



INIAP - UC - CIP - PRACIPA

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA
PROGRAMA ANDINO COOPERATIVO DE INVESTIGACION EN PAPA

MEMORIAS DEL TERCER CURSO

SOBRE MULTIPLICACION ACELERADA DE SEMILLA DE PAPA
LIBRE DE VIRUS A PARTIR DE CULTIVO DE MERISTEMAS

29 - 31 de Mayo de 1985

ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA"
QUITO - ECUADOR

PRODUCCION DE SEMILLA DE PAPA LIBRE DE VIRUS

Diego Estrella M.*

INTRODUCCION

El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP, a través del Programa de Papa de la Estación Experimental Santa Catalina (3.050 m.s.n.m.) ha desarrollado la tecnología necesaria para incrementar notablemente la producción y productividad de este cultivo a nivel nacional, mediante el desarrollo de variedades mejoradas, producción de semilla, prácticas culturales, control de plagas y enfermedades, etc. Pero el éxito en la producción de papa depende en gran medida del uso de semilla de buena calidad, semilla que debe estar libre de todo tipo de contaminaciones, especialmente virus que son los causantes de la disminución gradual de la producción.

Este último aspecto ha sido bastante crítico en el esquema de certificación de semilla del país, por cuanto la aplicación de tecnologías convencionales de producción de semilla básica no han garantizado la buena calidad requerida.

La problemática descrita ha determinado que el INIAP aplique una nueva tecnología de producción de semilla libre de virus y otros patógenos, basada en el cultivo de tejidos y propagación acelerada.

* Técnico del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias Estación Experimental Santa Catalina. Departamento de Producción de Semillas.

ENFERMEDADES VIROSAS DE LA PAPA

Se conocen aproximadamente 25 virus y un viroide que afectan a la papa en condiciones naturales, causando diferentes síntomas en hojas, tallos y tubérculos, además casi todas las enfermedades virosas reducen el vigor de la planta y muchas causan fuertes pérdidas de rendimiento.

A pesar de que las enfermedades virosas en muy pocos casos son de carácter letal, disminuyen las posibilidades de utilizar el tubérculo como semilla.

SANEAMIENTO DE CLONES AFECTADOS POR VIRUS

De las diferentes enfermedades de las plantas, las causadas por virus son las más difíciles de eliminar; el saneamiento de clones afectados por este tipo de enfermedades permite simultáneamente eliminar hongos y bacterias, si estuvieran infectando el mismo clon.

En términos generales el saneamiento comprende las siguientes etapas:

1. Identificación del agente causal
2. Aplicación de la técnica de saneamiento utilizando una o varias de las siguientes técnicas:
 - a. Localización. Aprovechamiento de la distribución irregular de los virus en las plantas.

- b. Quimioterapia. Esta técnica se encuentra en etapa experimental.
 - c. Termoterapia
 - d. Cultivo de meristemas
 - e. Termoterapia seguida de cultivo de meristemas
 - f. Termoterapia durante el cultivo de meristemas
3. Aplicación de pruebas de detección de virus, utilizando una o varias de las siguientes técnicas:
- a. Diagnósis basada en los síntomas visibles en el campo, siempre que sea factible.
 - b. Técnicas de transmisión de patógenos a plantas indicadoras, mediante inoculación mecánica, injertos, vectores de transmisión.
 - c. Serología mediante técnicas de inmunodifusión, precipitación y pruebas inmunoabsorbentes de enzimas ligadas (ELISA) y látex.
 - d. Microscopía electrónica
 - e. Electroforesis
 - f. Hibridación de ácidos nucleicos

4. Propagación del material sano

Se debe realizar en condiciones que impidan la reinfección.

Termoterapia

El principio básico de la termoterapia radica en que los microorganismos parásitos a menudo pueden ser eliminados o inactivados a determinada temperatura y tiempo que son ligeramente perjudiciales para el hospedante. La termoterapia al afectar el metabolismo celular, parece que altera la síntesis del virus.

La competencia por los sitios de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas entre las células que se dividen rápidamente y los virus, al mismo tiempo que la degradación más rápida a temperaturas altas de las partículas de virus, dan como resultado un cambio en el balance síntesis-degradación de las partículas virales; aparentemente este mecanismo sería apropiado para explicar la ausencia o reducción de los virus en los meristemas.

En papa, las plantas deben ser introducidas a un cuarto de crecimiento, en donde reciben una temperatura de 36°C durante 16 horas y 30°C durante 8 horas, bajo iluminación continua y una humedad relativa del 70%, durante cuatro semanas.

Cultivo de Meristemas

El cultivo de meristemas como una técnica para el saneamiento de clones afectados por patógenos, especialmente virus, se fundamenta en el hecho de que la distribución de los virus en los

tejidos de la planta infectada no es uniforme y su concentración tiende a disminuir progresivamente hacia el meristema apical del tallo; por lo tanto, las probabilidades de que en las células del meristema apical se encuentren en menor número o estén libres de partículas virales, son mayores que en los tejidos diferenciados de la planta, esto aumenta la posibilidad de obtener plantas sanas mediante escisión y el consiguiente cultivo de meristemas en medio nutritivo estéril.

Para cultivar meristemas con el propósito de eliminar virus, es preciso aislar el meristema con un mínimo de primordios foliares; al cultivar el meristema solo, las probabilidades de que crezca son muy reducidas, en cambio acompañado de uno o dos primordios foliares se puede desarrollar con más facilidad, sin embargo, puede ocurrir que los primordios no estén libres de virus y que la planta originada siga contaminada.

Para explicar la sanidad o limpieza de los meristemas, se han formulado varias hipótesis. Una de ellas plantea el hecho de que debido a la ausencia de tejido vascular en la proximidad del meristema apical y a que las conexiones plasmodésmicas en las células de este tejido son muy pequeñas, el virus se desplaza muy lentamente hacia el meristema. Esta característica morfológica, unida a la activa multiplicación celular que allí ocurre, puede explicar la baja concentración o ausencia del virus en ese tejido.

Otros autores sugieren que para la replicación de los virus se requiere de ciertas enzimas que están presentes en las células

cercanas a la cúpula meristemática. Al realizar el corte, el proceso de crecimiento se desorganiza temporalmente y no hay disponibilidad de aquellas enzimas necesarias para la síntesis viral. Al presentarse esta desorganización, el proceso de replicación se prolonga hasta que el ácido nucleico viral se degrada y posiblemente es utilizado por las células vegetales.

Medio de Cultivo

El medio de cultivo es específico para cada género, especie o variedad, aunque existen ciertos medios básicos que pueden ser utilizados en todas las plantas, como el de Murashige-Skoog. Este medio está constituido por nutrimentos inorgánicos (macro y micro nutrientes), una fuente de carbono (generalmente sucrosa), vitaminas y reguladores de crecimiento. Algunas de estas últimas sustancias son esenciales para la diferenciación de los tejidos de la planta. El pH debe ser ajustado entre 5,5 y 6,0.

Combinación de Termoterapia y Cultivo de Meristemas

Con la aplicación de termoterapia es difícil lograr la eliminación total de los patógenos, sobre todo con tratamientos cortos y temperaturas moderadas, por ello, la termoterapia puede ser utilizada en forma más adecuada para aumentar la efectividad de la técnica del cultivo de meristemas para el saneamiento o limpieza del material de propagación.

Quimioterapia

La utilización de productos químicos como el Ribavirin (Virazole) interfiere directamente con la replicación viral, al

atravesar lentamente la membrana celular y atacar al virus sin causar disturbios en el metabolismo celular; esto ocurre por inhibición de la enzima inosinamonofosfato dehidrogenasa, interfiriendo con la síntesis de nucleótidos de guanina, y por lo tanto con la biosíntesis de DNA viral.

PRODUCCION DE SEMILLA LIBRE DE VIRUS

Tres de las cinco variedades mejoradas de papa consideradas en el esquema de certificación, han sido saneadas mediante la aplicación de termoterapia y cultivo de meristemas, de esta manera se ha conseguido erradicar los siguientes virus y viroide:

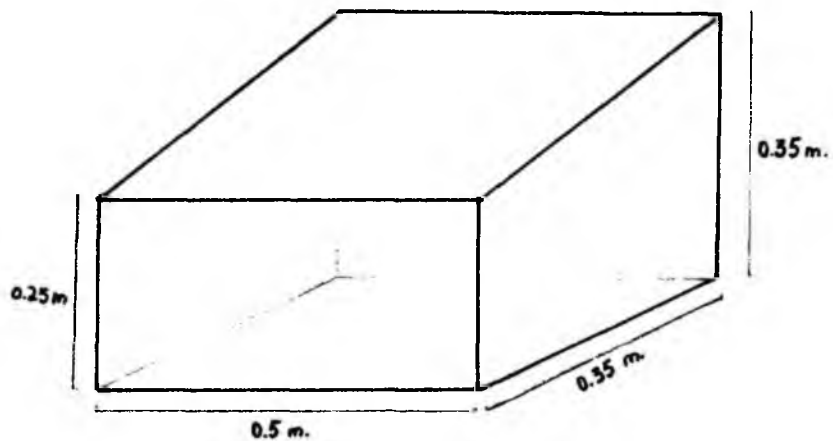
- PVX: Potato virus X / Virus del mosaico latente
- PVY: Potato virus Y / Virus del mosaico rugoso
- PVS: Potato virus S / Virus S de la papa
- APLV: Andean potato latent virus / Virus latente de la papa andina.
- APMV: Andean potato mottle virus / Virus del moteado de la papa andina.
- PLRV: Potato leafroll virus / Virus del enrollamiento de la hoja.
- PSTV: Potato spindle tuber viroid / Viroide del tubérculo ahusado de la papa.

Este material a más de ser mantenido in vitro en laboratorio, es micropropagado para proveer "plantas madres" que, manejadas adecuadamente en invernadero, generan gran cantidad de plantitas que son llevadas al campo.

La micropropagación consiste en propagar in vitro (en tubos de ensayo) nudos con su respectiva yema axilar, obtenidos de plantas bien desarrolladas, a medio de cultivo fresco, trabajo que puede ser llevado a cabo en una cámara de transferencia de flujo laminar, o en una cámara rústica, cuya construcción y utilización se detalla a continuación.

Micropropagación rústica

Cámara de transferencia



Construcción

- Madera de 5 cm de ancho x 2 cm espesor
- Completamente forrada de plástico
- La cara frontal debe tener el plástico enrollable, para levantarlo al trabajar.

Utilización

Esta cámara es práctica para llevar a cabo micropropagación, esto es multiplicación de plantas in vitro, segmentando plantitas extraídas de tubo de ensayo en sus respectivos nudos, y sembrándolos en tubos con medio de cultivo fresco.

Area de trabajo

La cámara debe estar ubicada en un sitio limpio, sin corrientes de aire, y durante su utilización debe mantenerse dicha área cerrada.

Materiales

- Cámara de aislamiento rústica
- Vidrio de 25 x 25 cm
- Agua y jabón
- Mechero de alcohol, fósforos
- Pinzas de aproximadamente 15 cm de largo
- Mango de bisturí y hoja No. 10 u 11
- Algodón o pedazo de tela
- Alcohol puro (para mechero)
- Alcohol 70% (para desinfección)
- Cloretol o Clorox o Legía o cualquier desinfectante comercial, en base de Hipoclorito de Sodio o Calcio.
- Marcador
- Parafilm
- Tubos con plantas a micropropagar
- Tubos con medio de cultivo fresco; con tapón de algodón, o papel periódico. Los tubos pueden tener las siguientes medidas:

<u>Largo (cm)</u>	<u>Diámetro (mm)</u>	<u>Volumen de Medio (cm³)</u>
10	12 o 14	2.5 a 3.0
12,5	16	3 a 4

Procedimiento

1. Lavarse bien las manos, 2 a 3 veces con jabón y abundante agua y desinfectarse con alcohol 70%.
2. Desinfectar muy bien todas las paredes del interior de la cámara y el vidrio ubicado en la superficie de trabajo, con un algodón o pedazo de tela empapado en alcohol 70%. Bajar el plástico de la parte frontal y dejar 10 minutos.
3. Subir el plástico frontal y desinfectar muy bien con un algodón o pedazo de tela empapado en cloretol, Clorox o Legía, o cualquier desinfectante comercial en base a Hipoclorito de Sodio o Calcio. Bajar el plástico y dejar así cerrado durante 5 minutos.
4. Subir el plástico y desinfectar nuevamente con alcohol 70% y dejar cerrado otros cinco minutos.

Es necesario desinfectarse constantemente las manos antes de cada paso, previo a introducir las manos en la cámara.

5. Desinfectar las pinzas y el bisturí con alcohol 70%, y flamear en el mechero durante 1 minuto, introducirlos en la cámara, sobre el vidrio y dejarlos enfriar. Introducir el tubo con la planta a micropropagar y los tubos necesarios de acuerdo al número de nudos (5-6), un nudo por tubo.

6. Sacar el tapón y con las pinzas extraer la plantita y depositarla sobre el vidrio, con el bisturí eliminar el medio y las raíces y segmentar la plantita en sus respectivos nudos, no mayores a 5 mm. Si las hojas de los nudos son grandes, eliminarlos sin dañar la yema que se encuentra en la base de las mismas. Se debe procurar trabajar en la parte más interior de la cámara.
7. Sembrar los nudos en los tubos con medio fresco, un nudo por cada tubo, el nudo debe ser depositado longitudinalmente y ligeramente hundido en el medio. Tapar el tubo con su respectivo tapón.

Es necesario efectuar estos dos pasos de la manera más rápida posible para tener menor número de tubos contaminados.

8. Sacar los tubos fuera de la cámara, sellarlos con papel de parafina (Parafilm) o ajustarlos con liga o hilo si el tapón es de papel. Rotular con la respectiva identificación y fecha.
9. Desinfectar y flamear pinzas y bisturí nuevamente, fuera de la cámara, al igual que el interior de la cámara, sobre todo la superficie de trabajo y proceder entonces como el paso 6.
10. Colocar los tubos en un sitio limpio con abundante luz, de preferencia junto a una ventana, evitar la incidencia directa de la luz del sol.

Si se trabaja con el suficiente cuidado y rapidez, se tiene porcentajes bajos de contaminación, inclusive tan bajos como los que se alcanzan con cámaras de aislamiento de flujo laminar.

Multiplicación rápida

Las técnicas de multiplicación rápida de papa son procedimientos de propagación vegetativa que se utilizan para obtener en forma acelerada, un incremento de tubérculos-semilla de papa, así, un tubérculo o una planta se multiplican en 50, 100, 1.000 o más plantas. Para ello se utilizan partes vegetativas tales como porciones de tubérculos, tallos apicales, tallos laterales, tallos de plantas juveniles, tallos adultos, brotes y tejidos meristemáticos.

Las principales técnicas de propagación rápida de papa que han sido desarrolladas por el CIP, y probadas en el INIAP son:

- Esquejes de brote
- Esquejes de tallo juvenil
- Esquejes de tallo lateral
- Esquejes de tallo adulto

Esquejes de brote

Mediante esta técnica se consigue el máximo aprovechamiento de los brotes de tubérculos.

A un tubérculo brotado se somete a períodos de oscuridad y luz indirecta, hasta cuando los brotes alargados y vigorosos alcanzan un tamaño de 2 a 3 cm, tamaño en el cual se elimina el ápice, lo que promueve la ramificación de los brotes principales. Este trabajo se realiza con una cuchilla o navaja desinfectada.

Una vez cortado el ápice, se sumerge los tubérculos en una solución de ácido giberélico 1 o 2 ppm, durante 5 a 10 minutos.

Estos dos pasos: corte del ápice y tratamiento con ácido giberélico, son recomendables pero no imprescindibles. Al tubérculo así tratado se lo somete nuevamente a períodos de oscuridad y luz indirecta.

Cuando se ha obtenido brotes ramificados, alargados y vigorosos, se desbrota el tubérculo y se segmenta los brotes con una navaja o una cuchilla desinfectada. Estos esquejes de brote de 0,5 a 1 cm de longitud deben tener por lo menos un rudimento caulinar y dos rudimentos radiculares que darán origen al tallo y raíces respectivamente.

Al tubérculo se lo coloca nuevamente en oscuridad y luz indirecta, para obtener nuevas cosechas y reiniciar el ciclo de propagación.

Los esquejes de brote son plantados en un sustrato arenoso, de 0,5 a 1 mm de tamaño de grano; al momento de colocar el esqueje el rudimento caulinar debe estar a ras de la superficie de la arena, y presionado ligeramente alrededor. Después de 15 a 20 días aproximadamente, se obtiene una plántula con sus tallos y raíces, pudiendo ser trasplantada a campo o invernadero, debiendo tenerse gran cuidado hasta cuando se establezca bien.

Esquejes de tallo juvenil

Esta técnica se aplica en plantas inmaduras, cuando éstas tienen de 5 a 6 hojas simples, estado en que se procede a cortar el tallo a aproximadamente 2 mm sobre la hoja basal. El tallo así cortado es seccionado en porciones con una hoja y su respectiva yema axilar. Después de cada cosecha se fertiliza la planta madre con un fertilizante soluble en agua, por ejemplo Lonzin 20-20-20, o alguno similar, 4-5 gramos por litro, 50 a 100 cm³ por maceta de 8 x 8 cm.

Para asegurar un enraizamiento de esquejes uniforme y rápido, se usa una hormona de enraizamiento, poniendo en contacto el esqueje con dicha hormona, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego son plantados en un sustrato arenoso de 0,5 a 1 mm de tamaño de grano, presionados con la yema axilar bajo la superficie de la arena. El enraizamiento toma entre 15 y 20 días.

Al trasplantar a campo deben ser removidos cuidadosamente, sin dañar las raíces ni eliminar el sustrato húmedo adherido a ellas, a un distanciamiento de 15 a 20 cm entre plantas y 60 a 80 cm entre surcos o distancias menores en un suelo orgánico bien preparado. También pueden ser trasplantados a macetas, para aplicar a dichas plantas otra técnica de propagación acelerada.

Esquejes de tallo lateral

Para esta técnica se requieren plantas de 30 a 40 cm de altura, se elimina el ápice de todos los tallos, rompiendo de esta manera la dominancia de crecimiento apical y se promueve el crecimiento de tallos laterales, los mismos que son cosechados cuando alcanzan 12-15 cm, efectuando un corte cercano a la base, sin dañar la yema basal que dará origen a nuevos esquejes. Este procedimiento se realiza con una navaja o cuchilla bien desinfectada.

Luego de cada cosecha de esquejes se debe fertilizar la planta madre con un fertilizante similar al señalado, 100 a 200 cm³ pormaceta de 20 x 20 cm.

Los esquejes cosechados son puestos en contacto con una solución hormonal de enraizamiento, en su parte basal, aunque no es imprescindible efectuar este paso. Luego son plantados en un

sustrato arenoso, o en "pomina" (material utilizado para la fabricación de bloques para construcción), profundizando la base 4 a 5 cm. Los riegos deben ser ligeros y contínuos. El enraizamiento toma de 15 a 20 días, transcurridos los cuales, son cuidadosamente removidos manteniendo adherido el sustrato húmedo a las raíces y luego trasplantados.

En el campo se debe tener mucho cuidado especialmente en lo que se refiere a riegos, sobre todo el primer mes, hasta que los esquejes estén bien establecidos.

Igualmente pueden ser trasplantados a macetas, para obtener plantas madres y aplicar otra técnica de propagación acelerada.

Esquejes de tallo adulto

En esta técnica se utilizan plantas que han iniciado la maduración hasta plantas que tienen tubérculos maduros, plantas que generalmente tienen las hojas basales amarillas. Estos tallos adultos son seccionados en esquejes, cada uno con una pequeña porción de tallo, una hoja y su respectiva yema adyacente.

Los esquejes son plantados en un sustrato arenoso de 0,5 a 1,5 mm de tamaño de grano, con la yema bajo la superficie del sustrato y la hoja encima de éste. Los riegos deben ser ligeros y frecuentes. De esta manera, a partir de la yema se desarrolla un tuberculillo, en 3 a 6 semanas, conforme van secándose las hojas.

Los tuberculillos producidos tienen un tamaño de 0,5 a 2 cm de diámetro, pudiendo ser almacenados a 6 grados centígrados, hasta su brotamiento, o hacerlos brotar con productos químicos. Luego son sembrados directamente en el campo a una profundidad no mayor de 10 cm, en suelo bien preparado y ligeramente húmedo.

También pueden ser sembrados en macetas en invernadero, 3 a 4 por maceta de 20 x 20 cm, a 5 cm de profundidad, para producir plantas y aplicar alguna de las técnicas de multiplicación acelerada.

Esquejes de tallo secundario

En base a la aplicación de las técnicas de tallo juvenil y tallo lateral, en INIAP se ha desarrollado una modificación de las mismas, la cual es utilizada rutinariamente que ha arrojado índices de multiplicación más elevados que los obtenidos con dichas técnicas, con menor uso de espacio y mayor tiempo y aprovechamiento de las plantas.

Las plantas provenientes de laboratorio, o esquejes vigorosos bien enraizados son plantados en macetas de 15 x 15 cm, 3 a 4 tallos o esquejes por maceta. Cuando los tallos alcanzan 15 a 20 cm son cosechados sobre la 3ra. o 4ta. yema y plantados para enraizamiento.

Debido al reducido volumen de la maceta, a la fertilización y a que no se realizan aporques, las variedades con las que se trabaja producen paulatimamente gran cantidad de tallos secundarios, que son sucesivamente cosechados, cada 8-10 días, cuando alcanzan 10-15 cm de largo.

Los tallos cosechados son manejados de manera similar a los esquejes de tallo lateral.

Con esta técnica se ha logrado producir cerca de 6.000 esquejes por m² de invernadero, en 6 - 8 meses de cosechas continuas. Este procedimiento se encuentra en fase de evaluación.

Propagación acelerada tipo Vietnam

En Vietnam, en base a materiales in vitro proporcionado por el CIP, se han conseguido volúmenes elevados de semilla de alta calidad, aplicando micropropagación rústica y sometiendo a las plantitas a un sistema de multiplicación rápida desarrollado en dicho país, en base a las disponibilidades de materiales, mano de obra, etc. Este modelo permite un máximo aprovechamiento de las plantitas generadas in vitro.

Las plantitas son extraídas del tubo de ensayo y segmentadas en sus respectivos nudos. Estos nudos son sembrados en un sustrato preparado, mezclando 20% de arena, 20% de musgo y 30% de tierra en volumen. Si se utiliza suelo profundo obtenido a aproximadamente 2 m de profundidad, no es necesario desinfectarlo.

Los nudos con su hoja se siembran a 2 cm de distancia, en cuadro y se coloca una cubierta sobre la cama, para evitar excesiva luminosidad. Es importante que los riegos sean constantes y ligeros, hechos con una regadera de agujeros finos para evitar que la fuerza del agua dañe o mueva los pequeños nudos. Se debe fertilizar semanalmente con un fertilizante soluble, en dosis de 2-3 gr/litro.

La primera cosecha de esquejes se efectúa a los 20-25 días, cuando las plantitas crecidas a partir de las yemas de los nudos alcanzan 2-3 hojas simples. Los esquejes así cosechados son plantados en un sustrato similar al de la cama, en vitabandas de 5 cm de diámetro por 10 cm de largo. Se fertiliza semanalmente con igual dosis a la utilizada en la cama y al cabo de 25-30 días se obtendrán plantitas vigorosas, perfectamente enraizadas, listas para ser trasplantadas a campo.

Se obtienen cosechas de esquejes cada 10-15 días aproximadamente, lo cual da elevados índices de multiplicación en pequeñas superficies.

Determinación de la sanidad

En el Instituto durante todo el proceso a nivel de laboratorio, invernadero y campo, se efectúa la determinación de la sanidad del material mediante pruebas de serología, especialmente la prueba de Látex Sensibilizado con anticuerpos, garantizándose de esta manera la calidad de la semilla.

CONCLUSIONES

El manejo del material in vitro garantiza la sanidad óptima del material y paralelamente a la conservación de un stock en laboratorio, se genera un gran número de plantitas.

La aplicación de técnicas de propagación rápida ha permitido obtener en corto tiempo, un gran volumen de semilla, de óptima calidad, pudiendo preverse a corto plazo incrementos significativos en la producción de semilla certificada en lo que a volumen y calidad se refiere, lo cual se verá reflejado en el aumento de rendimiento por unidad de superficie.

LITERATURA CONSULTADA

1. CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. 1982. Técnicas de multiplicación rápida de papa. Guía de Rotafolio Didáctico. Lima, Perú. 20 p.
2. DE LA ROTTA, M.C. y MARTINEZ, E. 1982. El saneamiento de las plantas mediante el uso de meristemas, quimioterapia y termoterapia. Curso Intensivo de Propagación de Papa y Yuca por Cultivo de Meristemas y otras Técnicas. Cali. CIAT. 14 p.
3. ESTRELLA, D. Producción de semilla certificada de papa en el Ecuador. In Reunión de la Asociación Latinoamericana de Papa. 12ava. Bogotá, Mayo 20-25, 1984. Memorias. Bogotá, 1984. pp. 131-138.
4. HOOKER, W.J. 1980. Compendio de enfermedades de la papa. Traducido del Inglés por Teresa Ames de Icochea. Lima, Centro Internacional de la Papa. pp. 95-125.