



La Red de Papa PRACIPA—PROCIANDINO, es una asociación para la investigación, capacitación y transferencia horizontal de tecnología, constituida por acuerdo entre las instituciones responsables de la investigación agrícola de Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela, y el Centro Internacional de la Papa (CIP).

Los recursos financieros para la ejecución del proyecto “Sistema de Multiplicación Rápida de Semilla de Papa Libre de Virus”, comprendieron los aportes del INIAP y del Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID-Canadá).

P R E S E N T A C I O N

El presente Boletín Técnico constituye una compilación de un largo proceso investigativo de aprendizaje, adaptación y evaluación de múltiples posibilidades tecnológicas que ofrecen las Técnicas de Cultivo de Tejidos y Multiplicación Acelerada, orientada hacia la producción de tubérculo-semilla de papa de alta calidad sanitaria.

Este proceso desde su inicio estuvo orientado hacia la calidad sanitaria de los tubérculos-semillas que el INIAP venía produciendo hasta fines de la década de los setenta. Su evolución exitosa influyó inclusive para innovar las primeras etapas del antiguo esquema de Certificación de semilla de papa que regía en el Ecuador.

El Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP, tuvo el apoyo por parte del Centro Internacional de la Papa (CIP), para implementar un sistema que eleve la calidad sanitaria de este insumo. Es así como durante 1981 se construyeron un pequeño laboratorio y dos invernaderos para cultivo de tejidos en la Estación Experimental "Santa Catalina", en donde se dieron los primeros pasos en cultivo de tejidos, evaluaciones serológicas, obtención de plantas madres y corte de esquejes. Estas actividades siguieron un proceso dinámico de aprendizaje-enseñanza, complementadas mediante distintos eventos de capacitación interna y externa.

Desde entonces se ha desplegado muchos esfuerzos y sacrificios para pasar de aquello que nació como una ilusión esperanzadora de una nueva alternativa tecnológica a lo que hoy es una rutina promisorio de trabajo.

Este documento plasma todo ese esfuerzo en la tecnología que a continuación se describe. Pero antes, es de justicia relatar a todos quienes ayer participaron y hoy están colaborando en el surgimiento y en el funcionamiento, respectivamente, de lo que actualmente es la Unidad de Cultivo de Tejidos de la Estación Experimental "Santa Catalina" del INIAP.

Técnicos CIP: Oscar Malamud, Oscar Hidalgo, Lieselotte Schilde, Jym Bryan, John Dodds.

Técnicos INIAP: Francisco Muñoz, René Castillo, Diego Estrella, Héctor Andrade, Jenny Huachi, Hernán Naranjo, Milton Sola, Gioconda García.

Proyectos de Apoyo: El PRACIPA ha jugado un rol decisivo para la implementación y funcionamiento del laboratorio e invernaderos. Su aporte ha sido integral en infraestructura, equipos y materiales, capacitación interna y externa para técnicos, estudiantes y productores, tesis de grado y otras actividades adicionales. Actualmente el PRACIPA comparte su apoyo con el proyecto FORTIPAPA, los cuales, entre otras tareas, asisten a la Unidad de Cultivo de Tejidos para mantener su alta eficiencia y productividad en la producción de semilla pre-básica y básica de papa.

Iván Reinoso R.
Coordinador PRACIPA-Ecuador

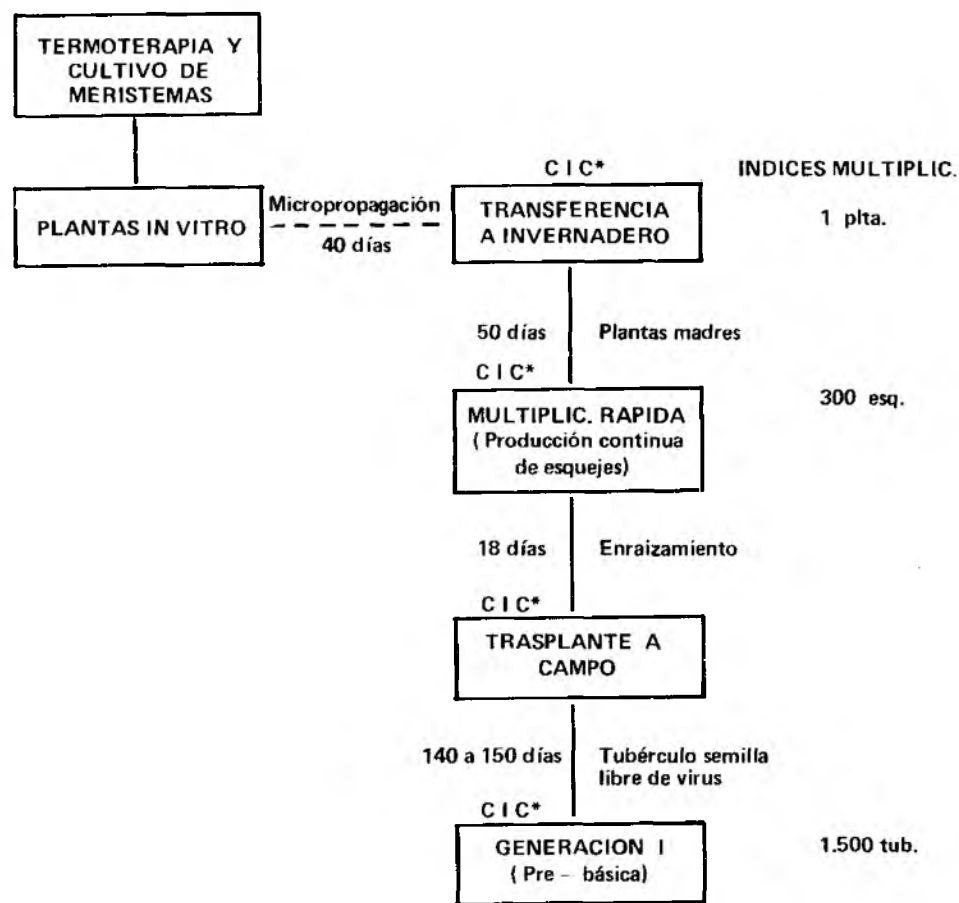
INTRODUCCION

La papa es un cultivo que en general se propaga en forma vegetativa, lo que constituye una ventaja porque mantiene las características varietales por generaciones sucesivas. Sin embargo, los tubérculos-semillas son también un medio de transporte y diseminación de enfermedades sistémicas que, como en el caso de virus, causan pérdidas en la calidad sanitaria del tubérculo y descensos algunas veces dramáticos en la producción. Igualmente la propagación vegetativa presenta bajos índices de multiplicación del cultivo (1:10).

En la actualidad, mediante Termoterapia y Cultivo de Meristemas, es posible erradicar este tipo de enfermedades que los métodos convencionales no lo han conseguido. La propagación acelerada en cambio permite incrementar significativamente los índices de multiplicación (1:10 a 1:1000), revolucionando de esta manera los esquemas convencionales de certificación de semillas.

El INIAP luego de haber evaluado las técnicas de Cultivo de Tejidos y Multiplicación Acelerada, ha desarrollado un método eficaz, mediante el cual se han incrementado los volúmenes de producción manteniendo al mismo tiempo la calidad sanitaria del material. Se parte de plantas indexadas, las que son multiplicadas a nivel de laboratorio e invernadero en condiciones tales de manejo que impiden la recontaminación. Posteriormente, en campo y almacenamiento se mantiene un estricto calendario de chequeos serológicos como estrategia de control interno de calidad (Figura 1).

FIGURA 1. SECUENCIA DE PRODUCCION DE SEMILLA DE PAPA CON ALTA CALIDAD SANITARIA



* Control Interno de Calidad

LOS VIRUS Y SU CONTROL

Al momento se conocen alrededor de 25 virus y un viroide que se encuentran afectando al cultivo de papa; aunque no son letales, disminuyen sensiblemente la producción y la calidad sanitaria del tubérculo.

En Ecuador, la diseminación de virus es amplia, se los ha encontrado hasta en zonas de 3.400 msnm y se ha comprobado que cuando los virus provocan infecciones sistémicas en la planta, se propagan fácilmente hacia el tubérculo y de éste, hacia la planta que emerge posteriormente. En caso de que las infecciones virosas sean continuas (varias generaciones), se provoca la "degeneración de la papa" (Estrella, 1987; Moreno, 1988, Pumisacho, 1988).

Las pérdidas causadas por los virus que atacan al cultivo de papa son cuantitativos (reducción del rendimiento) y cualitativos (reducción del valor comercial). El tipo y severidad de las pérdidas depende de la variedad, de las condiciones ambientales y de los virus; así, algunos virus como PVX, PVY y PVM, pueden reducir los rendimientos del 5 al 40%, en tanto que otros como el virus del enrollamiento de las hojas (PLRV) o infecciones combinadas de PVX y PVY, causan pérdidas hasta del 90% (Salazar, 1982).

En el proceso de producción de semilla libre de virus se debe ejercer un control estricto de los virus más difundidos y severos. En el caso del Ecuador, se indexa para los siguientes virus (Enriquez, 1982):

- AMV: Virus del amarillamiento de venas
- PVX: Virus del mosaico latente
- PVY: Virus del mosaico rugoso
- PVS: Virus S de la papa
- APLV: Virus latente de la papa andina
- PLRV: Virus del enrollamiento de la hoja

Los virus pueden causar diferentes síntomas en las hojas, tallos y tubérculos provocando a la vez una reducción del vigor de las plantas y consecuentemente la reducción del rendimiento. Aunque las enfermedades virosas son en pocos casos de carácter letal, eliminan las posibilidades de utilizar como semilla el tubérculo infectado. (Hooker, 1980).

La eliminación de estos patógenos mediante métodos convencionales es imposible, por lo que es necesario recurrir a la aplicación de técnicas como Termoterapia y Cultivo de Meristemas. De esta forma se pueden obtener “plantas libres de virus” a partir de plantas infectadas (Figura 2).

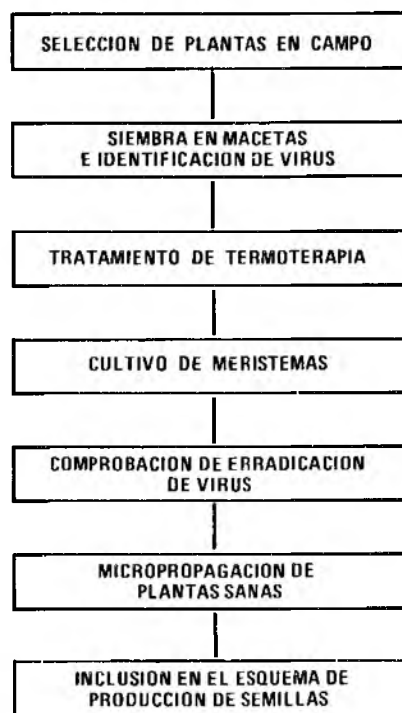
El procedimiento se basa en el hecho de que la distribución del virus dentro de la planta es desuniforme, con una tendencia a disminuir su concentración en las áreas meristemáticas. Por lo tanto, al cortar y cultivar los meristemas es posible obtener plantas sanas.

Para asegurar la obtención de una planta libre de virus, es necesario cortar el meristema con un mínimo de primordios foliares, y un tamaño que puede oscilar entre 0,1 a 0,5 mm. Hay que tomar en cuenta que existe una relación inversa entre el tamaño del explante extraído y la eficiencia de erradicación del virus.

Existen virus como PVS que no pueden ser eliminados con el solo uso del cultivo de meristemas; es necesario recurrir a técnicas complementarias como termoterapia y quimioterapia.

La verificación de eliminación de los virus se puede realizar mediante diferentes técnicas como: pruebas serológicas, electroforesis, microscopía electrónica, plantas indicadoras. De todas las enunciadas, las mas factibles de usar por no demandar equipos sofisticados son serología y plantas indicadoras.

FIGURA 2. SANEAMIENTO DE PLANTAS ENFERMAS CON VIRUS



TECNICAS PARA LA MULTIPLICACION DE SEMILLA DE PAPA

A. MICROPROPAGACION

Al obtener una planta libre de virus se la somete a micropropagación mediante la incisión de nudos de plantas desarrolladas en un medio de cultivo provenientes de la siembra de meristemas, generando de esta manera un número suficiente de plantas que luego serán utilizadas como plantas madres (Estrella 1985).

Esta técnica permite multiplicar masivamente, en lapsos reducidos de tiempo, plantas de papa libres de virus partiendo de un stock de plantas de sanidad probada. Para este objetivo se utilizan generalmente segmentos muy pequeños de las plantas *in vitro*, constituidos por un nudo con su yema axilar. Estos a su vez deben ser subcultivados en medios frescos de cultivo. (Figura 3).



FIGURA 3.
Corte de nudos



Los índices de multiplicación que se pueden alcanzar en papa tienen una progresión geométrica. De cada plantita *in vitro* se pueden obtener los nudos para generar nuevas plántulas, de las cuales a su vez se pueden extraer nuevos nudos para una siguiente propagación. En condiciones de laboratorio, en un año pueden llegar a producirse teóricamente varios millones de plantitas. De esta manera se puede garantizar una provisión permanente y oportuna de plantas *in vitro* de óptima calidad sanitaria de acuerdo a las necesidades.

Los medios de cultivo utilizados para el manejo de meristemas y micropropagación de papa, están constituidos principalmente de:

- a. Sales basales de Murashige y Skoog (1962)
- b. Vitaminas
- c. Reguladores de crecimiento
- d. Sucrosa
- e. Agar

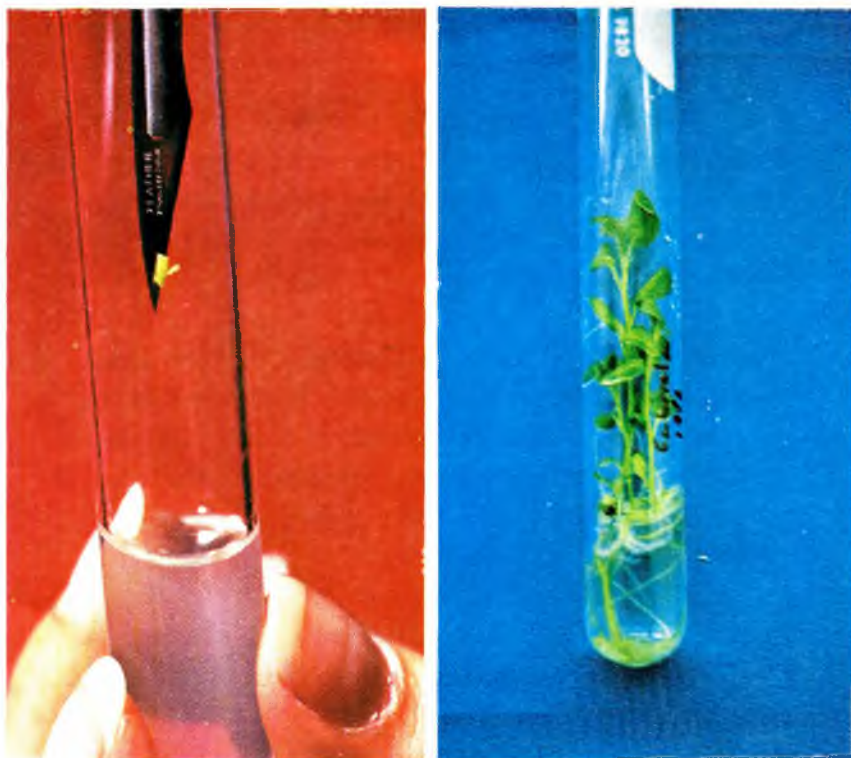


FIGURA 3. Siembra de nudos **FIGURA 3. Plantas libres de virus**

B. MULTIPLICACION ACELERADA

En las técnicas de propagación vegetativa acelerada se aprovecha al máximo tanto el área foliar como los tubérculos. El propósito es alcanzar altos índices de multiplicación, conservando la calidad sanitaria del material generado. Se han desarrollado varios métodos de propagación, que pueden utilizarse en forma individual o integrada (Bryan, 1982).

Estos métodos son:

Esquejes de brote

A un tubérculo brotado se lo somete a períodos de obscuridad y luz indirecta, hasta cuando los brotes alcanzan un tamaño de dos a tres centímetros, luego se elimina el ápice, lo que promueve la ramificación de los brotes principales.

Una vez cortado el ápice se sumergen los tubérculos en una solución de ácido giberélico y nuevamente se los somete a períodos de obscuridad y luz indirecta. Cuando se han obtenido brotes ramificados, alargados y vigorosos se desbrota el tubérculo y se segmentan los brotes.

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

Los esquejes de brotes son colocados en un sustrato arenoso y después de 15 a 20 días aproximadamente se obtiene una planta con sus tallos y raíces que puede ser trasplantada a campo o invernadero (INIAP *et al*, 1986).

Esquejes de tallo adulto

En esta técnica se utilizan plantas que han iniciado la maduración hasta plantas que tienen tubérculos maduros. Los tallos adultos son seccionados en esquejes

cada uno con una pequeña porción de tallo, una hoja y su yema adyacente. Los esquejes son plantados en un sustrato arenoso con una yema bajo el sustrato y la hoja encima de éste. A partir de la yema se desarrolla un tuberculillo en tres a seis semanas.

Los tuberculillos deben ser sembrados en macetas en invernadero para producir plantas y aplicar alguna de las técnicas de multiplicación acelerada (INIAP *et al*, 1986).

Esquejes de tallo juvenil

Esta técnica se aplica en plantas inmaduras, estado en el que se procede a cortar el tallo sobre la hoja basal. El tallo así cortado es seccionado en porciones con una hoja y su yema axilar. Los esquejes son colocados en un sustrato arenoso para lograr su enraizamiento a los 15 ó 20 días (INIAP *et al*, 1986).

Esquejes de tallo lateral

Para esta técnica se requieren plantas de 30–40 cm. de altura. Se elimina el ápice de todos los tallos, promoviendo de esta forma el crecimiento de tallos laterales; estos son cosechados cuando alcanzan 12 a 15 cm. los cuales darán origen a nuevos esquejes. El enraizamiento de estos esquejes se realiza en un sustrato arenoso, entre 15 a 20 días.

Cada uno de estos métodos han mostrado ser eficientes; sin embargo, los índices de multiplicación pueden variar

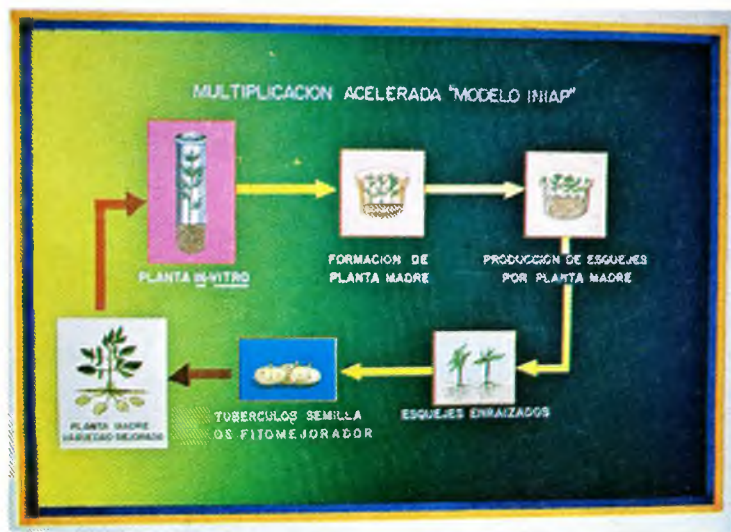
según la variedad de papa, y los recursos físicos disponibles (INIAP *et al*, 1986).

En el caso de variedades ecuatorianas que pertenecen a la subespecie *andigenum*, debido a su hábito de crecimiento, el método con el cual se ha conseguido el mayor índice de multiplicación es el de esquejes de tallo secundario o Modelo INIAP *, que es una técnica intermedia de tallo juvenil y lateral.

Los esquejes obtenidos son enraizados a nivel de invernadero y posteriormente trasplantados directamente al campo.

Con el Modelo INIAP (Figura 4), a partir de una planta madre, se puede obtener de 200 a 300 esquejes; cada esqueje produce alrededor de cinco tubérculos. En 10 meses, con las precauciones del caso, de una planta madre proveniente de cultivo *in vitro* se obtendrá 1.000 a 1.500 tubérculos-semillas de óptima calidad (Enriquez, 1982).

* Boletín de Información Técnica No. 194



**FIGURA 4. Multiplicación acelerada de esquejes
"Modelo INIAP"**

C. MULTIPLICACION EN CAMAS

La producción de minitubérculos en camas presenta las siguientes ventajas y desventajas:

Ventajas

- Optimizar el espacio físico del invernadero.
- Es recomendable cuando no se tiene suficiente mano de obra.
- Es una buena alternativa cuando se quiere mecanizar el manejo del cultivo desde la producción de semilla pre-básica.

Adaptado del Boletín Divulgativo No. 194

- Cuando las condiciones a nivel de campo no son ideales para el trasplante de esquejes.
- Cuando la variedad no responde adecuadamente a otros métodos de multiplicación.

Desventajas

- Se requiere de infraestructura adecuada.
- El manejo en invernadero demanda contratar personal técnico especializado.
- Únicamente se pueden llevar a campo los minitubérculos que tengan un peso mayor a cinco gramos.

Al emplear plantas *in vitro*, se recomienda una densidad de siembra de 50 pl/m², con lo que se obtiene un total de 380 a 400 minitubérculos; de los cuales, alrededor de 200 tienen un peso entre 3 y 40 g y pueden sembrarse directamente en el campo; y 150 a 160 minitubérculos (menores de 3 g) que deben volver a ser resembrados en camas en el segundo ciclo (Benítez 1988). (Figura 5).

El sustrato que se usa en las camas para la siembra de plantas *in vitro* se prepara mediante la mezcla, en proporción de 5:1, de suelo rico en materia orgánica y de arena. Se lo desinfecta e incorpora 60 g/m² de fertilizante completo. Inmediatamente después de la siembra, se recomienda aplicar una solución de fertilizante foliar con alto contenido de Nitrógeno y Fósforo y cubrir por 8 días con sacos, paja o cualquier material que produzca sombra con la finalidad

de crear un microclima adecuado para favorecer el prendimiento de las plantas.

Para la obtención de minitubérculos en camas se puede partir de plantas *in vitro*, esquejes o minitubérculos obtenidos en macetas al concluir el ciclo de las plantas madres.

También pueden dar origen a minitubérculos, los microtubérculos que son producidos a nivel de laboratorio en medios de cultivo específicos para este fin al ser sembrados en camas de producción.

Se debe mantener las condiciones sanitarias realizando controles de vectores y comprobar mediante pruebas serológicas la sanidad del material durante todo el ciclo de producción de minitubérculos.



FIGURA 5. Siembra en camas para multiplicación de semilla

MANEJO DE ESQUEJES EN EL CAMPO

Selección del lote

El lote destinado a la siembra de esquejes debe tener las mejores condiciones físicas, químicas y microbiológicas, con la finalidad de disminuir riesgos de pérdidas y de contaminación, ya que el valor biológico y económico de los esquejes así lo exige.



FIGURA 6. Transplante

Los siguientes criterios deben tomarse en cuenta para la selección del lote:

- Estar aislado por lo menos 50 m. de otros lotes de papa.
- Tener una rotación de por lo menos 2 años.
- Fertilidad uniforme, pH ligeramente ácido a ácido, textura franco arenosa y estructura granular.
- Relativamente cercano al centro de producción de esquejes.
- Con posibilidad de riego.

Trasplante

El trasplante de esquejes al campo debe ser en suelo muy bien preparado, con adecuada humedad y fertilización, con un distanciamiento entre surcos de 1,10 m. y entre plantas de 0,10 m. En los primeros 30 días el riego debe realizarse con la frecuencia necesaria para mantener una humedad que garantice el máximo prendimiento (Figura 6).

Es importante hacer dos pequeños aporques tempranos para favorecer la tuberización y evitar la formación de muchos tallos secundarios; así mismo el control de vectores debe ser oportuno para evitar cualquier reinfección.

FIGURA 6.
Evolución del
cultivo



CONTROL INTERNO DE CALIDAD

El control interno de calidad comprende una serie de actividades sistemáticas y continuas que, junto con actitudes de comportamiento positivo, posibilitan la toma de decisiones gerenciales de carácter preventivo y correctivo, para lograr un tubérculo-semilla de alta calidad que satisfaga la demanda.

Para realizar el control interno de calidad debe tomarse en cuenta la calidad genética, sanitaria, fisiológica y física del material, sea en invernadero, en campo o durante el almacenamiento.

La calidad genética se determina a través de la manifestación auténtica de las características propias de la variedad analizada. En este sentido, es muy importante que los técnicos encargados del control de calidad sepan distinguir y diferenciar muy bien las características de todas las variedades en uso.

La calidad sanitaria se refiere a que el tubérculo-semilla debe estar libre de plagas y enfermedades. Para la detección de virus (PVX, PVS, PVY, PLRV, APMV) se realizan pruebas serológicas, como ELISA. Las pruebas serológicas se complementan con el descarte de plantas que presenten síntomas de virosis. En todo caso, cualquier prueba que se utilice se la debe realizar oportunamente, antes de que la planta infectada se transforme en un foco de diseminación.

La calidad física comprende la uniformidad del tubérculo complementada con la calidad fisiológica (brotes vigorosos) alcanzada durante el almacenamiento.

El procedimiento para el control interno de calidad sanitaria es el siguiente:

a) Laboratorio:

El control de calidad se aplica a las plantas *in vitro*. Se puede escoger una muestra al azar de 5 al 10^o/o de ellas. El chequeo debe realizarse antes de iniciar la micropropagación del material.

El número de muestras para las determinaciones serológicas varía de acuerdo a la generación, la cantidad de material, al riesgo de contaminación y disponibilidad de antiseros y recursos.

b) Invernadero:

Si se trata de plantas madres sometidas a multiplicación acelerada, se realizarán por lo menos 3 determinaciones durante el ciclo: la primera del 100^o/o de plantas antes de iniciar la cosecha de esquejes, y las dos restantes de muestras tomadas al azar de aproximadamente el 30^o/o de las plantas a intervalos de 2 meses.

En camas de multiplicación se realizan dos determinaciones, del 50^o/o de plantas: a los 30 y 90 días después de la siembra.

c) Campo:

Según la generación, se recomienda:

- Generación I o pre-básica, chequear el 25^o/o de plantas.
- Generación II o básica, 500 plantas por ha.
- Generación III o Registrada, 50 plantas por ha.

d) Almacenamiento

- Generación I o pre-básica: 40 tubérculos por tonelada de semilla.
- Generación II o básica: 10 tubérculos por tonelada de semilla.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. *Benítez, J.* Siembra en tres densidades, de plantas *in vitro*, esquejes y tubérculos en dos variedades mejoradas de papa "Santa Catalina"—INIAP. Tesis Ing. Agr. Universidad Central, Facultad de Ciencias Agrícolas. Quito, Ecuador. 1988. 90 p.
2. *Bryan, J., M. Jackson y N. Melendez.* Técnicas de multiplicación rápida. Lima, Centro Internacional de la Papa. 1982. 20 p. (Serie de diapositivas didácticas).
3. *Enríquez, E.* Evaluación de tres técnicas de propagación acelerada en dos variedades mejoradas de papa. Tesis Lic. Biol. Universidad Central, Facultad de Filosofía, Letras y Ciencias, Escuela de Biología, Quito, Ecuador. 1982. 82 p.
4. ———, Esquema de producción de semilla certificada de papa en el Ecuador. Lima, Centro Internacional de la Papa. 1987. 27 p.
5. *Estrella, D.* Comparación de cinco métodos para erradicación de virus de papa. Tesis Ing. Agr. Universidad Central. Facultad de Ciencias Agrícolas. Quito, Ecuador. 1985. 93 p.

6. *Hooker, W.* Enfermedades virosas de la papa. Centro Internacional de la Papa. Boletín de Información Técnica No. 19. Lima, Perú. 1982. 20 p.
7. *INIAP, CIP, PRACIPA.* Memorias del Cuarto Curso sobre Tecnología de Cultivo y Manejo de Semilla de papa. Enero 15–17, 1986. Estación Experimental Santa Catalina. Quito, Ecuador.
8. *Moreno, J.* Evaluación Agroeconómica de dos categorías de semillas en tres variedades mejoradas de papa en dos localidades de la provincia de Pichincha. Tesis Ing. Agr. Universidad Central, Facultad de Ciencias Agrícolas. Quito, Ecuador. 1988. 181 p.
9. *Muñoz, F.* Modelo ecuatoriano sobre producción de semilla de papa. *In:* Seminario—Taller sobre estrategias para desarrollar un plan de producción y mercadeo de semilla de papa en Ecuador. Quito, noviembre 5–7, 1984. Memorias. Quito, INIAP—CIP. 1984. pp 17–20.
10. *Naranjo, H.; Estrella, D.* “Modelo INIAP” una Técnica de multiplicación rápida de papa. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Boletín Divulgativo No. 194. Quito, Ecuador. 1987. 12 p.

11. *Pumisacho, M.* Evaluación Agroeconómica de cuatro categorías de semilla libre de virus en dos variedades de papa en Pichincha. Tesis Ing. Agr. Universidad Central, Facultad de Ciencias Agrícolas. Quito, Ecuador. 1988. 146 p.
12. *Salazar, L. F.* Detección de virus en la producción de semilla de papa. Centro Internacional de la Papa. Boletín de información técnica No. 18: 14. 1982.

El INIAP es la entidad oficial de investigación científica agropecuaria, cuya misión es generar y adaptar tecnologías apropiadas encaminadas al mejoramiento de la productividad, propiciando la producción con sentido económico y la sostenibilidad de los recursos naturales.

PRODUCCION:
SECC. DE COMUNICACION DEL INIAP
Casilla 17-01-340 — Quito - Ecuador
Boletín Técnico No. 73
Julio—1993
Ejemplares: 2.000
AdeR.