PD-AAK-377

54983

4.469

MAINTENANCE AND SANITATION OF THE ANDEAN TUBER CROPS BY TISSUE CULTURE METHODS

AID Project 936-5542 Obligation 3641295

Progress Report No. 2

From February to December 1985

I. Project Members

Responsible:	Biologist Rolando Estrada
Assistants:	Dr. Teresa Bengochea (until July 1985)
Students:	Mr. C. Pulache Biologist T. Yonamine (M.S. Thesis) Mr. H. Sánchez Mr. F. Albújar Mr. R. La Rosa Mr. J. Peñafiel

II. Advances

A. Installation of the Laboratory

Major progress has been mostly obtained during the last 6 to 8 months. Unstable political situation--continuous strikes of customs offices and of university employers--delayed the establishment of the Laboratory until June-July. Other problems, e.g., water supply, are being solved slowly.

B. Tissue Culture

1) Establishment of Germplasm Bank

The clones stored in the germplasm bank were introduced using media (M1) described in Progress Report No. 1, 217 clones are actually maintained *in vitro* (Table 1). Other clones are still growing. It was necessary to apply variants for shoots and meristems of Oca. To prevent oxidation of explant activated charcoal is used now, and increased GA concentration for best response was applied.

JAN 30 1986

Table 1. Number of clones stored in vitro

	ORIGIN				
Crop	Huancayo	Cusco	Puno	Ayacucho	Total
Oca	12	7	21	38	78
Olluco	25	-	-	64	89
Mashua	12	18	2	26	58
Total	49	25	23	128	217

The material from each locality was brought as cuttings or tubers, the best explant (high survival, less contamination) was obtained from the sprouts. Ayacucho's collection is already in vitro (plants or shoots).

2) Propagation and Transfer to Soil

Liquid medium for rapid propagation of mashua has already been developed, shoots and roots are growing without callus formation. Research is in progress. A rapid propagation system for Oca and Olluco has been previously reported.

The nodal cuttings are obtained from the plantlets propagated in liquid media and planted in M1 without hormones to prevent elongation of the stems. After approximately 45 days, the plantlets are tranferred to soil (see attached Information Bulletin 1). Using this sytem 2000 plantlets are being planted in Arequipa (it involves 3 crops). The results will be available in April 1986.

3) Storage

MS basic medium plus 4% Mannitol and 3% Sucrose is being evaluated at this moment. Clones of Olluco were stored during seven to ten months at 20-22°C, and Oca and Mashua during three to four months at 18°C. with slow rate of growth.

4) Germplasm Distribution

Twenty-one clones have been sent to South Korea and United States for agronomic and basic research, respectively. These were sent by airfreight in test tubes sealed with parafin and packed in polystyrene boxes. (See attached bulletin.)

6) Virus Identification

In cooperative work with CIP, 212 clones were tested: 88 of Oca, 40 of Mashua, and 84 of Olluco.

The methods used were host range and electron microscope tests. Many different symptoms were found in the indicator plants and also differences in morphology particles (Table 2).

To know if the viruses that normally infect potato plants also attack these crops, ELISA and latex test were used: negative results were obtained for PVX, PVS, PVY, APLV, APMV. In some cases a positive response was obtained when testing for PBRV (Table 3).

Table 2. Percentage of infected clones (indicator plants)*

Crop	Zone			
	Ayacucho	Cuzco	Puno	Huancayo
Mashua: *Tropaeolum tuberosum*	56.6%	10%	-	-
Oca: *Oxalis tuberosa*	-	5%	47.5%	61.2%
Olluco: *Ullucus tuberosum*	100.0%	-	-	93.0%

*

Morphology	Size
Isometric	28-30 mm (full and empty particles)
Elongated flexuous	660 mm (possible potex-virus)
	700-760 mm (possible potex-virus)
Rod shaped	300 mm (tubamovirus)

Table 3. ELISA test for PBRV

Crop	Ayacucho	Cuzco	Puno	Huancayo
Mashua	0%	0%	-	-
Oca	-	0%	0%	8.33%*
Olluco	0%	-	-	-

* Only three clones were infected with virus.

5) In Vitro Tuberization

Best results were obtained with Olluco. No good response was still obtained from Oca nor Mashua. The appropriate concentration of Sucrose for *in vitro* tuberization of Olluco is 6%, the tuber induction was three weeks earlier in dark than in light.

C) Institutional Cooperative Arrangements

Conversations are taking place with INIAP-Ecuador (Ing. Castillo, Estación Santa Catalina) for receiving and establishing a duplicate of their *in vitro* collection.

D) Training

A student, Miss Graciela Reátegui, received training in the Virology Laboratory at CIP, from July to December 1985.

Mrs. Mercedes Gonzales (Universidad Nacional La Cancuta) and Mrs. Gloria de Abad (Universidad Nacional Agraria La Molina) are being training in our Tissue Culture Laboratory.

E) Publications and Papers

Manya, W. T., Bengochea, C. Pulache, T. Yonamine, H. Sánchez, R. La Rosa, F. Albújar, J. Peñafiel y R. Estrada. 1985. Conservación *in vitro* de Tuberosas Andinas. III Congreso Nacional de Botánica. Iquitos, Peru. Libro de Resúmenes. pp. 47.

Sánchez, H., R. La Rosa, W. Manya y R. Estrada. 1985. Conservación *in vitro* de Olluco. III Congreso Nacional de Botánica. Iquitos, Perú. Libro de Resúmenes. pp. 48-49.

Pulache, C., F. Albújar, W. Manya y R. Estrada. 1985. Cultivo *in vitro* de Mashua. III Congreso Nacional de Botánica. Iquitos, Perú. Libro de Resúmenes. pp. 48.

Yonamine, T. y R. Estrada. 1985. Tuberización *in vitro* de *Ullucus tuberus*. III Congreso Nacional de Botánica. Iquitos, Perú. Libro de Resúmenes. pp. 46-47.

Manya, W. T. Bengochea y R. Estrada. 1985. Conservación y micropropagación de Oca. III Congreso Nacional de Botánica. Iquitos, Perú. Libro de Resúmenes. pp. 49.

Martínez, E. y R. Estrada. 1985. Virus del anillo necrótico de la papa (Potato Black Ring Virus) aislado de *Oxalis tuberosa* en Huancayo. IX Congreso Peruano de Fitopatología. Huánuco, Perú. Libro de Resúmenes. 00. 2.

Estrada R. 1985. Cultivo de Tejidos vegetales en Perú. En Taller de Trabajo sobre cultivo de células y tejidos vegetales para el mejoramiento de la producción agrícola. Instituto International de Estudios Avanzados. 29-31 de marzo. Caracas, Venezuela.

Laboratory of Genetic Resources and Biotechnology
Information Bulletin 1

RECEPT AND MANAGEMENT OF IN VITRO PLANTLETS OF OF THE ANDEAN TUBER CROPS

The following procedures can be applied to any one of the following crops oca (*Oxalis tuberosa*), ullucu (*Ullucus tuberosum*), and mashua or isaño (*Tropaeolum tuberosum*).

1. The Package

1.1 The material is packed in polystyrene bags in a cardboard container. each package contains several small glass test tubes, each one with 3-4 well developed plantlets in agar medium'

1.2 Each tube is marked with a code number. Check the clone number in the list enclosed.

2. Handling after arrival

2.1 The packages should be cleared from customs as quickly as possible after its arrival and the test tubes carefully taken out of the package.

2.2 Do not remove the plantlets. Take precautions against contamination of the culture during and after unpacking.

2.3 If plantlets are yellowish, put the test tube under light, at 18-20°C, in a clean place for about one week.

3. Micropropagation by nodal cuttings

If appropriate facilities are available, the following procedures can be undertaken after Step 2.3, if not, read Title 4: Transplanting to soil.

3.1 Prepare the growth medium: Murashige-Skood basic medium* supplemented by Sucrose 3% + Gibberellic acid 0.72 mM + Calcium pantothenate 10.74 mM + Agar 0.8%, adjust to pH 5.6. Dispense 4 ml of the medium in 16 x 125 mm test tubes cap and sterilize.

3.2 Disinfect the surface of the test tube using a piece of cotton moistened in 70% alcohol

3.3 Working under sterile conditions in a transfer cabinet, transfer the plantlets from the shipping test tube to sterile petri dish.

3.4 Separate nodal cuttings with the aid of sterilized scalpel and forceps. Each nodal cutting consists of a 0.5 cm with an axillary bud and its substanding little leaf.

3.5 Plant each nodal cutting in a test tube, horizontally on the medium, cap and incubate under the following conditions: light (1000 lux), 16 hour day, and 10-20°C.

The axillary bud of each nodal cutting will grow into an entire plantlet within 4-8 weeks and be ready to transplant to soil or go back to Step 3.2.

4. Transfer to soil

4.1 Prepare soil mixture: equal parts of sand and peat-moss. Sterilize and distribute in pots or beds.

4.2 Wash your hands with soap and water and rinse with 70% alcohol

---

* Murashige, T. and F. Skoog, 1962. Physiology plantarum 15:473-496.

4.3 Disinfect the surface of the test tube using a piece of cotton moistened in 70% alcohol.

4.4 Using a sterilized forcep, pull the plantlet very gently from the test tube. Wash the agar from the roots with water and using clean fingers put the plantlet in the hole in the soil.

4.5 Slightly press the soil around the plantlet and add to each one 50 ml of N P K, 14:50:12, 5 g per litter. Watering should be little, only as needed. Do not overwater.

4.6 Cover the entire plantlet with an inverted beaker to prevent excessive dehydratation.

4.7 Gradually expose the plants to the normal atmosphere.

Rolando Estrada
December, 1985

CONSERVACION IN VITRO DE TUBEROSAS ANDINAS

Walter Manya, Teresa Bengochea, César Pulache, Teresa Yonamine, Héctor Sanchez, Rafael La Rosa, Freddy Albújar, José Peñafiel y Rolando Estrada
Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Apartado 10584, Lima-Perú
Financiado por AID, Proyecto 936-5542, Obligación 3641295.

Debido a problemas biológicos, ambientales y socioeconómicos está en peligro de perderse la variabilidad genética de cultivos de gran importancia para la alimentación del poblador altoandino de Bolivia, Perú, Ecuador y Colombia. Diversidad genética que en muchos casos y con mucho esfuerzo ha sido colectada por algunas universidades del país : Puno, Cuzco, Ayacucho y Huancayo, entre otras.

El Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología dela UNMSM ha iniciado un programa dirigido a conservar las colecciones de Oca, Olluco y Mashua de las Universidades mencionadas, utilizando sistemas in vitro.La colección cuenta ahora con 67 clones de oca, 40 de olluco y 39 de mashua. Se desarrollan trabajos para la detección y eliminación de virus.

La producción de material libre de patógenos tendrá como objetivos principales : a) Producción de semilla básica para las comunidades campesinas y b) investigación científica.

CONSERVACION Y MICROPROPAGACION IN VITRO DE OCA

Walter Manya, Teresa Bengochea y Rolando Estrada
Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Casilla 10584, Lima-Perú
Financiado por AID, Proyecto 936-5542, Obligación 3641295 y CONCYTEC

La Oca (Oxalis tuberosa Mol.) es uno de los tubérculos de mayor consumo de la región andina. Se presenta un método para su conservación in vitro.
Se desinfectaron yemas axilares y sembraron en condiciones asépticas en un medio de cultivo constituido por : sales minerales de Murashige y Skoog (1962) suplementado con i-inositol 100 ppm, tiamina 0.4 ppm, pantotenato de calcio 2 ppm, ácido giberélico o.25 ppm, sucrosa 3 % y agar 0.8 %. Los explantes se cultivaron a 18 °C +/- 2, 16 horas luz y 500 lux.
Una semana después de la siembra el 50 % de los explantes desarrollaron como plántulas que a las seis semanas alcanzaron aproximadamente 8 cm de altura, haciendose necesario transferir a medio fresco. L a propagación del material in vitro se realizó cortando nudos, cada uno con su respectiva yema axilar, con un porcentaje de crecimiento del 100 %.
Plantulas fueron transferidas a suelo, cosechandose tubérculos a los cuatro meses

CONSERVACION Y MICROPROPAGACION IN VITRO DE OLLUCO

Héctor Sánchez, Rafael La Rosa, Walter Manya y Rolando Estrada
Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Apartado 10584, Lima-Perú
Financiado por AID, Proyecto 936-5542, Obligación 3641295 y CONCYTEC

En el presente resumen se reporta los métodos desarrollados para la conservación y micropropagación in vitro de Olluco (Ullucus tuberosus)
Se aislaron y sembraron en condiciones asépticas yemas axilares de esquejes procedentes de las Universidades San Cristobal de Huamanga, Nacional del Centro, Técnica del Altiplano y San Antonio Abad del Cuzco; en el medio básico de Murashige & Skoog (1962) suplementado con ácido giberélico 0.25 ppm, pantotenato de calcio 2 ppm, sucrosa 3 % y agar 0.8 %; ajustado a un pH de 5.6. Los explantes fueron incubados a 18 °C +/- 2, 16 horas luz y 500 lux.
Entre la cuarta y quinta semana las plantas alcanzan aproximadamente 8 cm de altura; transfiriéndolas a medio fresco por corte de nudos o cortando pociones de tallo y sembrándolos en el medio básico de Murashige y Skoog (1962) suplementado con Benzilaminopurina 0.5 ppm, ácido giberélico 0.4 ppm, ácido naftalen acético 0.01 ppm y sucrosa 2 %. Incubándose en agitación continua.
El 68 % de los clones sembrados se conservan actualmente bajo condiciones in vitro. Plántulas han sido transferidas a suelo con resultados satisfactorios.

CULTIVO IN VITRO DE MASHUA

César Pulache, Freddy Albújar, Walter Manya y Rolando Estrada
Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Apartado 10584, Lima-Perú
Financiado por AID, Proyecto 936-5542, Obligación 3641295 y CONCYTEC

La Mashua o Isaño (Tropaeolum tuberosum) es un cultivo alimenticio de gran importancia para el poblador altoandino, debido a su tolerancia a sequías y bajas temperaturas. La variabilidad genética de esta especie está en peligro de perderse debido a factores biológicos y/o ambientales. El cultivo de tejidos se presenta como la mejor alternativa para conservar la diversidad genética de la especie.

Se aislaron y sembraron yemas en condiciones asépticas, en el medio básico de Murashige & Skoog (1962) suplementado con ácido giberélico 0.25 ppm, pantotenato de calcio 2 ppm, 3 % de sucrosa y 0.8 % de agar; ajustado a un pH de 5.6. Se incubaron a 18 °C +/- 2, 16 horas luz y 500 lux.

A la tercera semana las plántulas alcanzaron aproximadamente 8 cm de altura haciéndose necesario su transferencia a medio fresco. Estas plántulas fueron propagadas por corte de nudos, con sus respectivas yemas, en el medio descrito. Plántulas han sido transferidas a suelo satisfactoriamente.

TUBERIZACION IN VITRO DE *Ullucus tuberosus*

Teresa Yonamine y Rolando Estrada

Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Apartado 10584, Lima-Perú
Financiado por AID, Proyecto 936-5542, Obligación 3641295 y CONCYTEC

Los tubérculos in vitro ofrecen ventajas en la conservación, propagación y distribución de germoplasma. Se diseñó un ensayo preliminar, para determinar las condiciones necesarias para la inducción in vitro de tubérculos de olluco.

A partir de plantas in vitro se cortaron esquejes y sembraron, 8 - 10 nudos por frasco, en el medio básico de Murashige y Skoog (1962) y suplementado con Acido giberélico 0.4 ppm, Benzilaminopurina 0.5 ppm, Acido naftalenacético o.01 ppm y sucrosa 2 %. El material fue incubado en agitación continua a 18 °C +/- 2, 16 horas luz y 500 lux por diferentes periodos : 10, 18, 29 y 45 días. Cumplido cada uno de los periodos, el medio de propagación se reemplazó por un medio inductor de tuberización : Sales de Murashige y Skoog suplementado con Benzilaminopurina 5 ppm, Cloruro de clorocolina 500 ppm y sucrosa 8 %. La inducción de tuberización fue evaluada bajo dos tratamientos a) 16 horas luz y 50 lux b) 0 horas luz.

En todos los casos se observó la formación de tubérculos. Presentandose una relación directa entre el tiempo de crecimiento previo a la inducción y número de tubérculos.

VIRUS DEL ANILLO NECROTICO DE LA PAPA (POTATO BLACK RING VIRUS) AISLADO DE Oxalis tuberosa EN HUANCAYO. Emma V. Martínez S. y R. Estrada. Centro Internacional de la Papa, Aptdo. 5969, Lima, Perú y Univ. Nac. Mayor de San Marcos - Proyecto AID 936-5542 obligación 3641295, Aptdo. 10584, Lima, Perú, respectivamente.

En un estudio preliminar sobre la incidencia de virus en cultivos comerciales de Oxalis tuberosa Mol. "oca", se obtuvieron 3 aislamientos de un virus que producía síntomas de anillos necróticos en Datura metel después de la primera inoculación mecánica con extracto de hojas. Tales aislamientos se inocularon en un grupo de hospederos observándose manchas necróticas en Gomphrena globosa y Nicotiana bigelovi x N. clevelandii, anillos necróticos en N. tabacum 'Samsum', necrosis apical en Chenopodium quinoa y C. amaranticolor, y necrosis generalizada en C. murale. La observación al microscopio electrónico demostró la presencia en alta concentración de partículas isométricas de 25 nm de diámetro. En pruebas serológicas de doble difusión los tres aislamientos mostraron reacción de identidad con un antisuero contra PBRV y en ELISA directa reaccionaron con inmunoglobulinas de un aislamiento tipo de PBRV. La sintomatología, la observación al microscopio electrónico y las pruebas serológicas, confirman la presencia del virus del anillo necrótico de la papa en plantas de oca procedentes de Huancayo. No se ha detectado el virus en muestras de Ayacucho, Cuzco y Puno.

14