Superchola, para obtener una sobrevivencia del 70% y/o reducción de la altura en un 30% a los 30 días de la irradiación.

VAR. FRIPAPA		VAR. SUPERCHOLA	
SOBREVIVENCIA	ALTURA DE PLANTA	ÁNÁLISIS PROBIT	ALTURA DE PLANTA

ÁPICES	32	28	35	18
YEMAS	22	22	33	24

Como se observa en el cuadro 1 los valores obtenidos por el análisis de probabilidades fueron de 32 y 22 Grays para ápices y yemas de INIAP-Fripapa y de 35 y 33 Grays para ápices y yemas de Superchola respectivamente. Ya que la reducción de la altura de la planta en un 30% es un parámetro muy útil en la selección de la dosis de radiación en plantas (Rodríguez et al. 1995), los valores obtenidos de esta variable por el análisis Probit para INIAP-Fripapa (28 Gy para ápices y 22 Gy para yemas) fueron seleccionados como adecuados al estar cercanos a los valores de sobrevivencia al 70% (cuadro 1). Para Superchola los valores obtenidos para la reducción de la altura de planta en un 30% fueron de 18 Gy para ápices y 24 Gy para yemas (cuadro 1), los cuales son bajos, relacionados con los valores obtenidos por el análisis de sobrevivencia al 70% y pruebas preeliminares, por lo cual se consideró únicamente a los valores de sobrevivencia (35 y 33 Grays) como determinantes en la selección de la dosis para esta variedad. Se observa que los valores obtenidos son cercanos a los registrados por Sonnino, Ancora y Locardi (1986), Murillo y Mendoza (1998), Van Harten et al. (1972), Hoogkamp (2001), entre otros, al irradiar distintas variedades de papa como Desirée, Bola luk`y, Luk`y Kheto; sobre distintos tipos de órganos vegetales *in vitro*, utilizado dosis en un rango de 22-30 Grays. La Figura 6 muestra las curvas de la sobrevivencia que permiten determinar las dosis a ser suministradas al obtener el 30% de mortalidad. Como se observa para las variedades INIAP-Fripapa y Superchola es evidente la mortalidad de las muestras vegetales con el aumento de la dosis de radiación.

Selección de plantas irradiadas con tuberización precoz inducida: Al final de la tercera generación (MV3) se obtuvo una población final de 4647 plántulas de INIAP-Fripapa y 8148 plántulas de Superchola. Los porcentajes de plántulas seleccionadas de los individuos antes mencionados, con características de precocidad como producto de la inducción a tuberización se observan en el cuadro 2. Cabe mencionar que la tuberización de las plántulas irradiadas comparadas con las plántulas no irradiadas (controles) tiene una distancia en general de cinco días en la aparición de los microtubérculos desde el día de la inducción.

Estos porcentajes se consideran bajos, pero dado que en *Solanum tuberosum* la precocidad en papa es un rasgo en el que podrían estar involucrados 37 QTLs (Fernandez et al. 2007), además de estar determinado por factores endógenos y externos (Ewing & Struik, 1992), se puede comprender el bajo porcentaje de mutantes obtenidos y considerar a estas poblaciones como potenciales clones mutantes con características de precocidad en relación a las variedades de origen.

Cuadro 2. Porcentaje de plántulas mutadas con características de precocidad provenientes de ápices y yemas irradiadas de las variedades INIAP-Fripapa y Superchola al final de la tercera generación luego de ser sometidas a microtuberización.

	VAR. SUPERCHOLA		VAR. FRIPAPA	
	ápices	yemas	ápices	yemas
Población final por variedad (MV3)	8148		4647	
Población final por explante	2451,0	5697	957	3690
Plántulas irradiadas precoces seleccionadas	10	13	28	22
% plántulas seleccionadas	0.4	0.2	2.9	0.6

❖ Conclusiones y recomendaciones

Las dosis adecuadas seleccionadas de radiación Gamma sobre ápices y yemas de la variedad INIAP-Fripapa para la búsqueda de mutaciones son de 28 y 22 Gy, respectivamente. Para la variedad Superchola son de 35 y 33 Gy para ápices y yemas respectivamente.

Se puede considerar como válida la tuberización *in vitro* inducida como estrategia de selección fenotípica, ya que en todos los casos las plántulas irradiadas presentaron tuberización precoz en relación a las plántulas no irradiadas.

Los porcentajes de plántulas precoces irradiadas y seleccionadas por la inducción a la tuberización *in vitro*, nos indican que hubo diferencia entre el porcentaje obtenido en plántulas provenientes de ápices de Fripapa con 2.9%, comparado con el porcentaje de plántulas provenientes de yemas con 0.6%. Al comparar los porcentajes de plántulas precoces irradiadas de Superchola con 0.4% y 0.2% provenientes de ápices y yemas, respectivamente, en cambio no se observa una diferencia estadística significativa.

❖ Bibliografía citada

- Ahloowalia, B.S. y Maluszynski, M. 2001. Induced mutations-A new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118 (2):167-173.
- Broertjes, C y van Harten, A.M. 1978. Application of Mutation breeding in the Improvement of Vegetatively Propagated Crops: An Interpretative Literature Review. Elsevier Science Publishing, Amsterdam and New York.
- Camadro E. & Mendiburu A. 1988. Utilización de germoplasma en el Mejoramiento de la papa. *Revista Latinoamericana de la Papa* 1, 35-43
- Ewing EE, Struik PC. 1992. Tuber formation in potato: induction, initiation, and growth. *Horticultural Reviews* 14, 89–198.
- FAO/IAEA. 2009. MVD (Mutant Varieties Database). Base de datos (en línea). Plant and Genetic Section. Viena, Austria. Consultado 2008-04-09. Disponible en <http://www-infocris.iaea.org/MVD/>
- Fernandez A., Celis C., Visser R., & Bachem C. 2007. Targeted transcript mapping for agronomic traits in potato. Wageningen University and Research Centrum, Department of Plant Sciences, Laboratory of Plant Breeding. The Netherlands.
- Hernández M.A. y Sosa R. 1988. Uso de mutágenos en el mejoramiento de la 'papa *Solanum tuberosum* L. *Revista Latinoamericana de la Papa*. 1(1):104-119
- Hoogkamp T.J.H. 2001. Two approaches for induction and isolation of starch mutants in potato (*Solanum tuberosum* L.): random versus gene targeted mutagenesis. In Wageningen University dissertation no. 3048, October 8, 2001
- Lapade A., Nazarea T., Veluz A., Marbella L., Nato A., Coloma C., & Asencion A. 2002. Status of mutation breeding in vegetatively propagated crops in the philippines. Philippine Nuclear Research Institute. FNCA Workshop on Mutation Breeding. August 20-23. Beijing, China.
- Murillo R.A. y Mendoza V. 1998. Breeding of bitter potato (*Solanum juzepczukii*) through mutation induction and tissue culture techniques. División de Agricultura-Lab. Biotecnología Vegetal, Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear (IBTEN), La Paz, BO.
- Pérez J. 1998. Mutagénesis *in vitro*. Pp. 299-311 in *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología: Introducción a la Mejora de Plantas*. (P.J. Pérez, ed.). Editora GEO.
- Rodríguez Fuentes C., Pérez Ponce, J. Fuchs A. 1995. "Mejora de Plantas". Ed Félix Varela, La Habana.
- Sonnino A., Ancora G., y Locardi C. 1986. *In vitro* Mutation Breeding of Potato: Use of propagation of microcuttings (Proceedings of an international symposium). International Atomic Energy Agency IAEA, Vienna, p. 386
- Vallejo S., Quingaísa E. & Troya X. 2003. Elementos estratégicos para promover la competitividad de la cadena agroalimentaria de la papa. Instituto Interamericano de la Cooperación para la Agricultura (IICA). Ecuador
- VanHarten A., M. Bouter H. y Ommeren A. 1972. Preventing quimerism in potato (*Solanum tuberosum*), *Euphytica* 21, p 11-21
- Visker M. 2005. Association between late blight resistance and foliage maturity type in potato- Physiological and genetic studies. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Yasmin S., Islam S., Nasiruddin K. y Alam S. 2006. Molecular Characterization of Potato Germoplasm by Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Biotechnology* 5 (1): 27-31. Asian Network for Scientific Information. Bangladesh

Resultado 1: Propagación *in vitro*

Actividad A3: Multiplicación de plantas irradiadas de papa (para resistencia)

Responsable: F. Villavicencio, J. Benítez

Colaboración: PNRT, CEEA, EPN

❖ **Introducción**

La necesidad de mejorar variedades cultivadas de papa así como materiales para obtener progenitores constituye el trabajo diario de los fitomejoradores. Así en la búsqueda de mejorar o cambiar un carácter en variedades de interés comercial sin alterar el resto del genotipo, el uso de mutagénesis *in vitro* mediante radiaciones ionizantes gamma conjuntamente con las técnicas de cultivo de tejidos constituye un método físico alternativo de mejora genética que se está retomando y afianzando en algunos países, por lo que buscamos implementarlo en la variedad de papa “Superchola” para resolver el problema específico de susceptibilidad al tizón tardío (*Phytophthora infestans*). La variedad “Superchola” además de ser de importancia local e institucional cuenta con una amplia demanda en el mercado nacional por lo que generar mutantes con características de resistencia a esta enfermedad contribuirá a resolver problemas en cuanto a la calidad del producto, costos de producción y salud del agricultor.

❖ **Objetivos del proyecto**

Objetivo general:

Generar mutantes de papa de la variedad “Superchola” con resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) mediante radiaciones ionizantes gamma.

Objetivos específicos:

- Establecer la dosis letal media y dosis óptima de radiación ionizante gamma para la variedad de papa “Superchola”.
- Determinar las diferencias morfológicas de los mutantes con relación a la variedad original “Superchola”, para seleccionar grupos de mutantes sólidos *in vitro*.
- Evaluar la resistencia a *Phytophthora infestans* de los mutantes sólidos, *in vitro*.

❖ **Materiales y métodos**

Esta investigación constará de cuatro fases. La primera se relacionó con la determinación de la dosis letal media (DL50) y la dosis óptima. La dosis óptima es el punto bajo la DL50 en el cual la población de las unidades experimentales, en cada dosis, haya sobrevivido en un 70%, con respecto a los explantes no irradiados, donde la sobrevivencia es del 100%. La segunda fase consiste en la micropropagación de las plantas, de la variedad “Superchola”, generadas a partir de explantes irradiados con dosis óptima de rayos ionizantes gamma. La tercera fase es la selección de mutantes sólidos y deformes en la generación mutante MV3. Finalmente la cuarta fase consiste en la evaluación de la resistencia de los mutantes a *P. infestans*, *in vitro*.

Determinación de la dosis letal media (DL50) y la dosis óptima: La unidad experimental consiste de una caja-petri con 25 explantes de yemas apicales y 25 explantes de yemas axilares provenientes de plantas de papa de la variedad “Superchola”, en agua desionizada estéril. Por cada dosis se irradiaron 2 cajas Petri con 25 explantes, cada una, de los cuales 25 explantes corresponden a cortes de yemas apicales y 25 explantes corresponden a cortes de yemas axilares. Los resultados serán representados en una ecuación lineal. Las variables que

entran en estudio, en esta primera fase de la investigación, serán el porcentaje de sobrevivencia, la altura de planta (cm), el número de nudos y la distancia entre nudos.

Micropropagación de los explantes irradiados con dosis óptima: La generación MV0 constó de 500 explantes provenientes de yemas apicales y 500 explantes provenientes de yemas axilares que fueron irradiados con dosis óptima y sembrados en medio de cultivo M&S. Una vez que las yemas adventicias se desarrollaron, se seleccionaron tres yemas adventicias, en promedio, que fueron cortadas y sembradas en un nuevo medio, por lo tanto, en la nueva generación MV1 contó con 1500 individuos generados a partir de las yemas axilares y 1500 individuos generados a partir de yemas apicales. A partir de la generación MV1 se realizaron dos micropropagaciones hasta obtener las generaciones mutantes MV2 y MV3, la última con alrededor de 13500 individuos provenientes de yemas axilares y 13500 individuos provenientes de yemas apicales. La población testigo correspondió al 10% del total de explantes irradiados, con dosis óptima.

Selección de mutantes sólidos y deformes: Las plantas sobrevivientes al final de la generación mutante MV3 fueron consideradas como mutantes sólidos, de los cuales se identificaron y seleccionaron aquellas plantas deformes de acuerdo a la fisiología de crecimiento en hojas y tallos.

Evaluación *in vitro* de los mutantes con resistencia a *P. infestans*: En esta fase de la experimentación se inoculó el hongo de filtrado de *P. infestans* a los mutantes sólidos para evaluar su resistencia. Se llevó a cabo el cálculo de los promedios de los mutantes sólidos, de acuerdo con el porcentaje de sobrevivencia, después de la inoculación del hongo. La variable en estudio de esta fase es: Porcentaje de sobrevivencia de los mutantes sólidos.

❖ Resultados, avances y discusión

A medida que se aumenta la dosis de radiaciones ionizantes gamma en fuente de Co-60, existe una disminución considerable en el porcentaje de sobrevivencia de los explantes irradiados, así como del tamaño de los mismos. En los explantes irradiados con dosis óptima, los cuales corresponden la generación mutante MV₀, a los 45 días de ser sometidos a la radiación con rayos gamma presentan cambios fisiológicos observables como en el tamaño de la planta, número de nudos y tamaño de las hojas.

Al final de la segunda fase que corresponde a la micropropagación de los explantes irradiados con dosis óptima se tiene una sobrevivencia del 52% de ápices y 62% de yemas laterales, estos explantes serán seleccionados como deformes y otros como mutantes sólidos los cuales será inoculados con el hongo. Deformes son considerados a aquellas plantas que muestren deformaciones en la fisiología de hojas y tallos, mutantes sólidos son aquellas plantas que fisiológicas muestren características fisiológicas iguales a las plantas testigo.

Del 52% de sobrevivencia de ápices en la generación mutante MV₃ el 25% corresponde a deformes y el 75% como mutantes sólidos; así, del 62% de sobrevivencia de yemas laterales 31% corresponde a mutantes deformes y 69% a mutantes sólidos. Los mutantes sólidos tanto de ápices como de yemas laterales fueron inoculados con el hongo *P. infestans*, para posterior evaluar las interacciones compatibles e incompatibles del hongo con los mutantes de acuerdo a la escala propuesta por Huang S. et al. (2005)

Con respecto a la fase en particular de la inoculación del hongo en las plantas mutantes, particularmente no he tenido experiencia para este tipo de trabajo, por lo que esta ultima fase de la experimentación se esta poniendo complicada, además no existe un protocolo establecido para la inoculación de *P. in vitro* en la variedad de papa "Superchola", el cual pueda servir como base.

❖ Conclusiones y recomendaciones

- A medida que se aumenta la dosis de radiaciones ionizantes gamma en fuente de Co-60, existe una disminución considerable en el porcentaje de sobrevivencia de los explantes irradiados, así como del tamaño de los mismos.

- En los explantes irradiados con dosis óptima, los cuales corresponden la generación mutante MV₀, a los 45 días de ser sometidos a la radiación con rayos gamma, éstos presentan cambios fisiológicos observables como en el tamaño de la planta, número de nudos y tamaño de las hojas.
- Los explantes irradiados con dosis óptima muestran una sobrevivencia de ápices del 93% y de yemas laterales del 70%, respectivamente, lo cual indica que los explantes provenientes de yemas laterales son menos resistentes a la radiación.
- Con respecto y basándose en la escala previa las interacciones incompatibles de los mutantes sólidos con el hongo son positivas para esta primera parte de experimentación en cuanto al macroproyecto, ya que estas plantas serán llevadas a campo para ser evaluadas.
- El 38% de mutantes sólidos correspondientes a los ápices y el 20% de yemas laterales mostraron incompatibilidad con el hongo, lo cual indica que las radiaciones ionizantes gamma son un método físico de mutación favorable para alcanzar resistencia en plantas susceptibles.

❖ **Bibliografía citada:**

Huang S., Vleehouwers V., Visser R. and Jacobsen E. 2005. An accurate in vitro assay for high-throughput disease testing of *Phytophthora infestans* in potato. Laboratory of Plant Breeding. Department of Plant Sciences, Wageningen University. The Netherlands. Pp 89:1263-1267

Resultado 1: Propagación *in vitro*
Actividad A4: Limpieza de virus en diez variedades nativas de papa
 Responsable: J. Benítez y C. Delgado

❖ Introducción

En el cultivo de la papa, las enfermedades causadas por virus son uno de los problemas fitopatológicos más importantes, ya que están asociados a la reducción o pérdida en el rendimiento del tubérculo (Miño et al. 2001). En las variedades de papas nativas, se pueden encontrar virus que no se han reportado hasta el momento en el Ecuador, como el virus del mosaico suave (PVA) y otros virus, en donde se puede probar variaciones de temperatura y el cultivo de meristemas para la limpieza de éstos virus. Igualmente, se ha encontrado en la mayoría de estas variedades virus de difícil erradicación, como es el caso del virus S. Para promover el cultivo de las papas nativas, es necesario entre otras cosas, disponer de semilla con calidad garantizada para asegurar una buena producción. La semilla es el insumo más importante en la producción de papa, una buena semilla de papa es aquella que garantiza una alta calidad sanitaria y se encuentre libre de enfermedades habitantes del suelo y especialmente virales que se perpetúan en el tubérculo-semilla. La industria ha visto un mercado potencial en las variedades de papas nativas, tanto en su consumo en fresco como procesadas tipo baby/coctel para lo que necesita de un abastecimiento de la materia prima, y así incentivar a los productores a cultivar estas variedades que se encuentran en peligro de extinción. Los procesos actuales de erradicación de virus establecidos para variedades comerciales de papa, no resultan según pruebas preliminares totalmente eficaces en variedades nativas, como es el caso del virus S de la papa de difícil eliminación, por lo que es necesario establecer para papas nativas nuevos protocolos con reajustes en las variaciones de temperatura y cultivo de meristemas, que permitan tratamientos más eficaces. Además sean realizados pruebas serológicas preliminares con variedades de papas nativas donde se encuentra presente el virus A de la papa, que no se ha reportado en el país hasta el momento y en combinación con el virus X o Y pueden ocasionar pérdidas significativas en la producción. Esta investigación aportará así, a que el INIAP ofrezca semilla de calidad de las variedades de papas nativas, que permita a los agricultores obtener mejores rendimientos y un adecuado refrescamiento de semilla cuando lo requieran.

❖ Objetivos

General:

Evaluar tres variaciones de termoterapia y cultivo de meristemas en diez variedades promisorias de papas nativas, para la producción de semilla de calidad.

Específicos:

- Determinar la presencia de virus en las diez variedades promisorias de papas nativas mediante la técnica serológica de ELISA y por plantas indicadoras.
- Eliminar los virus detectados en las diez variedades de papas nativas, mediante las tres técnicas de termoterapia y cultivo de meristemas.

❖ Hipótesis:

Ho: Las técnicas de termoterapia y cultivo de meristemas no eliminan los virus de la papa.

❖ **Materiales y métodos**

El presente trabajo se llevará a cabo con la colaboración del Programa Nacional de Raíces y Tubérculos (rubro-papa), el cual nos proporciona de tubérculos de papa de las variedades nativas. Para inducir a la brotación se coloca a los tubérculos en un cartón cerrado (luz difusa). Obtenidos los brotes se realiza el test serológico de DAS-ELISA, para comprobar la presencia de virus. Posteriormente se procede a la desinfección de los brotes para colocarlos en medio de cultivo Murashige-Skoog (M&S). Se realizan las micropropagaciones necesarias hasta obtener el número de plántulas *in vitro* de las variedades nativas para colocarlas en la cámara de termoterapia, entablado los tratamientos de termoterapia. Transcurrido los días de tratamiento de estrés térmico se procederá al corte de los meristemas de cada variedad de papa nativas. Los meristemas se cortarán con uno o dos primordios foliares, y se colocarán en medio de cultivo M&S para su regeneración en plántulas completas. A las plántulas se realizará el test serológico de DAS-ELISA para su comprobación de limpieza de virus.

❖ **Resultados, avances y discusión**

Se ha realizado el Test serológico DAS-ELISA, el cual ha identificado la presencia de los siguientes virus en las variedades de papas nativas: Mosaico latente (PVX), Mosaico severo (PVY), Virus S de la papa (PVS), y PVA. La actividad de limpieza de virus en papas nativas, se encuentra en el presente momento en pruebas preliminares de temperatura, debido a que entablado el tratamiento de termoterapia a 38 °C durante 40 días se produce una alta mortalidad de las plántulas *in vitro*, por lo que no sobreviven ni 10 días de establecido el ensayo.

❖ **Conclusiones y recomendaciones**

Se ha comprobado la presencia de virus en las variedades de papas nativas, por lo que se hace necesario la limpieza de estas variedades para entregar a los productores semilla de calidad que les asegure una alta producción y calidad.

Se recomienda probar temperaturas inferiores a 38 °C por un periodo más corto en variedades de papas nativas.

❖ **Bibliografía citada:**

Miño, L., Cermeli M., Becerra F., Flores M. 2001. Fluctuación poblacional de áfidos en dos localidades productoras de papa en el estado Mérida, Venezuela. Revista latinoamericana de la papa. Volumen 12. Número 1: p 57 – 71.

Resultado 1: Propagación *in vitro*

Actividad A5: Mantenimiento *in vitro* de 31 clones promisorios de yuca del CIAT

Responsable: J. Benitez

❖ Introducción

La yuca (*Manihot esculenta* C.) es un cultivo tradicional que se produce en la costa occidental, la Amazonía oriental y en algunos lugares tropicales del callejón interandino como Loja y Santo Domingo de los Colorados. Es cultivada por pequeños agricultores que no usan las nuevas técnicas de la agricultura y que al contrario el cultivo lo maneja de forma precaria ya que se desarrolla en suelos de poca fertilidad. En los últimos años ha tomado una gran importancia por los requerimientos de la agroindustria por la producción de almidón, el cual es utilizado en la industria alimenticia, textil, papelería y para la producción de alcohol. En el año 2006 llegó a la Estación Santa Catalina del INIAP, 31 clones de yuca de alto potencial para uso agroindustrial procedentes del Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, para su multiplicación y su venta a la Empresa La Fabril. Cuando este trabajo se concluyó este material se quedó en el INIAP y hasta la fecha se lo ha mantenido en el Laboratorio de Cultivo de tejidos del Departamento de Biotecnología. Se tiene previsto entregar la custodia de estos materiales al DENAREF, pero las condiciones de cultivo son diferentes a las que mantiene el cuarto de cultivo del Laboratorio de Conservación *in vitro* del DENAREF, por lo que hasta la fecha estos materiales se mantienen en un cuarto de cultivo con una temperatura de 25°C y una humedad relativa de 70%. Cabe indicar que en la actualidad de los 31 clones se han conservado 29, pues debido al traspaso al nuevo laboratorio, dos clones se perdieron precisando que éstos materiales desde sus inicios tenían problemas de adaptación.

❖ Objetivo:

Conservar *in vitro* 29 clones de yuca enviados por el CIAT.

❖ Hipótesis:

La conservación *in vitro* es un método eficiente para mantener germoplasma de yuca

❖ Materiales y métodos

Un total de 28 clones de yuca de la Colección del CIAT (tabla 1), con potencial de uso para la agroindustria se conservan en el siguiente medio de conservación: Sales de Murashige y Skoog, sucrosa al 2%, manitol 4%, agar 0.8% (pH 5.7).

Código accesiones			
Cm 6740-7	Cm 7514-8	HMC-1	Cm 4843-1
Cm 7951-5	Cm 2766-5	Cm507-37	Sm 1460-1
Sm 805-15	Sm 1565-15	Cm 2177-2	BRA-385
Cg 1450-4	MCOL1468	Cm2772-3	PER-183
Cm 7514-7	Cm 2600-2	Cm 4919-1	TAI-8
Cm 6438-14	Cm 3306-4	Cm 523-7	CR-31
Cg 1141-1	Sm 909-25	Cm 7033-3	CR-30
Cm 4574-7			

❖ Resultados, avances y discusión

Los materiales de yuca se encuentran en buenas condiciones en el cuarto de cultivo para especies de clima templado.

❖ Conclusiones y recomendaciones

Traspasar la custodia del germoplasma al DENAREF, unidad que tiene la misión de conservación de recursos fitogenéticos.

Resultado 1: Propagación *in vitro*

Actividad A6: Multiplicación *in vitro* de naranjilla

Responsable : J. Benítez

❖ Introducción

La naranjilla es una fruta originaria de los bosques de la región subtropical húmeda, cuya demanda ha crecido considerablemente, por su valor nutritivo y por la perspectiva para la exportación. Su propagación generalmente es por semilla, aunque también se lo puede hacer por estacas con buenos resultados o también utilizando las técnicas de cultivo de tejidos. Estas biotecnologías son técnicas que se utilizan en los Programas de Mejoramiento de muchas especies, como los frutales, ya que a partir de plantas madres seleccionadas por su resistencia a enfermedades o su alta productividad pueden generar millones de plántulas propagadas clonalmente. La eliminación de enfermedades, especialmente las causadas por virus a través de termoterapia, cultivo de meristemas o por microinjertación, como se realiza en los cítricos es otra de las ventajas de usar estas técnicas en la producción de frutales como la naranjilla.

❖ Objetivos

General:

Producir 16.000 plantas *in vitro* de naranjilla para ser entregadas al Programa de Fruticultura

Específicos:

- Establecer un protocolo para la producción *in-vitro* de plantas de naranjilla.
- Seleccionar 10 clones de naranjilla resistentes a *Fusarium spp.* para ser introducidos *in vitro*

❖ Hipótesis:

Ho: La naranjilla no responde a la reproducción meristemática

❖ Materiales y métodos

De las plantas de naranjilla previamente seleccionadas por su resistencia a *Fusarium spp.* se toman yemas apicales y laterales de plantas que se encuentran creciendo en invernadero. Estos explantes son desinfectados en el laboratorio por 2 min. en alcohol al 70 % y luego enjuagados en agua destilada estéril. Más tarde se utiliza hipoclorito de sodio al 1 %, se colocan los explantes por 10 a 15 min. y se los lava por tres ocasiones con agua destilada esterilizada. Una vez desinfectados son trasladados a un medio de cultivo, que contiene todas las sales inorgánicas y compuestos vitamínicos propuestos por Murashige y Skoog, al cual se le adiciona 1mg/L de putresina, 1mg/L de Pantotenato de Calcio, 0.05 mg/L de ácido Giberélico, con sucrosa al 20 % y agar al 0,75 %.

Para la micropropagación, los explantes sanos libres de contaminación son colocados en un medio de Murashige y Skoog la cual se le adiciona 1 mg/L de pantotenato de Calcio, 0.01 mg/L de ácido Giberélico con 20% de Sucrosa y agar al 0.75 %. Luego son colocados en un cuarto de cultivo a una temperatura de 22 °C, una humedad relativa del 70 % y un fotoperíodo de 16 horas, para su crecimiento. En seis semanas el material alcanza una altura de 10 cm. y se

procede a enviar una muestra compuesta de hojas y tallos para el análisis serológico y así determinar la presencia o ausencia de virus. A partir del material libre de virus, se procede a la micropropagación de yemas apicales y laterales , hasta obtener una buen número de plantas que estén listas para ser trasplantadas a invernadero para su adaptación.

❖ **Resultados, avances y discusión**

Al momento se han introducido tres clones del material proporcionado por el Programa de Fruticultura: 42 P5-F8, 7 F7P1 y 24-F2. Se han tenido problemas de adaptación con otros dos clones introducidos y esto se debe a alta contaminación que se encuentra en los explantes mismos. Además se ha presentado un problema de oxidación del explante para lo cual se resolvió adicionar 3500 mg/L de carbón activado para evitar este problema fenólico.

❖ **Conclusiones y recomendaciones**

Aunque se ha establecido un medio de cultivo para la introducción y multiplicación de naranjilla, todavía se tienen problemas en la fase de introducción debido a las condiciones no asépticas en que se encuentra el material madre. De todas maneras el programa de Fruticultura nos ha proporcionado nuevo material y seguiremos ensayando para obtener plantas de alta calidad para el 2009.

Resultado 1: Propagación *in vitro*

Actividad A7: Multiplicación *in vitro* de mora y naranjilla

Responsable: J. Benítez:

❖ Introducción

En los últimos años el cultivo de mora y de naranjilla se han incrementado en las provincias de Pichincha, Tungurahua y Pastaza donde las condiciones climáticas son favorables para su desarrollo y producción. La propagación *in vitro* se ha hecho necesaria debido a la demanda cada vez mayor de éstos frutales. Es importante recalcar que en los últimos años, la multiplicación *in vitro* ha tomado gran importancia ya que el material propagado bajo estas técnicas ofrece garantías de calidad y sanidad con relación a la producción tradicional la cual conlleva la transmisión y contaminación de plagas y enfermedades. Además esta metodología facilitará la multiplicación de algunas accesiones con características agronómicas deseables (materiales elite) que por hoy solo se las encuentra en pequeñas localidades y que son un gran potencial para fines de investigación y para uso de los pequeños agricultores.

❖ Objetivos:

- Establecer protocolos para la multiplicación *in vitro* de mora y naranjilla
- Multiplicar 10.000 plantas de mora y naranjilla por propagación meristemática

❖ Hipótesis:

Ho: La propagación meristemática no es una tecnología viable para la reproducción de clones elite de mora y naranjilla

❖ Materiales y métodos

Los explantes fueron traídos de la Granja de Tumbaco del INIAP y se seleccionaron yemas axilares de plantas adultas que aparentemente eran sanas y vigorosas. Las yemas fueron llevadas al laboratorio donde se los lavó con jabón y agua corriente por el lapso de cinco minutos. Luego en condiciones asépticas fueron desinfectadas con hipoclorito de Sodio al 30 % durante 20 minutos y luego sembradas en un medio nutritivo a base de sales de Murashige Skoog. Los medios para mora y naranjilla se detallan en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Medio probados para la introducción y micropropagación de mora.

Componente	Reactivo	Medio A	Medio B
Medio	MS	4.3 g/L	4.3 g/L
Vitaminas	Pantotenato de Calcio	1 mg/L	0,5 mg/L
Vitaminas	Ac. Fólico	0.5 mg/L	
Antioxidantes	Ac. Ascorbico	300 mg/L	300 mg/L
Hormonas	BAP	1 mg/L	0.3 mg/L
Hormonas	AG3	0.01 mg/L	0.3 mg/L
Sucrosa		30 g/L	30 g/L
Agar		7 g/L	7g/L

Por la alta producción de fenoles fue necesario adicionar a los dos medios 1,5 g/L de Carbón activado para evitar la muerte de los explantes.

Tabla 2. Medio de Introducción para naranjilla

Componente	Reactivo	Medio A	Medio B
Medio	MS	4.3 g/L	4.3 g/L
Vitaminas	Pantotenato de Calcio	2 mg/L	2 mg/L
Vitaminas	Putrescina	1 mg/L	1 mg/L
Hormonas	AG3	0.2 mg/L	0.05 mg/L
Carbón activado	-	1 mg/L	1mg/L
Sucrosa	-	20 g/L	20 g/L
Agar	-	7 g/L	7g/L

Tabla 3. Medios de multiplicación para naranjilla

Componentes	Reactivo	Medio C	Medio D
Medio	MS	4.3 g/L	4.3 g/L
Vitamina	Pantotenato de Calcio	2 mg/L	2 mg/L
Vitamina	Glicina	1 ml/l	1 ml/L
Hormonas	AG3	0.25 mg/L	0.05 mg/L
Hormonas	IAI		0.01 mg/L
Sucrosa	-	20 g/L	20 g/L
Agar	-	7 g/L	7g/L

❖ Resultados, avances y discusión

Para la mora la fase de introducción tuvo muchos inconvenientes por la cantidad de fenoles que tiene algunas accesiones, pero en sí el proceso de desinfección del material dió un porcentaje promedio del 70% de material limpio. De los dos medios de cultivos utilizados se observó una aceptable brotación de las yemas con un índice de 1:5 en el medio B.

La técnica de desinfección para el material de naranjilla tuvo muchos inconvenientes, ya que los explantes morían, por lo tanto se optó por bajar el tiempo de exposición al hipoclorito a 10 minutos pero aunque se redujo la mortalidad, el porcentaje de contaminación fue del 70 %, por lo que en éste momento se está ajustando un poco más éste protocolo para reducir la contaminación de los explantes. De los explantes sobrevivientes, se los colocó en dos medios A y B, y se determinó un mejor desarrollo de la planta en el medio B, ya que en el medio A los explantes crecieron alongados y de poco vigor. Para el proceso de multiplicación, no se presentó una diferencia significativa en cuanto a vigor de las plantas, solo el tiempo de crecimiento en el medio A fue de 6 semanas con relación al medio B que dura 8 semanas.

❖ Conclusiones y recomendaciones:

Para el caso de mora de las 10 accesiones que nos ha proporcionado el Programa de Fruticultura de la Granja Tumbaco, al momento se encuentran en proceso de multiplicación los clones 163, 37, 125, 156, los mismos que se los está propagando en el medio B. Con los otros seis restantes se seguirá ensayando el proceso de introducción, especialmente para la oxidación ya que se debe tomar en cuenta que cada clon tiene condiciones especiales y unos producen más fenoles que otros, de todas maneras se seguirá probando con otros antioxidantes como el ácido cítrico.

Para la naranjilla, se determinó que los medios B y D son los que se utilizarán para el proceso de introducción y multiplicación respectivamente. El mes de Enero el programa de Fruticultura nos dará los explantes de los clones que se requieren para la producción masiva y mientras tanto se seguirá probando la desinfección que es donde se tiene dificultades

Resultado 2:	Estudios especiales en cultivo de tejidos
Actividad A1:	Ensayos de cultivos de anteras en cuatro genotipos de maíz
Responsable:	M. Aguilar, J. Benitez

❖ Introducción

El maíz es el tercer cereal más importante a nivel mundial después del trigo y del arroz (FAO, 2000). Su producción se ha incrementado sustancialmente debido al amplio uso de híbridos, sin embargo la liberación de nuevos híbridos requiere del cruce de patrones altamente homocigotos, tardando entre 5 a 7 años la generación de líneas puras. Pese a que en la actualidad se han liberado híbridos comerciales a través de líneas puras obtenidas por cultivo de anteras en tan solo 2 años, el maíz sigue siendo una especie recalcitrante respecto a la respuesta androgénica comparada con otras especies como cebada y arroz (Saisingtong, 1996). La frecuencia de plantas derivadas de microsporas y generadas por cultivo de anteras es baja y generalmente se obtiene de genotipos que se sabe responden al cultivo de anteras (Pescitelli et al. 1989; Beckert 1994, Buter 1996). La inducción de androgénesis en microsporas puede ser afectada por varios factores que pueden causar baja frecuencia de inducción, tales como condiciones de crecimiento de la planta donadora, estado de desarrollo de las microsporas, pretratamiento de la panoja, métodos de cultivo, el medio usado, las condiciones de cultivo y por una marcada dependencia del genotipo (Afza et al. 1999). Según Saisingtong (1996) la aptitud de respuesta androgénica es un rasgo altamente heredable determinado por un limitado número de genes. Para genotipos recalcitrantes, la mayoría de los avances hacia mejorar la respuesta androgénica se enfocan principalmente al uso de factores de stress que induzcan androgénesis alterando irreversiblemente el desarrollo gametofítico hacia un desarrollo esporofítico de la microspora (Obert & Barnabás 2003). Una de las mayores exigencias en el uso de cultivo de anteras en programas de mejoramiento de maíz es la identificación de genotipos que respondan a la formación de callos. El objetivo de este trabajo fue identificar entre cuatro genotipos de maíz, cual o cuales de ellos responden al cultivo de anteras y desarrollar un método para cada uno que permita iniciar eficientemente embriogénesis en microsporas a través de la aplicación de inductores químicos y tratamientos físicos que estimulen a la microspora hacia un desarrollo esporofítico.

❖ Objetivos

General:

Identificar el/los genotipo(s) con la mejor respuesta al cultivo *in vitro* de anteras así como la concentración óptima de colchicina, para la obtención de líneas dobles haploides.

Específicos:

- Identificar el/los genotipo(s) con la mejor respuesta al cultivo *in vitro* de anteras
- Evaluar las metodologías de inducción de callo y regeneración de brotes
- Evaluar las concentraciones de colchicina para la inducción a la duplicación de cromosomas

❖ Hipótesis:

Ho: No existe respuesta diferencial de los genotipos evaluados al cultivo *in vitro* de anteras y no se ha demostrado la dosis óptima de colchicina para la obtención de dobles haploides.

❖ Materiales y métodos

Material vegetal donante: En el presente estudio fueron usados los siguientes genotipos como plantas donadoras de anteras: INIAP- 101, INIAP-601, DEKALB-5005, y AG-003 (ninguna de ellas es una línea pura). Las plantas crecieron bajo las condiciones climáticas de la zona: “Granja Experimental de Tumbaco - INIAP”, y el material donante fue recolectado de sucesivas siembras durante los meses de enero a junio.

Cultivo de anteras: Las panojas fueron recolectadas previo a emerger de la hoja bandera, y aún rodeadas de tres a cuatro hojas; fueron envueltas en papel absorbente ligeramente humedecido, y cubierto con papel aluminio, inmediatamente se sometieron a pre-tratamiento frío (7 días) a 7°C. Previo al cultivo se dividió la panoja en tres partes iguales (ápice, mitad y base), se extrajo anteras de cada una y se examinó microscópicamente el estado de desarrollo de las microsporas. La fracción que contenía en su mayoría microsporas en estado uninucleado medio o tardío (figura 1) se sometió a una esterilización superficial con Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 1.5% durante 20 minutos seguido por cuatro lavados con agua destilada y autoclavada previo a su cultivo. Las anteras fueron removidas de las espiguillas y sometidas a tres medios de precultivo: el medio de precultivo “D” (Genovesi, A. and Yingling, R. 1995) del protocolo 2, el medio IML (Barnabás 2005) del protocolo 3, y el medio MMA (Zheng 2001) del protocolo 4, durante 10, 3 y 7 días respectivamente; en el protocolo 1 no se usó ningún medio de precultivo. Después de cada precultivo, las anteras fueron traspasadas a cajas Petri de 100x15mm, conteniendo medio de inducción semisólido específico para cada precultivo y con una densidad de 80 anteras por caja Petri. Cuatro medios de inducción fueron evaluados: el medio “A” compuesto por sales N6 (Chu 1978), ácido nicotínico 0.5mg/l, piridoxina HCl 0.5 mg/l, tiamina HCl 1mg/l, ácido triiodobenzóico (TIBA) 0.1 mg/l, caseína hidrolizada 500 mg/l, carbón activado 5g/l, sucrosa 90g/l y gelrite 0.8g/l; el medio “B” o 6N1TGR-P4 (Genovesi, A. and Yingling, R. 1995); el medio “C” o Yu-Pei (Genovesi and Collins 1982) y el medio “D” compuesto por sales macro Yu-Pei (Genovesi and Collins 1982), sales micro N6 (Chu 1978), myo-inositol 100mg/l, tiamina HCl 0.5 mg/l, triiodobenzóico (TIBA) 0.1 mg/l, caseína hidrolizada 500 mg/l, asparagina 150mg/l, carbón activado 3g/l, maltosa 120g/l y gelrite 0.8g/l. Todos los medios fueron ajustados al pH 5.8 e incubados a 28°C en oscuridad.

Siete días después de la iniciación de cultivo, las anteras fueron evaluadas, para determinar respuestas androgénicas. Los siguientes parámetros fueron recogidos a fin de buscar la respuesta androgénica y describir el efecto de cada tratamiento, aplicado por variedad: sobrevivencia de anteras al precultivo (SA/100 anteras), respuestas androgénicas por medio de inducción examinado (RA/100 SA), porcentaje de estructuras de tipo I y porcentaje de estructuras de tipo II, por cada 100 anteras sobrevivientes al precultivo.

❖ Resultados, avances y discusión

Los resultados presentados en este estudio mostraron que dos de los cuatro genotipos examinados, muestran respuesta androgénica bajo las condiciones experimentales antes mencionadas, cada uno de estos genotipos necesitó de condiciones de stress diferentes. La frecuencia de respuestas androgénicas por cada 100 anteras cultivadas fue baja para ambos genotipos, sin embargo fue mayor para I-601 que para I-101. AG-003 y DEKALB 5005, no respondieron bien a ninguna de las condiciones de stress examinadas en este estudio. El porcentaje de sobrevivencia de las anteras a los diferentes medios de precultivo, conteniendo los siguientes agentes inductores: 2-Hidroxiacetonicotínico (2-HNA, 100mg/l) para el medio MMA, Manitol (0.3M) para el medio de precultivo “D”, y colchicina (100mg/l) para el medio IML, dependió del genotipo en estudio. Para el genotipo I-601, el porcentaje de anteras sobrevivientes en el medio de precultivo “D” fue de 61.3% y en el medio MMA fue de 65.4%; en ambos la sobrevivencia de anteras fue mayor al medio de precultivo IML, cuyo valor fue de 58.9% (Tabla 1), siendo mejor en el medio MMA. Para el genotipo I-101, bajos niveles de mortalidad se encontraron cuando se usó los medios de precultivo: IML y MMA, con valores de sobrevivencia de 73.8% y 67.3%, respectivamente, en comparación al 65.8% observado en el medio de precultivo “D” (Tabla 1). Esto demuestra que tanto la composición del medio como el tiempo de exposición de las anteras en precultivo influyen en el porcentaje de sobrevivencia de las anteras. Pese a la baja respuesta androgénica, las estructuras que surgieron de la superficie de las anteras se las dividió en dos tipos de acuerdo a sus características morfológicas y proporción de crecimiento (figura 1). La mayoría de estructuras inducidas fueron de tipo I (blancas compactas) para I-601, mientras que para I-101, se observó mayor

predominancia de estructuras de tipo II (callo) (Tabla 1), sin embargo la proliferación y maduración del mismo fue nula. De acuerdo a las estructuras obtenidas, se alude a que el tipo de división de las microsporas inducidas para I-101 fue asimétrica dado a la predominancia de callos, mientras que para I-601, el tipo de división fue simétrica.

Durante los primeros días de inducción la pared de todas las anteras permaneció verde y turgente y conforme pasaban los días la pared de algunas anteras cambió gradualmente a café (oxidación) perdiendo su turgidez, a diferencia del resto cuya tonalidad y turgidez se mantenía por más de dos semanas de cultivo, éstas anteras son las que más tarde produjeron estructuras de tipo II.

Las estructuras de tipo II empezaron aparecer a partir de día séptimo de inducción, mientras que las estructuras de tipo I, se observaron entre los 27 y 35 días de inducción.

Tabla 1. Influencia de los medios de precultivo de cuatro protocolos examinados en la respuesta androgénica de genotipos de maíz en cultivo de anteras

Genotipo	Protocolo	Ante- ras ino- culadas	% SA	(RA/100SA) (%)	
				Estructuras tipo II	Estructuras tipo I
AG-003	Protocolo 1	1000	ST	1.3	0
	Protocolo 2	1000	73.4	NE	NE
	Protocolo 3	1000	70.1	NE	NE
	Protocolo 4	1000	72.7	NE	NE
I-101	Protocolo 1	1000	ST	0.3	0.0
	Protocolo 2	1000	65.8	NE	NE
	Protocolo 3	1000	73.8	2.9	2.2
	Protocolo 4	1000	67.3	3.9	0.7
Dekalb 5005	Protocolo 1	1000	ST	NE	NE
	Protocolo 2	1000	56.4	NE	NE
	Protocolo 3	1000	57.6	NE	NE
	Protocolo 4	1000	62.9	NE	NE
I-601	Protocolo 1	1000	ST	0.1	0.0
	Protocolo 2	1000	61.3	2.6	3.2
	Protocolo 3	1000	58.9	NE	NE
	Protocolo 4	1000	65.4	4.1	5.2

ST: Sin medio tratamiento de precultivo
NE: No se evidenciaron resultados

SA: Anteras sobrevivientes al precultivo
RA: Respuestas androgénicas

Dado a la baja respuesta de los genotipos usando los protocolos antes descritos, varios experimentos se llevaron a cabo para evaluar alteraciones en los procesos establecidos.

En un primer experimento se probaron tiempos de pre-tratamientos fríos a 7°C por 0, 4, 10, 14 y 27 días. De lo evaluado se determinó que los tiempos de pre-tratamientos fríos tuvieron un efecto muy significativo en los genotipos que respondieron positivamente. Tratamientos fríos de 7°C, por un máximo de 4 días, incrementaron el número de estructuras de tipo I para I-601, e I-101, sin embargo un mayor número de estructuras de tipo II se observaron cuando las panojas de I-101 fueron sometidas a 7°C por 7 y 10 días. Lo contrario ocurrió cuando se aplicaron pre-tratamientos fríos de 14 y 27 días, en éstos no se evidenció respuesta favorable, por lo contrario causaron daño en las anteras. En un segundo experimento se aplicó un medio de precultivo conteniendo la combinación de dos agentes inductores: 100mg/l de 2-HNA y Manitol 0.3M, y se incubaron las anteras de I-101 e I-601 durante 5-7 días bajo refrigeración a 7°C. Trascurrido el tiempo de precultivo las anteras fueron traspasadas a los respectivos medios de inducción. Mediante esta modificación se incrementó el número de respuestas androgénicas, y así para I-101 se obtuvo 7.2 vs 2.9 RA/100SA de los protocolos no modificados. Las estructuras obtenidas mediante esta modificación fueron de tipo II, sin embargo, éstas nuevamente no lograron madurar y fue imposible regenerarlas.

❖ Discusion

Según Barnabás et al. (1998), las diferentes estructuras androgénicas formadas sobre la antera está relacionado a la cinética de la división mitótica que siguen las microsporas de cada genotipo en cultivo. De acuerdo a este estudio se determinó que I-101 e I-601 requieren de diferentes condiciones de estrés para iniciar la primera división mitótica de la microspora e inducir androgénicas, estas condiciones son las que influyen grandemente en el ciclo celular de la microspora (Barnabás et al. 1998) determinando así el tipo de división embriogénica y por tanto el tipo de estructuras androgénica predominante en cada genotipo. De acuerdo a los estudios ultraestructurales sobre la embriogénesis de polen de maíz de Barnabás. B, Fransz,

PF. y Schel, JHN. (1987) se asumió que el tipo de división mitótica, predominante para I-101 fue asimétrica, mientras que para I-601 fue simétrica.

Las estructuras de tipo II crecen más rápido que las estructuras de tipo I y según Guangyuan et al. (2006), éstas son las que tienen la habilidad de producir un gran número de embriones somáticos sobre su superficie, sin embargo la falta de proliferación y madurez de los callos que se formaron tanto en I-101 como en I-601, hizo imposible regenerar plántulas a partir de callo, y según Pace, G. (1986) la regeneración de plántulas de maíz es uno de los mayores obstáculos en el uso de esta técnica, pese a que en genotipos altamente androgénicos si se han obtenidos buenos porcentajes de regeneración (Saisintong et al. 1996).

Uno de los factores que inhiben la maduración de callo es el elevado índice de oxidación de las anteras durante los primeros días de cultivo; esto crea una atmósfera saturada de etileno, el cual interfiere con el crecimiento y maduración de las estructuras de tipo II o callo, y de acuerdo a Vain et al. (1989), este factor es una de las causas por la que no se puede regenerar plantas de maíz. Según Weiguo et al. (2001), el número, tamaño y proliferación de estructuras tipo II (callo), está influenciado no solo por la atmósfera de etileno acumulada sino también por la presión osmótica del medio. La mayoría de embriones en vías de desarrollo cesan sus divisiones celulares antes de la formación de embriones maduros, debido a los cambios bruscos de osmolaridad y pH en el medio, ocasionados por la rápida degradación de la sucrosa de las anteras en sus sub-derivados durante los primeros días de cultivo (Steven, King & Ken 1994). Ellos sugieren reemplazar la sucrosa por otro carbohidrato como maltosa que sea de difícil asimilación por las anteras. De acuerdo a los experimentos realizados para incrementar la respuesta androgénica, se compaginó con los estudios realizados por Weiguo et al. (2001), quien menciona que el 2-HNA combinado con manitol incrementa la eficiencia de androgénesis en el cultivo de anteras para genotipos recalcitrantes, pues ambos son carbohidratos de difícil asimilación para las anteras, induciendo hambre y forzándolas a desviar su desarrollo gametofítico hacia un desarrollo esporofítico.

Limitaciones:

- Durante la fase de experimentación se han desarrollado una serie de limitaciones que han entorpecido esta labor estas son:
- Baja respuesta androgénica, lo cual se acredita a los genotipos seleccionados, debido a que el maíz es considerado una planta muy recalcitrante para el cultivo *in vitro* de anteras.
- Cambios bruscos de osmolaridad que producen plasmólisis en la mayoría de los callos a los pocos días de su formación, debido al uso de un azúcar rápidamente degradado por las anteras.
- Dificultades en la maduración del callo o embrión formado.

➤ Conclusiones y recomendaciones

El maíz es una de las especies más recalcitrantes para el cultivo de anteras, el número de respuestas androgénicas es bajo con respecto a otros cereales y dependen grandemente de las condiciones de estrés durante el cultivo que se apliquen. De los genotipos evaluados solo I-101 e I-601 mostraron respuesta androgénica, bajo las condiciones experimentales de este estudio.

El mejor medio de precultivo para inducir androgénesis resultó de la combinación de dos agentes inductores 2-HNA, y Manitol, y el grado de sobrevivencia de las anteras depende del tiempo de pretratamiento frío, y de precultivo, siendo las mejores condiciones cuando se aplican tiempos de no más de 7 días a 7°C. El tipo de estructuras androgénicas de tipo I fueron mayores para I-601, mientras que para I-101, prevalecieron más las estructuras de tipo II, sin embargo ninguna de ellas logró madurar y regenerar planta, por lo que se sugirió que los agentes causantes fueron: los cambios bruscos de osmolaridad, causados por el carbohidrato usado y la acumulación de etileno por la tasa alta de oxidación de las anteras durante los primeros días de cultivo.

❖ Bibliografía citada:

- Afza, R. Shen, M. Zapata, F. Xie, J. Khamis, H. Lee, K. Bobadilla & E. Kodym, A. 1999. Effect of spikelet position on rice anther culture efficiency. *Plant Science*, 153, 155-159.
- Barnabás, B., Fransz, P.F. & Schel, J.H.N. 1987. Ultrastructural studies on pollen embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Reports*, 6: 212-25
- Barnabás, B., Obert, B. & Kovács, G. 1998. Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspore culture in anther. *Plant Cell Reports*, 18, 858-862.
- Barnabás, B. 2005. Doubled Haploid Production in Crop Plants: Anther Culture in Maize (*Zea mays* L.). p. 103-108
- Beckert, M. 1994. Advantages and disadvantages of the use of in vitro/ in situ-produced DH maize lines. In: Bajaj Y.P.S. (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 25, Maize, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp 201-213.
- Buter, B. 1996. In vitro Haploid Production in Higher Plants: in vitro haploid production in maize. Jain, S.M.; S.K. Sopory; Veilleux R.E. (Eds) *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, p. 37-71.
- Chu, C.C. 1978. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In: Hu (ed) *Proc Symp on Plant Tissue Culture*. Sci. Press, Beijing, pp. 43-50.
- FAO 2000. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2000. Producción del maíz a nivel mundial. (en línea). FAOSTAT. Consultado en 1 de ene. de 2008. Disponible en <http://apps.fao.org>
- Genovesi, A.D. & Collins, G.B. 1982. In vitro production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Sci.* 22: 1137-1144.
- Genovesi, A.D. & Yingling, R.A. 1995. Isolated microspore and anther culture of maize. US Patent Issued, No. 992637.
- Guangyuan, H., Zhang, J., Kexiu, L., Xiong, Z., Chen, M., Chang, J., Wang, Y., Yang, G., Barnabás, B. 2006. An improved system to establish highly embryogenic haploid cell and protoplast cultures from pollen calluses of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 15-25.
- Obert, B. & Barnabás, B. 2003. Colchicine induced embryogenesis in maize. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77, 283-285.
- Pace, G.M., Reed, J.N., Ho, L.C. & Fahey, J.W. 1986. Anther culture of maize and the visualization of embryogenic microspores by fluorescent microscopy. *Theor Appl Genet*, 73: 863-869.
- Pescitelli, S.; Johnson, C.; Petolino, J. 1989. Isolated microspore culture of maize; effect of isolation technique, reduced temperature and sucrose level. *Plant Cell Reports*. 8, 628-631
- Saisintong, S., Schmid, J.E., Stamp, P., Buter, B. 1996. Colchicine-mediated chromosome doubling during anther culture of maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet*, 92: 1017-1023.
- Steven, P., King & Ken J. Kasha. 1994. In Vitro Androgenesis In Seed Plants: Anther and isolated microspore culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). p. 105-110.
- Vain, P., Flament, P. & Soudain, P. 1989. Role of ethylene in embryogenic callus initiation and regeneration in *Zea mays* L. *J. Plant Physiology*, 135, 537-540.
- Weiguo, L., Zheng, M.Y., Polle, E.A. & Konzak, C.F. 2001. Highly efficient Doubled-Haploid Production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. *Crop Sci*, 42, 686-692.
- Zheng, M.Y., Weng, Y., Sahibzad, R. & Konzak, C.F. 2001. Doubled Haploid Production in Crop Plants: Isolated microspore culture in maize (*Zea mays* L.), production of doubled-haploids via induced androgenesis. p. 92-102.

Proyecto: **OTRAS ACTIVIDADES COLABORATIVAS CON PROGRAMAS Y DPTOS.**

Responsable: Dr. Eduardo Morillo

Instituciones participantes: INIAP (DNB, Programas y Dptos.)

❖ **Introducción**

El Departamento de Biotecnología sirve como una unidad de apoyo a los programas y departamentos del INIAP, contribuyendo a elevar el nivel técnico-científico de las investigaciones que se llevan a cabo en el Instituto y que incluyen componentes en biotecnología. Como beneficios está el fortalecimiento y uso de herramientas biotecnológicas en los diferentes campos de accionar del Instituto, con impacto en las actividades de bancos de germoplasma (pre-mejoramiento), programas de mejoramiento genético (selección asistida), y otros (patología molecular, diagnóstico de enfermedades por marcaje molecular, identificación genética de varios cultivos comerciales), y capacitar a recurso humano en Biotecnología.

❖ **Objetivos del proyecto**

- Contribuir al desarrollo de la biotecnología en el instituto mediante el establecimiento de actividades colaborativas con programas y departamentos

❖ **Palabras clave**

Biotecnología agrícola, colaboración, servicios, Biología Molecular

❖ **Indicadores del proyecto**

- Se contribuirá al desarrollo de la biotecnología en INIAP mediante el establecimiento de actividades colaborativas con programas y departamentos
- Se aportará a la formación y capacitación en biotecnología de técnicos e investigadores de los programas y departamentos
- Se pondrá al servicio la infraestructura y equipamiento de los laboratorios del DNB para la adecuada ejecución de actividades biotecnológicas de los programas y departamentos

❖ **Resultados, avances y discusión**

En el 2008 a parte de las actividades señaladas en el proyecto “Estudios especiales *in vitro*” las cuales involucran colaboración con programas y departamentos en cultivo de tejidos, el Dpto. de Biotecnología ha colaborado en otras actividades en Biología Molecular las cuales se señalan a continuación y se detallan posteriormente:

- Caracterización molecular de la colección nacional de maní (SSR). Proyecto CEREPS, Regeneración y caracterización de colecciones de germoplasma con baja viabilidad
- Análisis de la diversidad genética de la mora cultivada en Ecuador con marcadores moleculares ISSRs y AFLPs). Proyecto Lulo-mora. FONTAGRO
- Caracterización molecular de la colección nacional de frejol arbustivo con fines de uso y mejoramiento genético. Proyecto SEGURIDAD ALIMENTARIA-FORTALECIMIENTO

❖ **Conclusiones y recomendaciones**

En el 2008 se han ejecutado tres actividades colaborativas en Biología Molecular con los programas de Fruticultura, Leguminosas y el Dpto. de Recursos Fitogenéticos (DENAREF).

Estas actividades han tenido financiamiento por parte de sus respectivos proyectos y apoyo técnico por parte del personal del Dpto. de Biotecnología.

Actividad A1: **Caracterización molecular de la colección nacional de maní**

Responsable: C. Costa (DENAREF), G: Miño, E. Morillo

❖ Introducción

El maní (*Arachis hypogaea*), es considerado como uno de los cultivos de importancia mundial para la dieta humana por su alto contenido de aceites, proteínas y vitaminas, lo que lo hace muy cotizado por la industria alimenticia. El Ecuador presenta una interesante diversidad genética del maní por lo que podría representar un centro de diversificación importante. Al momento se han realizado estudios a nivel morfológico pero son necesarios análisis genéticos que permitan establecer más precisamente el grado de variabilidad de los materiales con impacto en el manejo y conservación de estos recursos fitogenéticos y la generación de nuevas variedades.

❖ Propósitos y resultados por lograr

Este estudio busca complementar la caracterización morfológica con información molecular, e identificar el parentesco entre las accesiones de la colección.

Objetivos

General:

Determinar la variabilidad genética que presenta la colección de maní conservada en el Banco Nacional de Germoplasma del INIAP a través de marcadores moleculares.

Específicos:

- Caracterizar la diversidad alélica de 288 accesiones de maní de la colección del Banco Nacional de Germoplasma a nivel de loci SSRs (microsatélites).
- Estimar el nivel de heterocigosidad y polimorfismo de la colección nacional de maní.
- Determinar la distancia genética y las similitudes que existe entre las subespecies de maní.
- Realizar una comparación estadística de la diversidad molecular con la diversidad morfológica

❖ Hipótesis:

Los SSR no revelan diversidad genética en las accesiones de *A. hypogaea* del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP.

❖ Materiales y métodos

Material vegetal: 288 accesiones de la colección de maní del INIAP. Para la toma de muestras se utilizó los primordios foliares de una semilla germinada de cada accesión. El protocolo utilizado fue el de CTAB 2x (CIP, 1998). La visualización del ADN y su cuantificación se realizó por fluorescencia con bromuro de etidio utilizando un fotodocumentador digital (Dolphin- View, Modelo Wealtec V. 2.0).

Amplificación y genotipaje de microsatélites: se utilizó el método de M13- tailing para LICOR 4300s según lo indicado en la actividad A3 del proyecto BIOTECNOLOGÍA. Para optimizar las reacciones de amplificación se utilizó el método duplex, que consta en añadir dos

primers SSR con diferentes tallas e iguales temperaturas de annealing en una misma reacción. Las combinaciones utilizadas fueron: 2G03- 1B09; 2G04- PM3; 4G02-PM15; 2C11-PM35 y 4H11-PM45. El mix de reacción contuvo 1 ul de ADN con una concentración de 5ng/ ul, 1 ul de Buffer Gotag Colorless Promega (5x), 0,5 ul de MgCl₂ Promega (25 mM), 0,2 ul de dNTP's Invitrogen (5mM), 0,88 ul de M13 700- 800 LI-COR (1uM), 0,05 ul de primer1 F-M13 (1uM), 0,05 ul de primer2 F-M13 (1uM), 0,08 ul primer1 R 10 (uM), 0,08 ul primer2 R 10 (uM), 0,15 ul de Gotag DNA Polymerase Promega (5U/ul) y 1,02 ul de agua ultra pura, el volumen final de la reacción fue de 5 ul. La reacción fue amplificada en un termociclador Biometra TProfessional Basic para 96 muestras, con las condiciones PCR específicas para la amplificación de muestras de maní según Ferguson et al. (2004). Para el registro de datos se utilizó el software SAGA GT Microsatellites el cual permite una lectura bastante precisa de los datos disminuyendo a anulando casi totalmente el margen de error en la lectura de las muestras.

Análisis estadístico: a partir de la matriz de genotipos, se utilizaron los programas Power Marker (Liu y Muse, 2005), NTSYS pc22 (Rohlf, 2002), Genetix (Belkhir et al. 2000) y FSTAT (Goudet, 2001) para el cálculo de los siguientes parámetros de diversidad: porcentaje de loci polimórficos, riqueza alélica, número efectivo de alelos, heterocigosis observada y esperada y parámetros F (índice de fijación Fis y de diferenciación genética entre poblaciones, Fst). Además se realizaron análisis de agrupamiento y multivariados (PCO y AFC). Para cuantificar la robustez estadística de los agrupamientos se realizó un análisis de remuestreo «bootstrap» con 100 repeticiones utilizando PowerMaker V3.0 (Liu y Muse, 2005).

❖ Resultados, avances y discusión

Diversidad genética: Los 10 loci analizados para las 288 accesiones revelaron un total de 129 alelos, variando el número de alelos por locus de 7 a 20 con un promedio de 12.9/locus. Los loci que presentaron mayor número de alelos fueron el 4H11 y 2G04 con 20 y 19 alelos respectivamente. Se encontraron varios alelos privados para cada uno de los dos grupos identificados (*fastigiata* e *hypogaea*). Los alelos encontrados con más relevancia por su frecuencia fueron, para el grupo *fastigiata* PM35-127pb y PM35-158pb; y para el grupo *hypogaea* 2C11-300pb, 4H11-261pb y PM35-140pb. La tabla 1 muestra los parámetros de diversidad genética observada en la colección de maní para los locus analizados.

Tabla 1. Parámetros de diversidad genética observados en la colección de maní del INIAP

Locus	Frecuencia mayor observada	No. de Genotipos	H exp.	H obs.	PIC
1B09	0,298	37	0,842	0,962	0,825
2G03	0,310	22	0,811	0,993	0,787
PM 3	0,241	55	0,867	0,895	0,854
2G04	0,242	35	0,885	0,076	0,876
PM 15	0,468	11	0,614	0,896	0,538
4G02	0,398	13	0,737	0,989	0,699
2C11	0,402	8	0,703	0,993	0,653
PM 35	0,401	17	0,781	0,989	0,760
4H11	0,352	27	0,824	1,000	0,809
PM 45	0,332	21	0,817	0,997	0,797
Promedio	0,344	24,600	0,788	0,879	0,760

Se registró una media de 0,344 en la mayor frecuencia de alelos, el número de genotipos encontrados por locus varía de 8 y 55. La heterocigosis observada promedio (Ho) fue de 0.879 mientras que la heterocigosis esperada (He) de 0.788. El valor de PIC promedio fue de 0.760, siendo los loci 2G04, PM3, 1B09 y 4H11 los que mostraron mayor PIC con valores de 0.876, 0.854, 0.825 y 0.809 respectivamente.

Estructura Genética: Los análisis de agrupamiento y multivariados estructuran al germoplasma en dos agrupamientos que corresponden a las subespecies de *Arachis hypogaea*: spp. *fastigiata* y spp. *hypogaea* (Figura 7). La subespecie *fastigiata* incluye a 233 accesiones, mientras que la spp. *hypogaea* comprende a 55 accesiones.

❖ Conclusiones y recomendaciones

La caracterización molecular de 288 accesiones ecuatorianas de mani muestra que esta colección presenta una considerable diversidad genética sin detectarse duplicados en el germoplasma evaluado. Los locus analizados revelaron un alto índice de polimorfismo registrándose una gran cantidad de alelos por locus. El polimorfismo de los SSRs estructuró la diversidad de acuerdo a la clasificación taxonómica de *A. hypogaea* en las subespecies *fastigiata* e *hypogaea*.

Es importante destacar la importancia de realizar estudios adicionales con el fin de detectar nuevos marcadores específicos para programas de mejoramiento genético.

❖ Bibliografía citada

- Belkhir K, et al. 2000. GENETIX, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II. Montpellier (France).
- Ferguson, ME., Bramel PJ. and Chandra S. 2004. Gene diversity among Botanical Varieties in Peanut (*Arachis hypogaea*, L). *Crop Science* vol 44: 1847- 1854.
- Goudet, J. 2001. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available at <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> Accessed 15 March 2006.
- Liu, K., and Muse, S. 2005. Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data *Bioinformatics*: 21 (9): 2128-2129.
- Rohlf, J. (2002). *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1*. Department of Ecology and Evolution State University of New York. New York.

Actividad A2: Caracterización molecular de germoplasma de mora con RAPDs y AFLPs

Responsable: P. Garrido, G. Miño, E. Morillo

 Colaboración: Programa de Fruticultura (Proyecto Mora-lulo, FONTAGRO)

❖ Introducción

La mora es un frutal nativo de los Andes que tiene gran potencial agronómico y económico. La mora de castilla (*Rubus glaucus*) se cultiva en muchos países del continente Americano incluido el Ecuador. Estudios realizados por Waugh et al. (1990) señalan la existencia de una gran diversidad morfológica del género *Rubus*, mismo que está formado por alrededor de 750 especies y cuya base genética no es al momento bien conocida. El uso de la variabilidad genética de mora, depende de la disponibilidad de una amplia base genética con el fin de utilizarla en programas de mejoramiento (hibridaciones) y proceder a seleccionar los materiales de alta productividad y calidad de fruta. En décadas anteriores, la diversidad que existe dentro y entre las poblaciones se determinaban por evaluaciones morfológicas y agromóricas (Cornell University, 2003), pero con los avances de la Biotecnología, y específicamente de la biología molecular, se disponen de herramientas que permiten complementar esta información con datos genéticos que identifican y caracterizan los materiales de manera más precisa (Azofeifa, 2006). El presente estudio tiene como fin determinar la diversidad genética de la mora cultivada en la sierra del país, para esto se empleo marcadores moleculares de tipo arbitrario, con el fin de identificar duplicados, agruparlos y establecer la base genética del cultivo de las zonas productoras de la Sierra ecuatoriana.

❖ Objetivos

General:

Determinar la diversidad genética del cultivo de mora en provincias productoras del Ecuador y sus relaciones genéticas con otras especies del género con potencial agronómico

Específicos:

- Muestrear y coleccionar germoplasma cultivado y silvestre, en las principales zonas productoras de las provincias de Bolívar, Cotopaxi y Tungurahua.
- Caracterizar molecularmente el ADN de las muestras mediante técnicas de marcaje aleatorio (RAPDs/RAMs y AFLPs).
- Determinar el grado de parentesco genético de *R. glaucus* con otras especies de *Rubus*, con potencial agronómico.
- Comparar la diversidad de mora en el Ecuador con germoplasma de referencia de Colombia siguiendo las normativas vigentes sobre intercambio de ADN.

❖ Hipótesis:

Ho: No existe diversidad genética en el cultivo de mora producido en las Provincias de Tungurahua, Cotopaxi y Bolívar.

❖ Materiales y métodos

Material vegetal: Se coleccionaron muestras de 108 plantas en las provincias de Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar y Loja, de las cuales 78 se encontraron en estado cultivado y 30 en estado silvestre. Las plantas cultivadas se identificaron *a priori* como *Rubus glaucus* mientras que entre las plantas silvestres se identificó la presencia de *R. urticifolius*, *R. niveus*, *R. robustus*, *R. roseus*, *R. compactus*, *R. acanthophyllos*, *R. coriaceus*, *R. laegardii*, *R.*

nubigenus y *R. loxensis*. Se estableció un set con 41 accesiones colectadas en Tungurahua, 19 en Bolívar, 10 en Cotopaxi, 7 en Loja y 31 accesiones provenientes de la colección del programa de Fruticultura-Granja Experimental Tumbaco del INIAP de origen colombiano. La variabilidad morfológica de la mora cultivada incluye 32 accesiones de la variedad negra fruto grande, seis de fruto rojo grande, dos de fruto rojo pequeño y una de fruto negro pequeña. Además se identificaron 19 accesiones de planta pequeña y ocho accesiones que no poseen espinas. Estos materiales son actualmente conservados *ex situ* por el programa de Fruticultura del INIAP.

Sondeo de la diversidad con marcadores RAPDs e ISSRs: Para la extracción de ADN genómico se utilizó el protocolo de Khanuja et al. (1999), que resultó más efectivo para muestras foliares deshidratadas con silicagel. Se evaluaron 107 primers RAPDs y 72 primers ISSRs en 16 muestras de ADN de 5 variedades de *R. glaucus* y especies silvestres. Los primers seleccionados en base al nivel de información y calidad de amplificación se utilizaron para el genotipaje de muestras. Las reacciones de amplificación fueron efectuadas en un volumen final de 7 μ l con concentraciones finales de 5 ng de ADN genómico, 1.0 μ M de primer RAPD o ISSR, 1X de buffer PCR, 2.5 mM dNTPs, y 5 unidades de *Taq* polimerasa (INVITROGEN). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón TAE 1X con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó por 3 horas a 120 V. El peso molecular de los polimorfismos se estimó con el programa LENGHT-III (Templeton y Lawrence, 1988) y usando como referencia las distancias de migración de los fragmentos del marcador 1Kb DNA Ladder (Cat. No. 10381-010 INVITROGEN).

Genotipaje con marcadores AFLPs: Debido a la alta calidad y cantidad de ADN que se requiere para una adecuada digestión, la extracción de ADN se realizó utilizando un método comercial con columnas de purificación (*PureLink Plant Total DNA Purification Kit*, INVITROGEN Cat. No. K1830-01). Para el análisis AFLP, se utilizó una variante del protocolo original, basado en el método M13-Tailing (Myburg & Remington 1999) y aplicado al secuenciador LI-COR® 4300S con el kit comercial *IRDye Fluorescent AFLP Kit for Large Plant Genome Analysis* (LI-COR, Cat. No. 830-06195). Los productos de la digestión se controlaron en geles de agarosa al 2%. Se realizó un screening con 32 combinaciones de primers AFLP en ADN de cuatro variedades de *R. glaucus*. Las combinaciones seleccionadas se utilizaron para el genotipaje de 21 muestras de *R. glaucus*, una muestra de la variedad brazos y Olallie respectivamente y seis muestras de especies silvestres. La adquisición de imágenes del gel fue efectuada por el LI-COR para su lectura en el asistente SAGA MX - AFLP® (IR2; LI-COR Biosciences).

Análisis estadístico: Las tres metodologías utilizadas en este análisis (RAPDs, ISSR y AFLPs) son de tipo dominante y su polimorfismo se analiza como datos binarios, es decir de ausencia o presencia de un determinado fragmento o banda entre muestras. En la lectura se evitó el registro de datos dudosos o ambiguos, considerándose un polimorfismo a una banda presente en al menos dos muestras de ADN de accesiones distintas. La base de datos binarios se importó al programa, NTSYS ver. 2.20 (Rohlf, 2002) para el cálculo de una matriz de similitud genética con el coeficiente de Jaccard. Sobre la matriz obtenida se aplicó la técnica de agrupamiento o *Cluster Analysis*, empleando el método UPGMA. Con el mismo paquete estadístico se realizó un análisis de Coordenadas Principales (PCO) el cual proyecta a las muestras en función de porcentajes de varianza explicados por cada coordenada o eje en un plano bi o tridimensional (x, y o z). Se realizó además un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) con el macro GenALEX ver. 6 (Peakall y Smousse, 2001), que calcula el parámetro PhiPt (indicador de la proporción de la varianza entre las poblaciones relativa a la variación total). Además se obtuvo las distancias genéticas de Nei entre grupos predefinidos. Finalmente se realizó un análisis de remuestreos "*bootstrap*" el cual estima la robustez estadística del o los agrupamientos obtenidos, empleando el programa PAUP v. 4.0 (Swofford, 2000). Este cálculo se realizó con 1000 replicas usando la opción "*Mean Character Difference*" y el método UPGMA.

❖ Resultados, avances y discusión

Diversidad genética de *R. glaucus* y especies emparentadas revelada por marcadores RAPDs e ISSRs: Los 107 primers RAPDs probados no revelaron la presencia de polimorfismo

en *R. glaucus* sino solamente a nivel interespecifico con las especies silvestres analizadas. Similares resultados se obtuvieron con los 72 primers ISSRs probados, a excepción del primer ISSR-872 que se reveló altamente informativo por la cantidad de polimorfismo, no sólo a nivel inter-especifico sino en *R. glaucus*. Este primer se utilizó entonces para caracterizar las 93 accesiones disponibles (*R. glaucus* y especies silvestres). La amplificación de las bandas obtenidas con el primer ISSR-872 estuvo en un rango entre 360 a 3030 pb. Se determinó un total de 16 fragmentos ISSR, de las cuales 13 resultaron polimórficas en el material analizado. De estas, nueve bandas resultaron polimórficas en las muestras de *R. glaucus*, por lo que este primer se muestra útil para la identificación de duplicados en mora de castilla. De la caracterización de materiales de *R. glaucus* con este primer se determinó un 52 % de duplicados de un total de 68 muestras analizadas.

Estructura genética revelada por los marcadores AFLPs: Del screening realizado se seleccionaron cinco combinaciones AFLPs para la caracterización de *R. glaucus*, estas son: E-ACG/M-CTG, E-ACC/M-CTT, E-AGC/M-CTC, E-AAC/M-CAT y E-ACC/M-CTC. Ejemplos de patrones AFLPs obtenidos del screening se muestran en la figura 2. Para la caracterización de *R. glaucus* se genotiparon 21 accesiones representativas de la diversidad observada con el primer ISSR-872, a las cuales se adicionaron una muestra de la variedad brazos y Olallie respectivamente y seis muestras de especies silvestres. De este análisis se registraron 203 polimorfismos en *R. glaucus* y las especies silvestres, el tamaño estimado de los fragmentos de amplificación oscila entre 100 a 350 pares de bases obteniéndose un promedio de polimorfismo de 77%. La variabilidad en *R. glaucus* es obviamente menor registrándose 139 polimorfismos que representan un 67% de polimorfismo intra-especifico.

Tabla 1. Numero de bandas AFLP analizadas para cada combinación de primer en 29 accesiones de *R. glaucus* y especies silvestres afines

Combinación AFLP	<i>Rubus glaucus</i> + <i>R. spp</i>			<i>Rubus glaucus</i>	
	Bandas amplificadas	Bandas polimórficas	% Polimorfismo	Bandas polimórficas	% Polimorfismo
E-AAC/M-CAT	50	40	80	36	72
E-ACC/M-CTT	44	34	77.3	28	64
E-AGC/M-CTC	35	28	80	24	69
E-ACG/M-CTG	45	37	82.2	35	78
E-ACC/M-CTC	29	19	65.5	16	55
Total	203	158	77	139	67

Estructura genética de *R. glaucus*: El dendrograma del polimorfismo AFLP e ISSR muestra la conformación de dos grupos identificados con las letras A y B a un nivel de disimilitud genética del 0,39 (Figura 8). El grupo A incluye a las accesiones cultivadas, es decir *R. glaucus*, mientras que el grupo B comprende a las especies silvestres emparentadas e incluyen también a la variedad brazos de *R. glaucus*. El grupo A, presenta dos subgrupos identificados como C1 y C2 a una distancia de disimilitud de 0,50. El subgrupo C1 incluye a tres accesiones colombianas y a las accesiones sin espinas, mientras que el subgrupo C2 esta conformado por accesiones ecuatorianas. La robustez del subgrupo C2 se ve sustentada por un valor bootstrap de 91, el cual es altamente significativo. De la misma manera el PCO de la figura 4 muestra la estructuración genética de *R. glaucus*, esto apoya los resultados obtenidos en el análisis de agrupamiento UPGMA y ayuda a diferenciar claramente los grupos C1, C2 y silvestres (W). El PCO (Figura 9) representa la dispersión de las 29 accesiones analizadas en función de los dos primeros ejes de coordenadas que extraen el 28% de la varianza total observada. El primer eje de varianza distingue en los dos polos de la coordenada al subgrupo C1 de *R. glaucus* del grupo de silvestres, mientras que el subgrupo C2 de *R. glaucus* se ve diferenciado por la segunda coordenada que extrae 12% de la varianza total. Las distancias genéticas de Nei se indican en la figura 4 entre los dos subgrupos de *R. glaucus* y las especies silvestres, las cuales sugieren una mayor diferenciación del subgrupo C1 respecto al grupo de silvestres que el subgrupo C2, siendo este último más afín con el grupo de silvestres. Por otro lado, el AMOVA realizado para los tres grupos obtenidos determina un valor de Φ_{PT} de 0,35 a una alta probabilidad estadística ($p = 0,001$), resultado que indica que el 35% de la variación genética contribuye a la diferenciación entre grupos (C1, C2 y W), mientras que el 65% de variación restante se distribuye dentro de cada grupo. Estos resultados sugieren una alta diferenciación

genética entre los dos subgrupos de *R. glaucus* y el grupo de especies silvestres emparentadas.

❖ **Discusión**

De un total de 189 primers aleatorios probados (107 RAPDs y 72 ISSR) en 13 muestras de ADN extraídos de diferentes morfotipos o variedades de *R. glaucus*, no se detectaron polimorfismos excepto con el primer ISSR-872, el cual se reveló altamente informativo y útil para la identificación rápida de duplicados en mora de castilla. Este resultado corrobora reportes anteriores de diversidad en el sentido de una limitada base genética de la mora de castilla en otras colecciones de germoplasma. Este resultado podría explicarse por el régimen reproductivo del cultivo de mora, descrito como apomíctica facultativa; régimen en el cual las plantas provenientes de semilla botánica son producidas asexualmente por pseudogamia, que tienen baja diversidad genética (Kollmann et al. 2000), además de la reproducción asexual o vegetativa empleado por los agricultores tradicionales (Marulanda y Márquez, 2001). La utilización de marcadores altamente resolutivos como los AFLPs (Cenis, 2005) en genotipos estrechamente relacionados, permitió diferenciar mayormente a los genotipos de *R. glaucus* analizados y además identificar una estructura de la diversidad de *R. glaucus* en dos grupos bien conformados, resultado corroborado por los análisis estadísticos realizados. Esta estructura podría tener su origen en la introgresión genética, producto de la recombinación sexual, donde incluso los bajos niveles de germinación pueden ser suficiente para mantener la variabilidad genética en una población predominantemente apomíctica (Kollmann et al. 2000). También podría estar relacionado con el nivel de ploidía de la especie, ya que el género *Rubus* posee una amplia plasticidad de formas de reproducción, las cuales están ligadas directamente con su nivel de ploidía; plantas diploides poseen reproducción sexual mientras que especies poliploides son apomícticas,seudógamas y autofértiles (Antonius y Nybon, 1995). Al estado actual de conocimientos, no nos es posible determinar con certeza el origen de esta estructuración de la especie *R. glaucus*, siendo necesarios análisis complementario a nivel del ADN cloroplástico, conteo de cromosomas y caracterización fenotípica. Esta información no solo aportará a un mejor conocimiento de la diversidad de *R. glaucus*, sino que tendrá implicaciones directas en fitomejoramiento de este frutal nativo, que permitan la selección de progenitores altamente diferenciados.

❖ **Conclusiones y recomendaciones**

- El análisis molecular determinó que en Ecuador se cultivaría únicamente la especie *Rubus glaucus*, mientras que las especies silvestres con potencial agronómico, aunque no sustantivamente representadas en este estudio, no se cultivan por los agricultores donde se realizó el muestreo.
- Las técnicas de RAPDs no reveló polimorfismos a nivel intraespecífico en *R. glaucus*, aunque si a nivel inter-específico. Con los ISSRs se identificó un primer altamente informativo (Primer 872) para la detección de duplicados. En cambio los AFLPs fueron más resolutivos en la detección de diversidad, revelando diferencias entre todas las 21 muestras de *R. glaucus* analizadas.
- Los RAPDs e ISSR muestran que *Rubus glaucus* presenta una baja variabilidad genética en Ecuador. Se determinó un 52% de duplicados en el material estudiado.
- Los AFLPs e ISSR revelaron la existencia de dos grupos genéticamente bien conformados en *R. glaucus*, uno de los cuales esta formado por materiales ecuatorianos, mientras que el segundo grupo incluye a tres accesiones colombianas y a las accesiones sin espinas recientemente identificadas.
- El origen de la estructura genética en *R. glaucus* es desconocido, se recomienda complementar este estudio con el conteo de cromosomas, análisis de cloroplástico y caracterización morfoagronómica.

❖ **Bibliografía citada**

Antonius K., y Nybom H. (1995). Discrimination between sexual recombination and apomixis in a *Rubus* plant breeding programme. Department of Plant Biology|Plant Breeding, University of Helsinki, Finland. Balsgrd-Department of

- Horticultural Plant Breeding, Swedish University of Agricultural Sciences, *Hereditas* 123: 205-213.
- Azoeifa A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicación en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17(2): 221-242.
- Cenis J & Mayor, C. 2005. Nuevas técnicas moleculares para la identificación varietal de plantas. Extraído el 10 de septiembre del 2008 disponible en: <http://www.terraia.com/revista12/pagina40.htm>.
- Cornell University. 2003. Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje (en línea). Consultado 24 dic. 2007. Disponible en http://www.ipgri.cgiar.org/Training/Unit10MolMarkers_es/PDF/VOL1/I.Introduccion.pdf
- Khanuja S., Shasany A., Darokar M and Kumar S. 1999. Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites Essential Oils. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 1-7.
- Kollmann J., Steinger T., Roy B. 2000. Evidence of sexuality in European *Rubus* (Rosaceae) species based on AFLP and allozyme analysis. *American Journal of Botany* 87:1592-1598.
- Marulanda M. & Márquez, M. P. (2001). Caracterización de la diversidad genética de *Rubus glaucus* Benth con Marcadores Moleculares RAPDs. *Actual Biol.* 23 (74): 57 – 63.
- Myburg A. & Remington D. (1999). Protocol for High-Throughput AFLP Analysis Using LI-COR IR2 Automated Sequencers. Forest Biotechnology Group, Dept of Forestry, NCSU.
- Peakall R & Smousse P. (2001). GenAEx V5: Genetic Analysis in Excel. Disponible en: <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAEx/>
- Rohlf F.J. (2000). NTSYSpc Version 2.0: User Guide. Applied Biostatistics Inc.
- Swofford D. L. (2000). PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods), version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Templeton A & Lawrence J (1988). FRAG-LENGTH III: Algorithm for the calculation of molecular weights. Software distributed by the authors.
- Waugh R., Van de Ven, Phillips M., Powell W. (1990). Chloroplast DNA diversity in the genus *Rubus* (Rosaceae) revealed by Southern hybridization. *Plant Systematics and Evolution* 172: 65–75.

Actividad: **Caracterización molecular de la colección nacional de frejol arbustivo con fines de uso y mejoramiento genético**
 Responsable: K. Garcia, E. Morillo

❖ Introducción

Dada la importancia agronómica del frejol en la región y a nivel mundial, la caracterización de germoplasma es una actividad prioritaria para los programas de mejoramiento y los bancos genéticos. El análisis de diversidad genética a nivel molecular, complementado con información agronómica y morfológica aportará a un mejor manejo y potencialización de los recursos genéticos de frejol arbustivo, principalmente de origen local y de uso tradicional. La caracterización molecular permitirá conocer la variabilidad genética de la colección, establecer semejanzas y diferencias entre las accesiones y distinguir genotipos estrechamente relacionados, información de importancia en los procesos de premejoramiento con fines de uso de la diversidad local. En el catálogo de frejol del Banco de Germoplasma del INIAP, se registran 1353 accesiones de las cuales 740 pertenecen a fréjol arbustivo (Murillo et al. 1998). Estos materiales provienen de diversas fuentes como colectas y variedades mejoradas. Uno de los objetivos del Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG-GA) es la colección, conservación, caracterización y uso del germoplasma de estas leguminosas, por lo que se están realizando esfuerzos en caracterizar el germoplasma tanto a nivel morfoagronómico como molecular. En este contexto, el PRONALEG-GA en colaboración con el Departamento de Biotecnología se han propuesto realizar un análisis de la diversidad genética de la colección nacional de fréjol arbustivo del INIAP, con perspectivas de uso del germoplasma en base al conocimiento de la base genética de la colección.

❖ Propósitos y resultados por lograr:

El propósito de esta investigación es determinar la variabilidad genética de la colección de fréjol arbustivo conservada en el Banco Nacional de Germoplasma del INIAP con el fin de determinar grupos genéticos de interés para posteriores trabajos de fitomejoramiento.

❖ Objetivos

General:

Determinar la variabilidad genética de la colección de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris*) conservada en el Banco Nacional de Germoplasma del INIAP- Ecuador con perspectiva de uso y mejora genética.

Específicos:

- Caracterizar la diversidad genética a nivel de al menos 8 marcadores microsatélites (SSR) altamente polimórficos en 740 accesiones de fréjol arbustivo de la colección del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP.
- Establecer grupos genéticos representativos de la diversidad neutra de la colección para una caracterización más fina orientada a genes de interés agronómico.

❖ Hipótesis:

No existe estructura genética en la colección de *P. vulgaris* del banco nacional de germoplasma del INIAP

❖ Materiales y métodos

Material Vegetal: Se extrajo ADN de 730 accesiones de fréjol arbustivo del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP, las cuales fueron colectadas en fresco del ensayo ubicado en la granja Experimental de Tumbaco manejada por el PRONALEG-GA.

Amplificación de SSRs: para la extracción de ADN se utilizó un kit comercial Purelink 96 Genomic DNA Kit (INVITROGEN Ref. No. K1821-04), el cual permite la extracción simultánea de 96 muestras. Posteriormente se cuantificó el ADN por fluorescencia con bromuro de etidio y se lo diluye hasta una concentración estimada de 5 ng/μl para los ensayos de amplificación de SSRs. Se realizaron pruebas de amplificación con 16 secuencias microsatélites reportados por Gaitán-Solís et al. (2002) para evaluar el polimorfismo de los SSRs y seleccionar por los menos ocho de estas secuencias para utilizarlos posteriormente en el análisis de variabilidad de la colección nacional de fréjol arbustivo.

Genotipaje masal: El proceso de caracterización de la colección de fréjol arbustivo comprende dos fases metodológicas. La primera incluye la estandarización en múltiplex de los primers seleccionados en la fase de screening, y una segunda comprende el genotipaje en serie de los bulks de ADN de cada accesión de la colección. El segundo proceso se realizará en un secuenciador ABI-PRISM 310 el cual permite hasta con cuatro tipos de fluorocromos permite el multiplexaje de hasta cuatro SSR en una misma corrida electroforética sin tener que tomar en cuenta el tamaño de los fragmentos de amplificación, y acelerando significativamente el genotipaje.

❖ Resultados, avances y discusión

La fase de colecta de muestras comenzó en el mes de diciembre, cuando las plantas tenían trifolios jóvenes aptos para una posterior extracción de ADN. Las muestras se colectaron en hielo para evitar su oxidación y proceder a la extracción en fresco. Se colectaron 730 accesiones, las 10 restantes han sido eliminadas del análisis puesto que algunas no fueron sembradas y otras se perdieron en el ensayo en el campo. Con respecto a la extracción y cuantificación de ADN se probaron diversos protocolos de extracción, tomando en cuenta diversos tipos de material vegetal (muestra seca, muestra fresca) y diversas cantidades de reactivos, al final se seleccionó el protocolo de extracción del Kit Purelink 96 Genomic DNA Kit (INVITROGEN Ref. No. K1821-04) con algunas modificaciones obteniendo en general un buen rendimiento de ADN. Al momento se han extraído y cuantificado el 100% de las accesiones.

Se realizaron pruebas de amplificación con 16 secuencias microsatélites reportados por Gaitán-Solís et al. (2002) para evaluar el polimorfismo de los SSRs y utilizarlos posteriormente en toda la colección de fréjol arbustivo. Se ha seleccionado los siguientes seis primers polimórficos: BM181, BM211, BM156, BM154, BM143 y BM140. Al momento se están realizando pruebas de amplificación con los siguientes primers SSRs: BM139, BM142, BM152, BM155, BM160, BM164, BMd10, BMd17, BMd20 y BMd26 para escoger los 4 primers polimórficos restantes.

La fase de genotipaje masal empezará el mes de febrero 2009 con la estandarización en múltiplex de la reacción PCR de los primers seleccionados.

❖ Conclusiones y recomendaciones

La metodología escogida para la colecta y extracción de ADN ha sido la adecuada, por lo que es recomendable continuar con estos protocolos para posteriores ensayos. Las seis secuencias SSRs escogidas presentaron polimorfismo en las accesiones probadas por lo que pueden ser utilizadas para toda la colección de fréjol arbustivo. Si las condiciones logísticas están en óptimo estado se espera terminar con la parte experimental de esta caracterización hasta el primer semestre del 2009.

❖ Bibliografía citada:

- Gaitán-Solís E., Duque C., Edwards K., Tohme J. 2002. Microsatellite Repeats in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, Characterization, and Cross-Species Amplification in *Phaseolus* ssp. Crop Science Society of America. 42: 2128-2136.
- Murillo A., Pinzón J., Peralta E. 1998. Catálogo del Banco de Germoplasma de fréjol, arveja, haba y lenteja. INIAP-EESC, PRONALEG, PROFIZA-COSUDE, PRSP-U. Minnesota, PREDUZA-Holanda.

PROYECTO: GESTION DE LA BIOTECNOLOGÍA Y LA BIOSEGURIDAD

Actividad: **Participación en eventos de Agrobiotecnología**

Responsable: E. Morillo, personal DNB

❖ **Introducción**

La Agrobiotecnología es una disciplina que tiene el potencial de contribuir a mejorar la productividad de los sistemas agrícolas y la calidad de los alimentos y medio ambiente. Los países de América Latina y Ecuador, muestran un interesante interés en el campo de la biotecnología tanto en sus capacidades para desarrollar y/o acceder a las nuevas tecnologías como la situación actual en cuanto al aprovechamiento que están haciendo de las mismas y lo que estas podrían aportar al desarrollo de sus intereses, por esta razón estas interacciones se están empezando a reflejarse en los marcos institucionales de percepción pública y deben ser tomados en cuenta a la hora de diseñar acciones específicas para reforzar las capacidades de investigación y aprovechamiento de las nuevas tecnologías. Es en este contexto, que se debe discutir el que hacer con la biotecnología desde el punto de vista de los investigadores, agricultores y productores. Es necesario que se haga un planteo estratégico que parta de la propia definición de las políticas de investigación y la definición de las prioridades de trabajo, que servirán de guía para las inversiones e investigaciones tanto a nivel interno de la institución como a nivel público y privado.

El Departamento está involucrado en instancias relacionadas a la Agrobiotecnología y la Agrobioseguridad. En colaboración con actores del sector académico y privado, el Departamento de Biotecnología participa en reuniones y/o eventos que buscan generar una influencia positiva en la percepción pública sobre un uso seguro de productos biotecnológicos por medio de la difusión de información científicamente fundamentada a diferentes sectores de la población. La cooperación institucional en materia de agrobiotecnología también se ve fortalecida por estas iniciativas, especialmente en las relacionadas con políticas y difusión de información, que pueden ayudar a mejorar el posicionamiento del Instituto a nivel nacional y regional.

❖ **Propósitos y resultados por lograr**

Participar en eventos relacionados con gestión de la biotecnología y la bioseguridad en la agricultura.

❖ **Objetivo:**

Participar activamente en representación de INIAP en eventos a nivel institucional, público y privado relacionados con agrobiotecnología y bioseguridad.

❖ **Resultados, avances y discusión**

Durante el 2008 se ha participado activamente en las siguientes reuniones y/o eventos:

- **Grupo de trabajo sobre el artículo 27 del Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad de la Biotecnología, Compensación y responsabilidad:** Ministerio del Ambiente, Dirección Nacional sobre Bioseguridad. Reuniones preparatorias para la COP MOP4: Ministerio del Ambiente se encuentra trabajando en la preparación de la posición de país frente a la reunión de la MOP4 sobre Bioseguridad. Se trataron temas sobre Manipulación, Transporte, envasado e identificación de OVM (art. 18), evaluación

de los riesgos y la gestión de riesgos, Responsabilidad y reparación, Órganos subsidiarios, etc.

- **Comité del Codex Alimentarius:** el INIAP fue nombrado por parte de la presidenta del comité, la Dra. Hipatia Nogales, coordinador del subgrupo sobre Alimentos derivados de la Biotecnología. Se participó en un evento de capacitación convocado por el IICA (Quito): “El proceso normativo del Codex Alimentarius y usted” realizado los días 12 y 13 de junio.
- **Taller de trabajo sobre: “Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología”** convocado por la SENACYT y la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE), con el objetivo de fomentar la investigación, desarrollo e innovación en el área de Biotecnología en el país a través de la conformación de una red. ESPE, 30 y 31 de octubre.

❖ **Conclusiones y recomendaciones**

La biotecnología agrícola, sin duda, le ofrece al país un importante potencial de beneficios y, de hecho, algunos de ellos ya los están aprovechando y de manera bastante significativa. La situación, sin embargo, es que se necesita invertir en capacidades de investigación para hacer un pleno aprovechamiento de lo que ofrecen estas nuevas tecnologías. A nivel nacional, el fortalecimiento de capacidades debe partir de una visión estratégica que establezca prioridades para la inversión de los recursos disponibles, asumiendo el que los mismos son limitados y haciendo explícita la forma en que se accederá a las nuevas tecnologías.

El INIAP ha participado en el 2008 en instancias sobre gestión de la agrobiotecnología y bioseguridad ofreciendo su aporte a nivel de políticas nacionales para los tomadores de decisiones.

Resultado: El INIAP participa en redes y grupos de trabajo relacionados con Biotecnología y Bioseguridad

Actividad A1: Participación en la coordinación de REDBIO

Responsable: E. Morillo

❖ **Introducción**

La Red de Cooperación Técnica en Biotecnología Agropecuaria del Ecuador (REDBIO - Ecuador), es la rama nacional de la Red de Cooperación Técnica en Biotecnología Agropecuaria para América Latina y el Caribe (REDBIO/FAO), que cuenta con el auspicio de la FAO desde 1991. Con sus actividades busca favorecer el desarrollo de la biotecnología principalmente vegetal, animal, de microorganismos y ambiental, realizar alianzas y, promover políticas y regulaciones nacionales y regionales de desarrollo apropiado de la biotecnología para los sectores productivos y agroindustriales. El INIAP, entre otras instituciones, forma parte del cuerpo coordinador de la RedBio Ecuador.

❖ **Propósitos y resultados por lograr**

Participar y aportar a la realización de eventos de socialización y capacitación organizados por la red.

❖ **Objetivos**

Apoyar a los eventos y actividades promovidas por la REDBIO que conduzcan a la obtención de un sector productivo sustentado en la aplicación de la biotecnología y ofrezcan oportunidades de alianzas estratégicas entre los actores de la red

❖ **Resultados, avances y discusión**

Durante el 2008 el INIAP apoyo la realización del seminario "BIOTECNOLOGÍA AGROFORESTAL EN EL ECUADOR: AVANCES ACTUALES" realizado el 28 y 29 de febrero en la PUCE-Quito. El evento tuvo como objetivo favorecer la integración de la biotecnología en la producción agropecuaria y forestal del Ecuador entre el sector privado y la academia. Se realizó una presentación con los resultados obtenidos del análisis de diversidad de la chirimoya alcanzado con el proyecto CHERLA del DENAREF.

❖ **Conclusiones y recomendaciones**

Los eventos de socialización de la red dan a conocer los avances alcanzados a nivel de país en biotecnología agrícola, y permiten establecer contactos con perspectivas de colaboración entre los actores a nivel nacional

PROYECTO: PROGRAMA DE AGROBIOTECNOLOGÍA DEL PROCIANDINO Responsable: E. Morillo Instituciones participantes: INIAP, IICA

❖ Introducción

Los Programas Cooperativos de Innovación Tecnológica (PROCI's) surgen de la acción conjunta entre las instituciones nacionales de investigación y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) y son auspiciados, en su funcionamiento, por el Instituto, quien se asocia estrechamente con los países para apoyar su ejecución, desempeñando un papel de cooperante técnico con dichos mecanismos y forjador de alianzas. En esencia, dichos mecanismos se plantearon para mejorar las capacidades científicas y tecnológicas de los países, en temas prioritarios comunes y acordados por ellos mismos, y para ser resueltos mediante la acción conjunta entre países. Los Programas Cooperativos fueron concebidos para contribuir al mejoramiento de las capacidades científicas y tecnológicas de los países. Estos programas, deben su accionar a un trabajo conjunto de las Instituciones Nacionales de Investigación Agropecuaria (INIA's) y el IICA y son auspiciados, en su funcionamiento, por el Instituto. El Programa Cooperativo de Innovación Tecnológica Agropecuaria para la Región Andina, PROCIANDINO, abarca cinco países: Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela.

Este Programa Cooperativo promueve el Desarrollo, la Consolidación y la Creación de mecanismos adecuados de articulación y de intercambio de conocimientos entre los sectores públicos y privados, a nivel nacional e internacional, en materia de innovación tecnológica agropecuaria en la Región, así como también apoya el relacionamiento y participación de la Región Andina con otras Regiones y con otros mecanismos de Cooperación a nivel Hemisférico y Global.

Para la reactivación del PROCIANDINO, se elaboró un plan de mediano plazo 2008-2011 cuya comisión Directiva acordó trabajar en los siguientes Temas estratégicos, dando a cada país el liderazgo de un tema:

- Desarrollo Institucional, liderado por Bolivia.
- Cambio Climático, con énfasis en el tema agua, liderado por Perú.
- Agro Biotecnologías, liderado por Ecuador.
- Bioenergía (Biocombustibles), liderado por Colombia.
- Seguridad y Soberanía alimentaria, liderado por Venezuela.

Estos temas han sido desarrollados, en su Marco Conceptual y Operativo por los INIA's de los países, de los cuales se han tomado las acciones prioritarias, objetivo y justificación los mismos. En el caso de la Agrobiotecnología, ésta está en franco proceso de desarrollo en la región andina. Cabe señalar que para los países andinos, el termino Agrobiotecnología no solo hace referencia al uso de organismos transgénicos, sino al conjunto de herramientas biotecnológicas utilizadas en la investigación agrícola. En los cinco países participantes, Colombia, Ecuador, Venezuela, Perú y Bolivia, el IICA (2006) reporta los siguientes puntos en común en relación al desarrollo de la agrobiotecnología:

- 1 Al ser países megabiodiversos la región tiene una ventaja con respecto a otras regiones del hemisferio
- 2 Los países son signatarios y ratificantes del protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad (PCB)
- 3 Se reporta la existencia de talento humano representado en múltiples instituciones siendo necesario espacios para la difusión de experiencias

- 4 Países con potencial para el desarrollo de la agrobiotecnología pero limitados por el marco legal, esto se debería a que existe contradicción entre la política de los gobiernos de turno y los acuerdos internacionales que dificulta el desarrollo de políticas nacionales.

Tomando en cuenta estas consideraciones, el IICA ha iniciado la implementación de un Programa Hemisférico de Biotecnología y Bioseguridad (PHBB). El propósito del PHBB es facilitar mecanismos para el desarrollo, gestión y uso de las agrobiotecnologías a favor de una agricultura competitiva y sostenible para los países americanos. Para su implementación en la región andina, el IICA organizó un taller de identificación de necesidades para definir los elementos básicos que plantea la iniciativa en la región en función de la realidad de los países (políticas y normas nacionales, plataformas de investigación, capacidades en recursos humanos, etc.) (IICA, 2006). La agrobiotecnología es una disciplina con gran auge en el contexto actual de la investigación agropecuaria. Sin embargo en los países andinos su desarrollo no es uniforme, y es necesaria una mayor sinergia a nivel institucional y entre los laboratorios. El intercambio de experiencias, la capacitación y la ejecución de proyectos o actividades regionales en el tema de biotecnología permitirá fortalecer las capacidades institucionales en esta temática de imprescindible aplicación en los procesos de investigación agrícola.

❖ **Objetivos del proyecto**

General:

Fomentar el desarrollo de la Agrobiotecnología en los países Andinos a través de un programa con PROCINDINO

Específicos:

- Contar con estrategias de difusión e información en agrobiotecnología encaminadas a mejorar la percepción pública en la región
- Ofrecer un sistema de capacitación a nivel de tomadores de decisiones en materia de agrobiotecnología
- Fomentar el establecimiento de planes Nacionales de Biotecnología en los países
- Capacitar a profesionales en investigación y gestión de la agrobiotecnología, inocuidad y análisis de riesgo de OVMs
- Realizar un inventario actualizado de instituciones y recursos humanos en agrobiotecnología
- Proponer acciones que ayuden a articular la gestión de la agrobiotecnología entre el sector público, privado y académico
- Desarrollar proyectos estratégicos regionales que fomenten el establecimiento de alianzas entre instituciones de la región en coordinación con las redes o programas ya existentes

❖ **Palabras clave:**

Agrobiotecnología, región andina, Ecuador, PROCINDINO, INIAP

❖ **Productos esperados e impactos**

La ejecución de los objetivos antes mencionados aportará a un mejor uso de biotecnologías en la investigación agropecuaria y en la prestación de servicios por parte de los laboratorios. En las instituciones participantes los beneficiarios serán investigadores, técnicos y estudiantes en recursos genéticos, programas de mejoramiento (reducción en el tiempo de obtención de variedades mejoradas), y otros. En el sector privado, la prestación de servicios biotecnológicos por parte de los laboratorios públicos beneficiará a actores del sector agroproductivo.

Se facilitará la identificación y promoción de oportunidades para la implementación de actividades entre los distintos actores involucrados en Biotecnología en la zona Andina. El programa permitirá la coordinación de acciones para la difusión eficiente de información, la

formación de capacidades y el asesoramiento en la toma de decisiones políticas. Adicionalmente se promoverá el intercambio de experiencias en la región permitiendo una adecuada identificación de proyectos claves en la región en materia de biotecnología agrícola.

❖ **Resultados, avances y discusión**

En el 2008 el programa arrancó con la aprobación del plan operativo en el componente asignado al Ecuador y posteriormente la ejecución de la actividad prioritaria 1: Diagnostico del estado del arte de la agrobiotecnología en el Ecuador (Ver actividad correspondiente).

Actividad A1: Realizar un estado del arte de la agrobiotecnología en el Ecuador

Responsable: E. Morillo

Colaborador: Marco Taipe (P1 contratado con el PROCINDINO)

❖ **Introducción**

Según un diagnostico de la FAO (Wendt & Izquierdo 2002), la investigación agrobiotecnológica en el Ecuador se realiza en centros de investigación, públicos y privados y en universidades, siendo el cultivo de tejidos y el uso de marcadores las principales aplicaciones. Las tecnologías de cultivo de tejidos están presentes en casi todos los laboratorios y también el uso de marcadores moleculares, especialmente aquellos de sencilla implementación (como los RAPDs y microsatelites) cuyo uso es relativamente común. En la actualidad el sector académico cuenta con varios laboratorios recientemente readecuados y equipados. En el sector público, el INIAP ha creado recientemente el Departamento Nacional de Biotecnología, con tres laboratorios a nivel nacional, y en donde se aplican biotecnologías en investigación y oferta de servicios, como la micropropagación de plantas, embriogénesis somática y uso de marcadores moleculares en varios aspectos (caracterización de germoplasma, identificación varietal, mejoramiento asistido, etc.). En el sector privado, el CINCAE (Centro de Investigación en caña de azúcar) hace uso por ejemplo de biotecnologías como marcadores moleculares y cultivo de tejidos para caracterización, multiplicación y saneamiento de germoplasma de caña de azúcar. La investigación por rubro o cultivo depende del mandato y financiamiento de las instituciones. Proyectos que ejecuta el INIAP, son mayormente financiados por donantes internacionales y se enfocan en cultivos de importancia para la seguridad alimentaria. En el caso de las universidades, existen estudios financiados por el sector privado en rubros de exportación como flores, banano, cacao o frutales.

La información existente en relación al estado de la agrobiotecnología en el país no está debidamente actualizada. En el marco del POA 2008 del PROCINDINO, se propuso realizar el estado del arte en el periodo 2006-2008 y analizar las perspectivas de los centros de investigación. Hasta Diciembre del 2008, se presentan las actividades de investigación en curso, recursos y operatividad de los laboratorios de Agrobiotecnología en el Ecuador. Finalizado el proceso de levantamiento de información vía encuesta (43 en total), se procedió a la tabulación, depuración y análisis de datos. La información se obtuvo vía entrevista personal y por e-mail de 30 Instituciones, y de sus respectivos laboratorios que a nivel nacional suman 55.

❖ **Propósitos y resultados por lograr**

Se busca realizar un diagnostico a nivel nacional de la abrobiotecnología en el país y preparar una publicación.

❖ **Objetivo:**

Levantar y compilar información para la elaboración de un diagnóstico nacional en Agrobiotecnología

❖ **Materiales y métodos**

El presente diagnostico se basa en la información recopilada por encuestas, entrevista personal, visitas técnicas o por e-mail de las instituciones y laboratorios en el Ecuador que tienen su línea de acción en la Agrobiotecnología. Basados en un listado de instituciones inscritas en la página web de REDBIO, se procedió a seleccionar las instituciones en el

Ecuador dedicadas a la agrobiotecnología, complementándose con un mayor número de instituciones a través de revisión bibliográfica y recomendaciones de investigadores y de gente involucrada en el área.

Se desarrollo una encuesta en formato digital la misma que constituye la línea base del presente trabajo, este formulario fue enviado por medio electrónico al mayor número de instituciones posibles involucradas en el área agrobiotecnologica; a vuelta de correo algunas encuestas fueron llenadas digitalmente y otras no. En las instituciones donde hubo apertura para realizar la fotodocumentación, entrevista personal y toma de datos fue necesario planificar un cronograma de visitas, las mismas que se desarrollaron entre los meses de noviembre de 2008 y febrero de 2009.

Para cumplir con el objetivo y los productos de la AP1 dentro del Componente de Agrobiotecnología, se procedió a la contratación de un asistente técnico (Ing. M.Taipe) con quien se han coordinado actividades. Para el levantamiento de la información se elaboró un formulario o encuesta que ha sido distribuido a dos niveles:

- a) a nivel regional, distribuyéndose la encuesta a los coordinadores nacionales para el PA vía correo electrónico
- b) a nivel nacional, en visitas técnicas (para los laboratorios más grandes y con fines de fotodocumentación de la infraestructura, además previa autorización de los responsables de los laboratorios), y vía electrónica para el resto de laboratorios

Para el levantamiento a nivel nacional, se procedió a la Elaboración de un listado de laboratorios existentes en el Ecuador. Se realizaron misiones de visitas técnicas a los laboratorios de ABT: Las visitas realizadas hasta el momento han permitido obtener información y fotodocumentacion de los laboratorios.

❖ **Resultados, avances y discusión**

Hasta Diciembre del 2008:

Se dispone de una base de datos de 55 laboratorios que realizan actividades en biotecnología en el país, de los cuales se ha levantado información al momento de 18 laboratorios. El producto obtenido de estas visitas son los formularios que contienen información sobre investigación en curso, los recursos financieros y humanos, la operatividad de esos laboratorios; y además la fotodocumentación de sus instalaciones para la publicación de un catalogo nacional de laboratorios.

Un grupo de instituciones han sido convocadas vía correo electrónico a participar en la actividad que se está desarrollando. Al momento no se ha recibido aun información de parte de los otros países; el Coordinador para Peru se ha comprometido en enviar la información y para Bolivia se contara con información a través del secretario ejecutivo del PA. Con las encuestas realizadas hasta el momento, se ha empezado a tabular los datos, para lo cual se ha comenzado con la depuración de las encuestas y el ingreso de las mismas a una hoja electrónica en Access. El análisis estadístico de la información se desarrollara cuando se tenga la mayor cantidad de datos ingresados tanto a nivel nacional como regional.

❖ **Conclusiones y recomendaciones**

De la información hasta el momento recopilada se puede mencionar que hay una gran tendencia a implementar y equipar laboratorios dedicados específicamente al cultivo de tejidos y biología molecular, pero también se puede notar que ciertas instituciones han dejado de realizar estas actividades y otras solo las desarrollan cuando están en docencia o cuando se ejecuta un proyecto específico.

Se puede reconocer también que hay líneas de acción, investigación o tendencias en cuanto se refiere a agrobiotecnología, estas al parecer serían: el cultivo de tejidos (para los vegetales, especies forestales, en la conservación y multiplicación); y biología molecular (microorganismos, animales “camarones” y plantas). El levantamiento de información deberá

estar concluido hasa marzo del 2009. Hasta junio se publicara el diagnostico de la agrobiotecnologia en el país y se publicará un catalogo de laboratorios a nivel nacional.

❖ **Bibliografía citada:**

Wendt J. e Izquierdo J. (2002). Manejo y gestión de la biotecnología agrícola apropiada para pequeños productores: estudio de caso Ecuador. Publicacion REDBIO Internacional, FAO. 73p.

FIGURAS

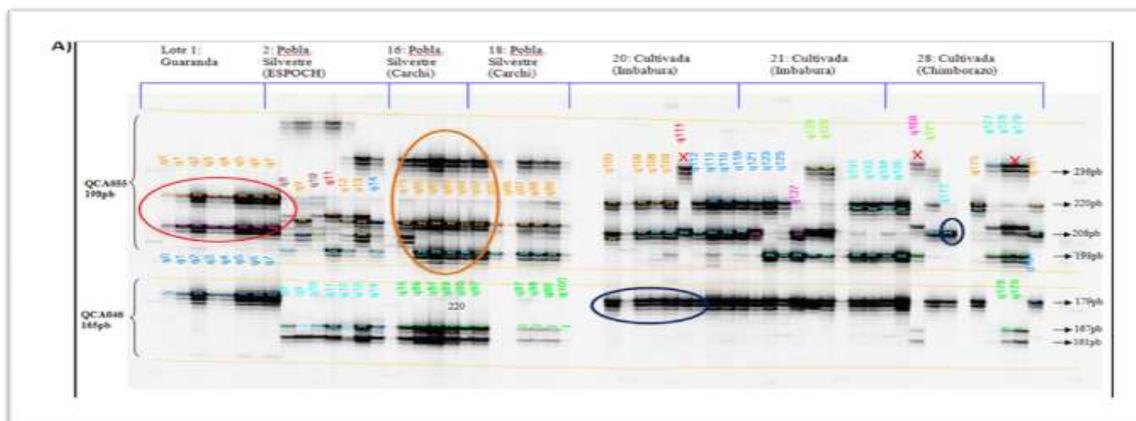


Figura 1. Duplexaje de primers QCA46 y QCA55 en quinuas cultivadas, maleza y silvestres revelados con el método M13-tailing en 700 nm. En el locus QCA55 se observan en la mayoría de muestras, tres alelos de 236, 208 y 198 pb en tomate. Se señalan con rojo individuos heterocigotos y con azul los homocigotos. Obsérvense los alelos 198 y 236, los cuales son compartidos entre quinuas silvestres y quinuas cultivadas, mientras que el locus QCA46 es poco informativo ya que se no observan mayor polimorfismo.

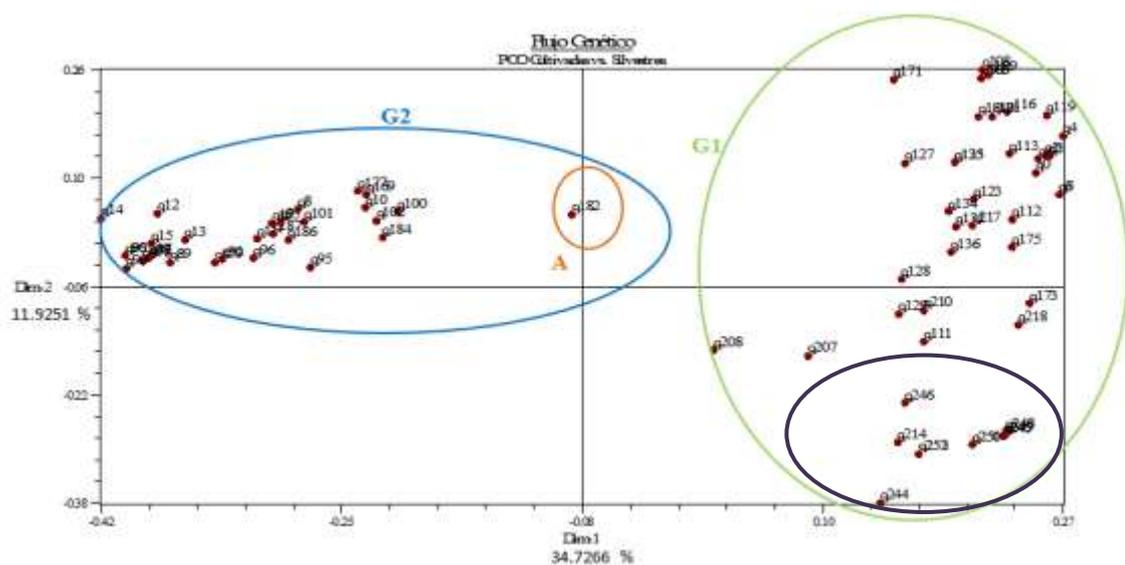


Figura 2. PCO obtenido con el coeficiente de similitud SM de las dos primeras coordenadas que muestra la diferenciación entre quinuas cultivadas y quinuas silvestres y malezas.

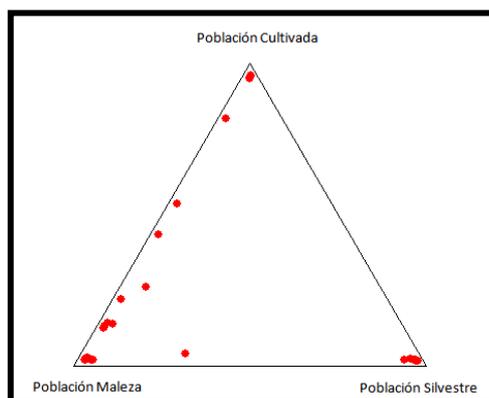


Figura 3. Test de asignación genética para los grupos cultivado, silvestre y maleza de quinua ($K = 3$) obtenido con el software STRUCTURA

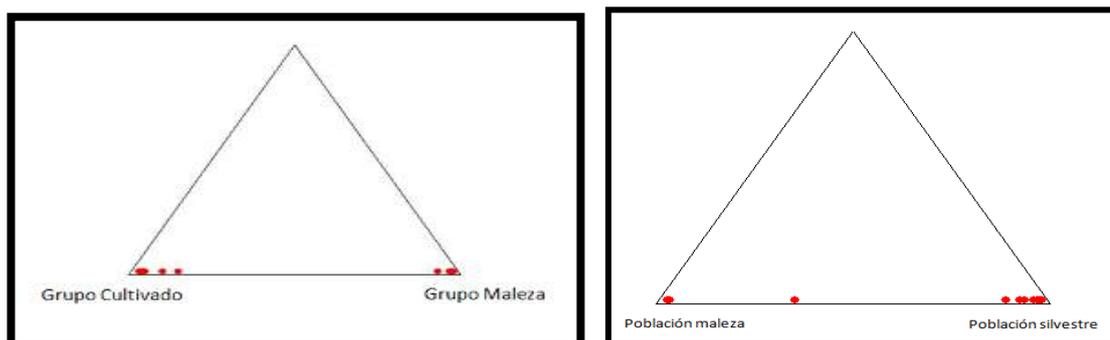


Figura 4. Test de asignación genética con una valor predeterminado de $K = 2$. **Izq.:** Distinción entre quinuas cultivadas y malezas o mallas. **Der.:** Distinción entre quinuas maleza y silvestres.

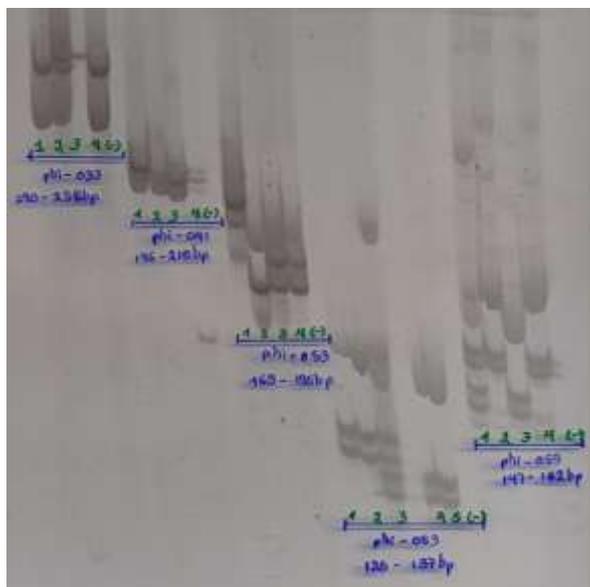


Figura 5. Genotipos SSR revelados en acrilamida de las cuatro líneas de maíz en estudio

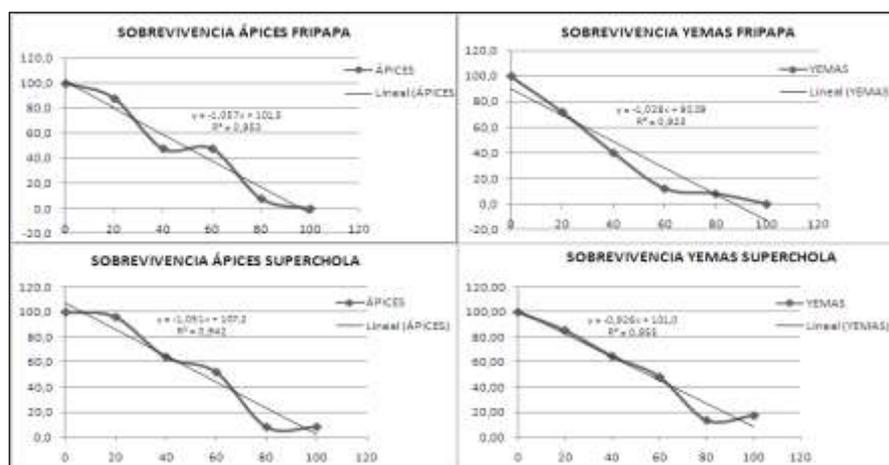


Figura 6. Curva de regresión lineal para la determinación de la sobrevivencia del 70% de los explantes provenientes de ápices y yemas *in vitro*, evaluados a los 30 días de ser irradiados material de las variedades Superchola e INIAP-Fripapa.

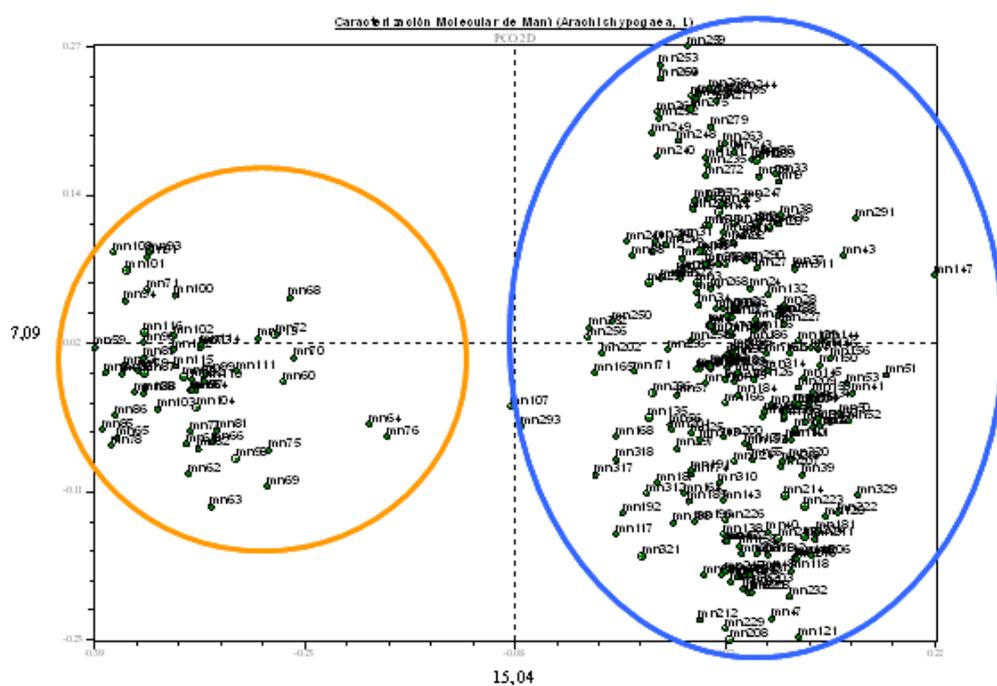


Figura 7. Análisis de las Coordenadas Principales (PCO) de 288 accesiones de maní proyectadas de acuerdo al polimorfismo observado con 10 locus SSR.

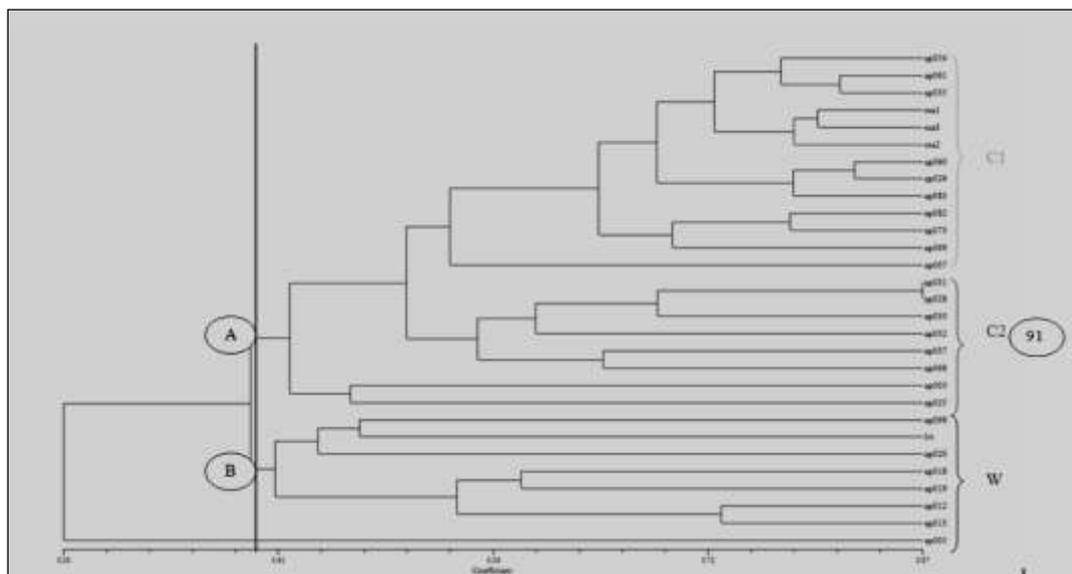


Figura 8. Árbol UPGMA en base a 13 polimorfismos ISSR y 152 bandas AFLPs de 29 accesiones de *R. glaucus* y especies afines. Las letras A, B representan cada una de las ramas principales del árbol. Los códigos C1, C2 representan los subgrupos en *R. glaucus*. Se incluye el valor bootstrap obtenido para el grupo C2.

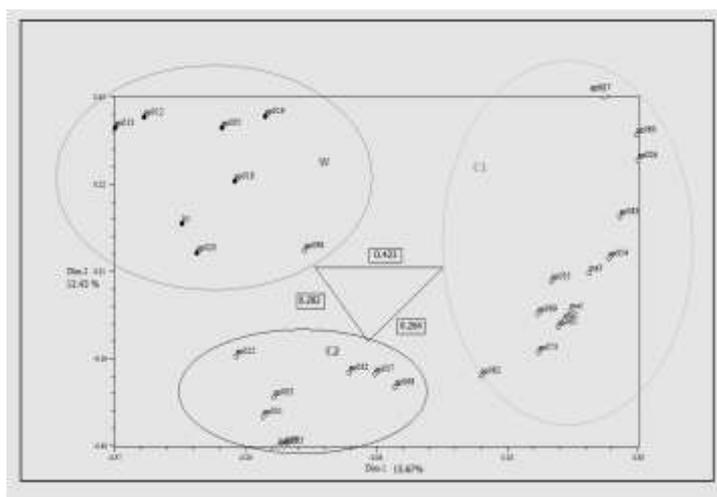
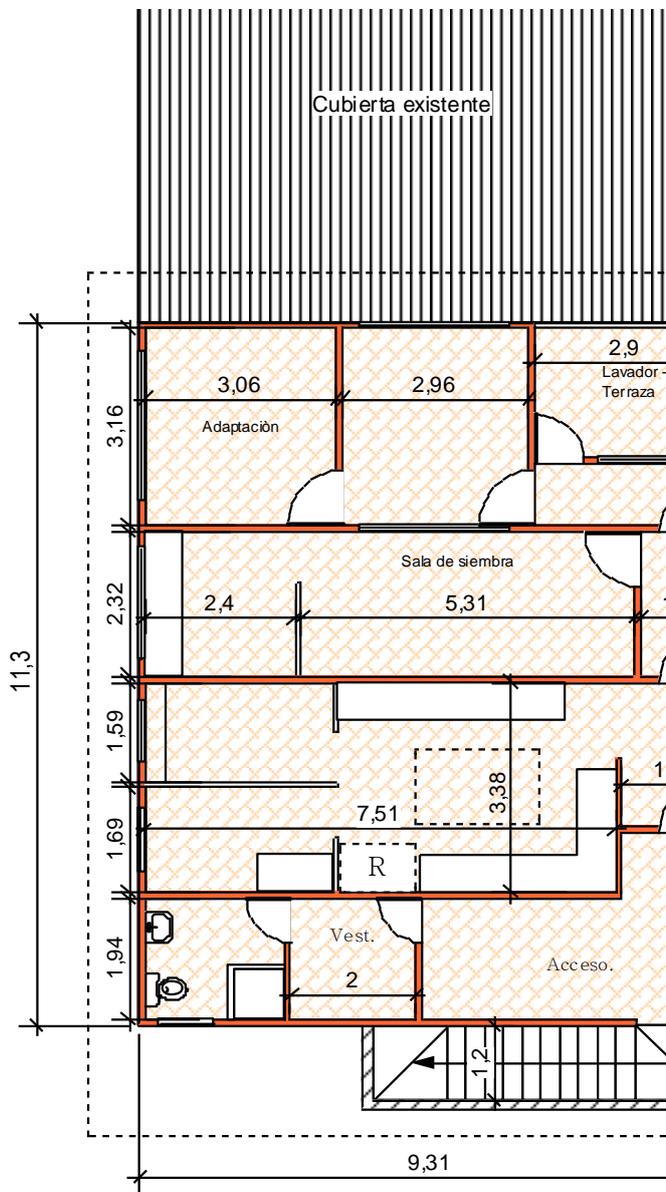


Figura 9. PCO que muestra la distribución en el plano definido por las dos primeras coordenadas que extraen un 27% de la variación genética observada con marcadores AFLPs e ISSRs en 29 accesiones de *R. glaucus* y especies afines. Los códigos C1, C2 y B corresponden a los grupos definidos por el Análisis de Agrupamiento (Fig. 3). Se adicionaron los valores obtenidos para las distancias

genéticas de Nei de la comparación dos a dos entre los tres grupos determinados C1, C2 y W (B en la Fig. 3).

ANEXOS

Anexo 1. Diseño de la planta alta para la ampliación del laboratorio de Biotecnología de la EECH



LABORATORIO F

PROYECTO: LABORATORIO INIAP		Oficina: AL
Contiene	PLANTA ALTA	Escala 1 : 100

Anexo 2. Construcción y nuevas instalaciones del laboratorio de Biotecnología de la EECH



Anexo 3. Nuevas áreas operativas de los laboratorios del Dpto. de Biotecnología de la EESC

Anexo 4. Equipos adquiridos con el proyecto BIOTECNOLOGIA para los laboratorios de la EESC

Un Horno Esterilizador



Tres Incubadoras



Un Tanque Crioconservación



Cuatro Dispensador de medios



Cuatro Platos Agitadores



Tres vortex



Dos Agitadores Orbitales (Shakers)



Dos Balanzas de Precisión



Dos Fuentes de Poder 3000V



Dos pH metros de mesa



Dos Termocicladores a Gradiente



Un sistema de Fotodocumentador con Impresora



Una Balanza Analítica



Una Centrifuga refrigerada



Una Sorbona



Una cámara de flujo laminar



Destilador de agua



Un autoclave semiautomática



Genotipador LI-COR 4300S



Secuenciador ABI-PRISM 310

