

# Capítulo 19

## **Cultivo de tejidos para la producción de semilla básica de papa**

L. Lago Castro\*

---

\* Instituto de Biotecnología de Plantas, CIGB, La Habana, Cuba.

## **Introducción**

La papa, introducida de América en Europa en 1580, y posteriormente diseminada por el mundo, constituye uno de los cultivos de mayor importancia mundial. Ocupa el cuarto lugar en el mundo entre los 10 principales cultivos, y su producción anual asciende a más de 200 millones de toneladas.

La papa ha recibido intensamente la influencia de los avances científicos y técnicos, y ha sido mejorada en aspectos como el rendimiento y la calidad, la mecanización del cultivo, la resistencia a plagas y enfermedades, y la conservación e industrialización. Es uno de los cultivos cuyo paquete tecnológico favorece mucho la producción de alimentos.

Seleccionada y mejorada por los países desarrollados, la papa regresa a su lugar de origen; como producto mejorado, condiciona a muchos países a importar material de siembra y depender así de los mercados desarrollados.

A pesar de la investigación que se hace en el cultivo de la papa, la producción de su 'semilla' es una actividad que debe evolucionar hacia técnicas más eficientes. El objetivo fundamental es producir un material de siembra con alto grado de pureza varietal y de calidad fitosanitaria. La papa es uno de los cultivos con más requerimientos tecnológicos para la producción de semilla porque está expuesto al ataque de organismos patógenos como hongos, bacterias y virus. Algunos de estos patógenos habitan en el suelo y afectan los rendimientos del cultivo; otros son transportados por el aire o por otros medios y causan epifitias que deben controlarse aplicando productos de control químico. De esos organismos, los más importantes son los causantes de enfermedades virales porque se perpetúan en la descendencia clonal.

El esquema de la Figura 19.1 es un ordenamiento de la producción de semilla en clases o categorías que se refieren a los niveles permisibles de enfermedades o plagas; éstas causan la degeneración del material y su rechazo como semilla para la siembra.

El tubérculo de la papa se considera como la semilla unitaria tradicional, y su calidad refleja las condiciones en que se ha desarrollado el cultivo incluyendo su estado fitosanitario.

A cada categoría del esquema se asigna un porcentaje permisible de hongos, bacterias y virus. La categoría de semilla básica (SB) es el eslabón

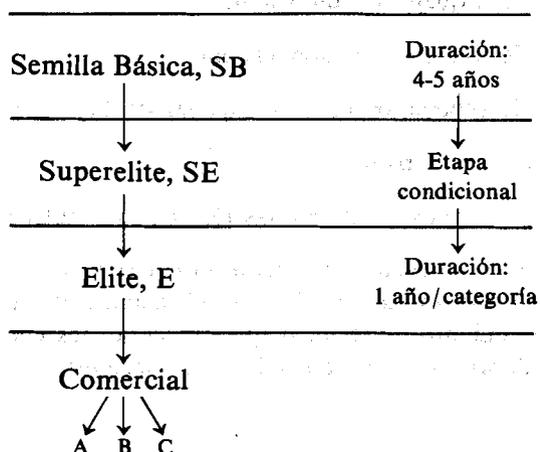


Figura 19.1. Categorías en que se ordena la producción de 'semilla' de papa en Cuba.

inicial de todo el esquema y, por tanto, debe producirse libre de enfermedades que afecten o limiten las posteriores multiplicaciones del material de siembra.

En muchos países, la imposibilidad de producir semilla básica de modo estable ha incrementado la importación de ésta en cantidades significativas. En posteriores multiplicaciones, esos países han alcanzado niveles de producción estables y adecuados. La importación y la manipulación de grandes volúmenes de semilla trae consigo la introducción y el establecimiento de plagas y enfermedades. Es necesario pues desarrollar métodos avanzados de producción de semilla en aquellos países donde, además de importar esa semilla, haya focos de infección viral todo el año y tengan esquemas de producción de semilla de hasta 10 años.

## Multiplicación de Material Libre de Virus

La necesidad de aumentar las tasas de multiplicación de semilla o de incrementar simplemente el número de tubérculos ha motivado la creación de sistemas de multiplicación de la papa, como los siguientes:

- Corte de tubérculos.
- Producción de esquejes de brotes de tubérculos.

- Producción de esquejes de tallo adulto.
- Producción de esquejes de tallo juvenil.
- Producción de tubérculos usando esquejes de hoja-yema.
- Doble cosecha de la papa.
- Multiplicación in vitro mediante las técnicas del cultivo de tejidos.

El desarrollo de estas técnicas ha traído el uso frecuente de la expresión 'multiplicación rápida o acelerada'. La multiplicación acelerada de la papa se refiere a un conjunto de técnicas que aumentan los coeficientes de multiplicación de semilla básica a niveles no alcanzados por los métodos tradicionales.

### **Saneamiento de variedades**

A diferencia de las enfermedades causadas por hongos, aquellas causadas por virus no pueden ser controladas químicamente, ya que los virus y viroides utilizan el metabolismo de la planta para su reproducción. Una vez que una planta adquiere la enfermedad viral, ésta se trasmite de una generación vegetativa a otra.

Los métodos terapéuticos (termoterapia o quimioterapia) contribuyen al saneamiento de las plantas cuando se utilizan asociados con el cultivo de tejidos in vitro. El éxito de estas metodologías depende del virus que se desee eliminar y de la variedad de papa. El concepto de plantas 'libres de virus' es válido solamente cuando se especifica el virus, o la enfermedad viral, que haya sido detectado usando técnicas virológicas efectivas; por este motivo, el concepto de plantas 'probadas para virus' es más apropiado.

### **Cultivo de Meristemas de Papa**

Ha sido demostrado que los puntos de crecimiento de brotes y raíces de plantas infectadas con algún virus están libres de él o lo llevan solamente en concentraciones muy bajas (Kassanis, 1957).

Morel fue el primero en demostrar que podían obtenerse, mediante el cultivo de meristemas, plantas de papa libres de virus a partir de plantas infectadas. En la planta, porciones de tejido con capacidad embrionaria persisten durante toda su vida; estos tejidos perpetuamente jóvenes son los meristemas.

El cultivo de meristemas in vitro puede usarse para producir plantas libres de patógenos a partir de una planta que esté sistémicamente infectada ya sea por micoplasmas (Jacoli, 1978; Fedotina y Krilova, 1976), hongos, o bacterias. Diversos autores han publicado trabajos sobre este tema relacionados con la papa (Kassanis, 1957; Lizárraga et al., 1983). Esta técnica se trata más detalladamente en el Capítulo 2.

El resultado final del trabajo de saneamiento debe comprobarse mediante técnicas precisas de diagnóstico para virus y otros patógenos. De esta manera, el proceso de saneamiento incluye cuatro pasos importantes:

- Identificación del virus.
- Aplicación de las técnicas de eliminación.
- Pruebas de las plantas regeneradas.
- Propagación de las plantas sanas.

## **Pruebas para la Detección de Patógenos**

Durante muchos años, la selección de plantas aparentemente sanas para la producción de semillas estuvo basada en la simple observación de las enfermedades en el campo y, en algunos casos, en técnicas de diagnóstico poco sensibles.

La introducción de la técnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ha mejorado considerablemente la detección y el diagnóstico de enfermedades virales de la papa en los últimos 5 años. En consecuencia, los métodos de detección de virus como el A<sub>6</sub>, el Igel-Lange o las pruebas serológicas básicas (aglutinación, microprecipitación, difusión radial, o procedimientos de látex) han sido remplazados por la técnica ELISA. Detalles de esta técnica han sido descritos por diversos autores (Clark y Adams, 1977; Gugerli, 1979; 1980; Salazar, 1982) y se presentan en los Capítulos 10 y 36.

La técnica ELISA ha revolucionado la solución de los problemas prácticos del diagnóstico de enfermedades virales en el cultivo de la papa, por su precisión y por el grado de automatización con que se puede realizar. Su eficiencia se basa en la alta especificidad de la preparación de los anticuerpos requeridos. La introducción de anticuerpos monoclonales altamente específicos para el virus de la papa (PVY) (Gugerli y Fries, 1981; 1983) mejoró considerablemente la sensibilidad de ELISA. Igualmente, la automatización del proceso ha permitido probar hasta 10,000 muestras de

tubérculos por día, usando equipos especiales combinados con un elevador automático de placas, con dispensadores y con espectrofotómetros. Con las computadoras, finalmente, se obtendrá un máximo beneficio de esta técnica.

La observación cuidadosa de las plantas de papa en el campo y en los invernaderos, así como la verificación regular de su estado sanitario mediante la microscopía electrónica, seguirán complementando cualquier tecnología nueva. Los métodos más sensibles, como ELISA, pueden usarse dentro de esquemas de micropropagación *in vitro*.

Algunos laboratorios determinan el estado fitosanitario de sus líneas de cultivo *in vitro* dejando, al momento de micropropagar, los dos microesquejes basales para observación en el microscopio electrónico. Esta operación se realiza durante tres ciclos de micropropagación. Sin embargo, el orden lógico de aplicación de las pruebas de detección de virus asociadas a la micropropagación podría ser:

- 1) Microscopio electrónico.
- 2) ELISA.
- 3) Electroforesis o técnicas de hibridación de ácidos nucleicos; p. ej., para el viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTV), si estuviera presente.
- 4) Plantas indicadoras.

En algunos casos, el material obtenido *in vitro* no será suficiente; deberá pues sembrarse en macetas para multiplicarlo y realizar todas las pruebas necesarias, aumentando así la certeza del estado sanitario de las variedades de papa.

## **Colección de Semilla Básica de Papa Libre de Enfermedades**

Casi todas las colecciones de papa se conservan con métodos tradicionales, es decir, se siembran en áreas en las cuales se corre el riesgo de que contraigan reinfecciones. La mayor parte de estos materiales pueden contaminarse con uno o más virus, ya que es prácticamente imposible mantener en el campo un cultivo en condiciones óptimas de sanidad.

El cultivo de tejidos ofrece una alternativa para el mantenimiento de variedades de papa libres de enfermedades. Aplicando estas técnicas de

cultivo, el Centro Internacional de la Papa (CIP) en Lima, Perú, ha reunido una colección in vitro de alrededor de 500 clones.

De las varias metodologías que pueden aplicarse para el mantenimiento in vitro de la papa, se pueden citar:

- Criopreservación.
- Método de callos secados.
- Métodos de crecimiento limitado.

Los Capítulos 31 y 32 tratan sobre los métodos de conservación de germoplasma in vitro. El método de congelación rápida ha sido aplicado a la papa por Bajaj (1981) con yemas axilares y 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) como crioprotector; la técnica de los callos secados fue usada por Nitzsche (1983) en una línea de papa.

Roca et al. (1978) han señalado que el mantenimiento in vitro en condiciones de crecimiento normal es una labor intensiva, ya que las 'microestacas' deben ser transferidas a un medio fresco y regeneradas como planta nueva cada 2 ó 3 meses. Por tal razón se han propuesto diferentes formas de reducir la frecuencia de transferencia de los cultivos (Westcott et al., 1977; Schilde-Rentschler, 1979). Estrada et al. (1983) informan que la colección de clones de papa del CIP ha estado almacenada in vitro, sin ninguna transferencia, durante un año, a 22-25 °C, con 3000 lux de iluminación y con 16 h de fotoperíodo, en un medio que contenía 4% de manitol y 0.5% de sacarosa. Roca (1981) ha señalado que un cuarto dedicado a banco de germoplasma con temperatura controlada, iluminación, estantes apropiados, y con dimensiones de 5 x 6 x 2.5 m, tiene una capacidad para el almacenamiento de 20,000 tubos de ensayo con cultivos de meristemas de yuca (*Manihot esculenta*).

## **Semilla Básica de Papa y Cultivo de Tejidos**

Después del éxito de Morel (1965) en la multiplicación de orquídeas in vitro, se ha incrementado el interés por las técnicas de cultivo de tejidos como alternativa para la propagación asexual de plantas de importancia económica.

Las partes de la planta empleadas por esta técnica son tan pequeñas, que han propiciado el uso del término micropropagación. Esta técnica tiene las siguientes ventajas:

- Producción de millones de plantas en un año.
- Intercambio internacional de material, reduciendo o eliminando los riesgos de diseminación de patógenos.
- Aplicación de la técnica en cualquier época del año.

Organizar la producción de semilla básica de papa empleando el cultivo de tejidos exige ponderar la importancia de los siguientes aspectos: la producción a nivel regional o nacional; los recursos económicos existentes; los recursos técnicos de que se disponga; el nivel mínimo de conocimientos y de destreza en esas técnicas de cultivo. No se trata simplemente de introducir la tecnología, sino más bien de adecuarla a las condiciones concretas de la institución, la región o el país.

Varios países (Francia, Viet Nam, Hungría, Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas, Cuba, Perú) han incorporado una etapa de cultivo de tejidos a los esquemas de producción de semilla básica de papa. Viet Nam (desde 1984) y la Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas (desde 1976) utilizan la micropropagación *in vitro* en ese proceso (Cuadros 19.1 y 19.2).

Hay cuatro fases importantes en la producción de semilla básica de papa mediante la técnica del cultivo de tejidos, cada una de las cuales se explicará detalladamente:

- Fase I Multiplicación de material libre de patógenos usando técnicas *in vitro*.
- Fase II Multiplicación intermedia en recipientes de mayor capacidad.
- Fase III Multiplicación en suelo enriquecido.
- Fase IV Producción de tubérculos pequeños en suelo tratado.

### **Fase I: Multiplicación del material *in vitro***

En esta fase, las plantas, colocadas en tubos de ensayo u otros recipientes, se subcultivan por medio de segmentos de nudos a una tasa de multiplicación muy alta.

#### **Materiales**

Para la micropropagación de la papa pueden usarse, como material inicial, las plántulas obtenidas por cultivo de meristemas o las yemas de los tubérculos que han demostrado estar libres de enfermedades virales.

Cuadro 19.1. Proceso de multiplicación rápida de la papa utilizado por los agricultores de Dalat, Viet Nam.

Etapa	Tasa de multiplicación	Resultado	Descripción
1	1/1	Una plántula	Desarrollada en tubo de ensayo; proviene de la estación experimental; multiplicada dos veces en un período de 2 meses produjo 5 esquejes por tubo.
2	25/1	Plántulas	Desarrolladas en tubos de ensayo; período de crecimiento: 1 mes.
3	100/1	Esquejes de tallo juvenil	Proviene de las plántulas ya enraizadas; plantados en una mezcla de suelo y abono, en almácigos, con una densidad de 2500/m <sup>2</sup> (4 esquejes/tubo); recolectados semanalmente durante 2 meses.
4	1000/1	Esquejes de yema apical	Enraizan en sustrato de suelo con abono plantados en almácigos, con una densidad de 2500/m <sup>2</sup>
5	10,000/1	Esquejes de yema apical	Enraizan en macetas de hoja de plátano; trasplantados al campo después de 15 ó 20 días para producción comercial.
6		Tubérculos	Los de mayor tamaño se utilizan para consumo, los de tamaño pequeño, como semilla para continuar la multiplicación.

FUENTE: Nguyen Van Uyen, 1984.

Cuadro 19.2. Proceso para la producción de semilla básica de papa en la Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas.

Año	Descripción de la etapa
1	Laboratorio de saneamiento Después del trabajo de saneamiento y micropropagación, sembrar en invernaderos 10,000 plantas libres de virus para producir 60,000 tubérculos.
2	Estación de multiplicación En condiciones de aislamiento, sembrar 60,000 tubérculos, para cosechar y guardar en bolsas 40,000 clones.
3	Empresas especializadas Parcelas de ensayo de primer año (40,000 en 10 ha).
4	Producción de semilla básica Parcelas de ensayo de clones de segundo año (24,000 clones en 30 ha; se cosechan 300 t de papa).

FUENTE: Trofimez, 1976.

*Yemas de tubérculos.* El material seleccionado debe desinfectarse pasándolo por alcohol de 70% y colocándolo luego en una solución de hipoclorito de calcio al 0.5% durante 5 a 10 minutos, según su tamaño. Se enjuaga luego tres veces con agua destilada estéril en un área a prueba de contaminaciones.

Las yemas de tubérculos dan origen a tallos vigorosos y a hojas relativamente grandes, en algunos casos compuestas; ambas estructuras son similares a las de las plantas adultas. Después de varias multiplicaciones (una por mes) las plantas desarrollan un tallo con hojas simples de tamaño variable. Este proceso puede experimentar modificaciones según la variedad de papa y el estado de incubación de los tubérculos. Por ejemplo, en las variedades Bintje y BF-15, el estado juvenil se presenta entre la segunda y la cuarta multiplicación, cuando se parte de tubérculos almacenados a 20 °C durante 30 a 90 días desde la cosecha. Así pues, partiendo de una yema de una planta adulta sembrada in vitro, y después de varias multiplicaciones en las condiciones mencionadas, ocurre un proceso de rejuvenecimiento del material.

Algunas formas de tallos juveniles encontradas in vitro poseen pequeños tubérculos que resultan del trauma producido cuando se cortan los esquejes de plántulas en edad fisiológica avanzada.

*Plántulas derivadas de meristemas.* La disección de meristemas necesita de un microscopio estereoscópico; en la medida en que se usen prácticas sanitarias estrictas en la ejecución de las operaciones aquí descritas, el éxito estará garantizado. Las cabinas de flujo laminar ayudan a prevenir contaminaciones, pero el alto costo de ese equipo puede limitar el desarrollo del trabajo. En Viet Nam se observó que los propios agricultores construían cámaras de transferencia para aplicar en sus casas las técnicas de micropropagación por segmentos de tallo (nudos). Estos resultados abren nuevas posibilidades a los productores.

Las condiciones para el cultivo de meristemas son: temperatura de 20 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas, e iluminación de 12,000 a 13,000 lux.

El estado juvenil de las plántulas micropropagadas depende, en cierta medida, de las condiciones del cultivo. Alteraciones de estos parámetros han causado la pérdida del estado juvenil, expresada en la aparición de hojas compuestas o en la formación de tuberculillos.

*Medios de cultivo.* Se conocen diversos medios de cultivo; sin embargo, el medio de Murashige y Skoog (1962), con algunas modificaciones, es uno de los más exitosamente usados (Cuadro 19.3).

Cuadro 19.3. Algunas modificaciones hechas a los componentes del medio de Murashige-Skoog (MS) utilizado para el cultivo in vitro de meristemas y de microesquejes de papa.

Componentes	MS estándar	Modificación <sup>a</sup> para:		Medio de White
		Meristemas	Microesquejes	
<b>Macroelementos (mg/litro)</b>				
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	1650	1250	—
KNO <sub>3</sub>	1900	1900	1100	80
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	400	—	—
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—	—	307	200
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	370	770	739
KCl	—	—	—	65
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	970	—
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	—	—	—	200
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	37.8	37.8	—
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8	—	—	—
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	—	50.8	50.8	2.5
<b>Microelementos (mg/litro)</b>				
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2	6.2	1.5
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3	22.3	22.3	4.5
ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	8.6	8.6	8.6	1.5
KI	0.83	0.83	0.83	0.75
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.025	—
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.25	—
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.025	—
<b>Vitaminas (mg/litro)</b>				
Mesoinositol	100	—	—	—
Acido nicotínico	0.5	—	—	0.5
Piridoxina	0.5	1.0	1.0	0.1
Tiamina	0.1	1.6	0.1	0.1
Acido ascórbico	—	3.0	3.0	—
Sacarosa	30,000	20,000	10,000	20,000
Hidrolizado de caseína	1000	—	—	—
Glicina	—	—	—	3.0
<b>Reguladores del crecimiento (mg/litro)</b>				
GA <sub>3</sub>	1.0	2.0	3.0	—
Kinetina	0.01	0.5	0.25	—
AIA	2.0	—	—	—
Adenina	—	0.5	0.25	—
8-Dihidroxiquinona	—	—	—	—
Acido clorogénico	—	—	0.1	—
Agar	10,000	7000	7000	7000

a. Modificación del medio MS hecha por el Instituto de la Papa de Ucrania, URSS.

FUENTE: Trofimez, 1976.

Otro medio utilizado es el de Knop en el cual se han desarrollado variedades de papa como Desiree, Baraka y Mariella. La composición de los medios se modifica dependiendo del tejido que se cultiva (Cuadro 19.3).

En el Programa Cubano de Semilla de Papa se ha utilizado de modo general, para la micropropagación de papa, el medio A derivado del medio de Knop. Sus componentes son los siguientes:

**Macroelementos:** se toman de la solución base para el medio Knop diluida a la mitad, pero empleando cinco veces más potasio.

**Microelementos:** se toman de la solución base para el medio Berthelot.

### **Producción de tubérculos in vitro**

Esta técnica, así como la formación acelerada de yemas axilares, es de capital importancia en la micropropagación de la papa. La tuberización in vitro ofrece las siguientes ventajas:

- Se obtienen tubérculos en cualquier estación del año.
- Es posible almacenarlos en pequeño espacio.
- Sirven de material de partida para programas que carecen de infraestructura adecuada, y de experiencia en cultivo de tejidos.
- Sirven para siembras tempranas en campo, permitiendo así un escalonamiento de la producción.
- Se pueden transportar más fácilmente que las plántulas en tubos de ensayo.

El CIP ha desarrollado investigaciones para inducir tubérculos in vitro en un rango amplio de genotipos de papa. Pudo constatar que se indujo la formación de tubérculos en todos los genotipos probados. En promedio, una de 10 yemas axilares de plántulas cultivadas in vitro desarrolló estolones con pequeños tubérculos en sus extremos. Cada tubérculo pesaba entre 3 y 38 mg, tenía dos o más ojos y expresaba, aun siendo de tamaño pequeño, caracteres como el color y la forma.

### **Protocolos para la multiplicación in vitro**

#### *1. Producción de tubérculos in vitro*

- a) Coloque brotes axilares 'cosechados in vitro' en un medio MS con 22.0 a 44.0  $\mu\text{M}$  de BA y 0.23 M de sacarosa, en un Erlenmeyer de 300 a 500 ml.

- b) Incube, a una temperatura de 18 a 20 °C, con un fotoperíodo de 8 horas, y con 100 a 500 lux de intensidad lumínica.
- c) En un lapso de 4 meses se obtienen de 30 a 50 tubérculos en miniatura de cada Erlenmeyer (Hu y Wang, 1983).

## *2. Multiplicación por medio de nudos*

- a) Estructure su programa de multiplicación partiendo de plantas obtenidas in vitro, ya sea de yemas de tubérculos libres de virus o de plántulas procedentes de meristemas.
- b) Corte, de la planta obtenida in vitro, varias estacas de manera que cada una posea una hoja y una yema axilar.
- c) Plante las estacas en un medio MS o Knop (diluido a la mitad y con 5 veces más KNO<sub>3</sub> por litro) y en condiciones de cultivo como las ya descritas.
- d) Al cabo de un mes, repita sucesivamente los pasos b) y c).
- e) Se obtiene, en estas condiciones, un ritmo de multiplicación de 5 a 7 estacas por mes.

## *3. Formación acelerada de yemas axilares*

- a) Trasfiera plántulas regeneradas a la superficie del medio sólido MS + 0.005 M de ANA, en un Erlenmeyer de 250 ml.
- b) Observe que dos o tres brotes axilares, con raíces adventicias, se desarrollan en 20 días.
- c) Manipule los nuevos brotes axilares desarrollados para que adopten una posición horizontal en la superficie del agar.
- d) Repita el paso c) con un intervalo de 20 días, hasta obtener como resultado una masa de brotes axilares.
- e) Coseche las yemas axilares con la ayuda de pinzas, y haga el subcultivo en un medio fresco.
- f) Repita el paso e) con 20 días de intervalo, obteniendo el doble o el triple de proliferaciones por frasco (Hu y Wang, 1983).

## Fase II: Multiplicación intermedia en semisterilidad

La multiplicación *in vitro* de cualquier material ocurre en progresión geométrica. El ritmo de multiplicación *in vitro* de la papa puede ocurrir indefinidamente; sin embargo, factores de orden práctico limitan esta posibilidad. Además, las condiciones ambientales de las cámaras de cultivo posibilitan la ocurrencia del 'estado juvenil'. El paso de una planta desde un cultivo *in vitro* al campo requiere una etapa de transición o intermedia. "Los esquejes dejan de cultivarse en condiciones asépticas, lo que facilita las operaciones, conservando algunas ventajas del cultivo estéril en tubos, en particular, la protección contra las infecciones virales y la conservación en la fase juvenil" (Rossignol-Bancilhon y Nozeran, 1979).

Es posible desarrollar este sistema o fase intermedia en cajas de vidrio orgánico transparentes (40 x 25 x 25 cm) que llevan arena hasta una altura de 5 a 7 cm. Las cajas están protegidas con una película de polietileno transparente para evitar la deshidratación del material sembrado. Estas cajas se colocan en estantes iluminados, semejantes a los que se utilizan para colocar las gradillas con los tubos de ensayo empleados en la micro-propagación *in vitro*. El sustrato que sirve de soporte para plantar esquejes de plántulas tiene importancia en el éxito del trasplante (Cuadro 19.4).

Cuando no hay arena apropiada, pueden ensayarse distintas combinaciones de arena y materia orgánica. Otro aspecto importante es la densidad de la población: la distancia de 'siembra' más utilizada es de 2.5 x 2.5 cm. Variaciones en la densidad de siembra pueden influir en la calidad del material obtenido (Cuadro 19.5). El tamaño de las cajas puede variar según el objetivo del trabajo.

Cuadro 19.4. Influencia del sustrato en el crecimiento de plántulas de papa en cajas de vidrio.

Sustrato	Plantas sembradas (no.)	Aspecto de las plántulas <sup>a</sup>	Altura de las plántulas (mm)	Plántulas logradas (no.)	Enraizamiento <sup>a</sup>
Arena de cantera	209	B	41.6	200	MB
Arena de río	209	R	47.3	90	B

a. B = bueno; R = regular; MB = muy bueno. Los valores indicados son promedios del total de plantas sembradas en cada sustrato.

Cuadro 19.5. Influencia de la densidad de población en el desarrollo de plántulas de papa en cajas de vidrio.

Plantas ensayadas (no.)	Aspecto de las plántulas <sup>a</sup>	Altura (mm)	Entrenudos (no.)	Distancia entre los nudos (mm)	Plántulas logradas (no.)
209 plantas	R	27.5	4	11.0	195
80 plantas	B	24.4	3	10.0	80

a. R = regular; B = bueno. Los valores indicados son promedios.

Debe tenerse en cuenta que, en la fase intermedia, es posible la micro-propagación de las plántulas. Inicialmente se creyó que la población de 209 plantas por caja era la ideal; más tarde, la práctica demostró que debía emplearse una densidad intermedia entre las dos ensayadas.

Para agilizar el procedimiento de 'siembra', se ha usado una plancha de material plástico cuyas dimensiones son menores, en 2.5 cm, que las del fondo de la caja, y lleva perforaciones separadas una de otra por una distancia igual a aquélla a que se plantan los esquejes. En los orificios se colocan tornillos pequeños que dan la profundidad de siembra requerida. Con este simple aditamento es posible hacer orificios de siembra uniformes, ahorrando tiempo y mano de obra, y asegurando la población prefijada.

En esta fase intermedia, las cajas requieren de riegos frecuentes con la solución de Knop (Cuadro 19.6). Aun cuando esta fase no exige la asepsia del cultivo in vitro, algunas medidas de limpieza (esterilización del sustrato, eliminación de las plántulas muertas) deben tomarse para garantizar el óptimo estado del material de siembra.

### Fase III: Multiplicación en suelo enriquecido o tratado

Las plántulas obtenidas en la fase intermedia son frágiles y pequeñas, condición que limita su trasplante directo al campo. Se crea así la necesidad de otra fase que consiste<sup>1</sup> en el traslado de las plántulas a pequeños cubos de tierra comprimida y enriquecida (una mezcla de tierra, turba, arena y fertilizante), colocados en invernaderos húmedos, con temperaturas de 19 a 20 °C, y con una iluminación muy alta durante 18 horas.

1. Nozeran, L. N. Comunicación personal.

Cuadro 19.6. Influencia de la concentración de la solución nutritiva Knop en el agua de riego de plántulas de papa mantenidas en cajas de vidrio.<sup>a</sup>

Tratamiento de riego	Aspecto de las plántulas	Altura (mm)	Entrenudos (no.)	Distancia entre nudos (mm)
Agua sola; 10 días después regar con SK de conc. 1/5	R	21.6	2	8.6
Agua sola; 10 días después regar con SK de conc. 1/5	B	42.7	4	10.9
Regar durante todo el ciclo con SK de conc. 1/5	B	40.2	3	11.5
Regar durante todo el ciclo con SK de conc. 1/10	MB	37.0	4	10.3

a. R = regular; B = bueno; MB = muy bueno. SK = solución Knop; conc. = concentración. Los valores indicados son promedios.

De esta manera, gracias a la nutrición mineral suministrada en riegos frecuentes con la solución de Hoagland y a la iluminación alta, los pequeños esquejes se convierten rápidamente en plantas robustas, de hojas compuestas.

Como se ha explicado, el estado juvenil de las plántulas de papa permite utilizar más frecuentemente el material vegetal para la micropropagación; por otra parte, este estado puede extenderse o acortarse con las condiciones del cultivo in vitro. Ahora bien, una vez trasladadas las plántulas de la fase intermedia a la fase de suelo enriquecido, comienza a producirse la pérdida paulatina del estado juvenil que ha sido aprovechado hasta ahora.

El fotoperíodo largo (18 horas) a que se someten las plántulas retarda el proceso de tuberización. No debe olvidarse que, al final del proceso, serán llevadas al campo para que produzcan tubérculos.

Los vietnamitas han hallado una solución práctica para el paso de las plántulas a esta tercera fase. Con pedazos (10 x 5 cm) de una lámina de polietileno se elaboran pequeños cilindros que se rellenan con una mezcla de suelo (tierra:turba:arena:fertilizante) para que sirvan de soporte a los esquejes. Una vez sembradas las plantas en el campo, los cilindros de polietileno pueden reutilizarse. Otras soluciones, como la hoja de plátano enrollada, son factibles pero dependen en gran medida de las posibilidades económicas.

Hay máquinas de uso frecuente en horticultura que fabrican de 12 a 13 mil bloquecitos de tierra por hora; si se emplearan para plantar los esquejes, permitirían desarrollar más rápidamente la Fase III. El sistema completo consta de una mezcladora de suelo para alimentar la máquina, la máquina de producir bloquecitos, y las sembradoras de bloquecitos.

Otro aspecto que debe considerarse es la manipulación de los bloquecitos antes y después de la siembra. En Francia se producen y colocan en el suelo del invernadero; en Holanda hay máquinas autopropulsadas que producen los bloquecitos y los colocan directamente en el suelo, reduciendo así su manipulación.

#### **Fase IV: Producción de tubérculos**

La producción de semilla básica de papa requiere condiciones fitosanitarias estrictas. En ocasiones, es difícil encontrar lugares con una baja incidencia de áfidos o pulgones (vectores de enfermedades); por ello, la selección del lugar adecuado se hace crítica.

En el proyecto cubano se utilizó inicialmente la tecnología francesa que consiste en trasladar las plántulas al campo en los bloquecitos de suelo enriquecido, para obtener la cosecha de tubérculos. Dificultades prácticas se presentaron al manipular y transportar el material vegetal hacia las áreas de siembra; esta operación, la siembra de plántulas, solía hacerse a mano. Asimismo, algunos aspectos agrotécnicos debían tenerse en cuenta, como la distancia de siembra, el tipo de siembra (surco o cantero), la aplicación de herbicidas selectivos, y otras labores culturales que serán diferentes para esquejes plantados en surcos o en camas (canteros). Estas consideraciones condujeron a una tecnología modificada.

Una alternativa que no debe descartarse es la producción de tubérculos pequeños en lugares más concentrados; una vez cosechados, esos tubérculos servirán como punto de partida para la producción de semilla básica. En Viet Nam, para evitar el transporte de las plántulas hacia los agricultores, se puso en práctica la producción de tubérculos pequeños. En un suelo con poca fertilización y densamente sembrado, las plántulas forman pequeños tubérculos de un peso entre 30 y 60 g.

Con informaciones de Viet Nam, de Francia y del CIP se desarrolló la siguiente tecnología, basada en las condiciones reales de Cuba. Dentro de túneles de estructura metálica cubiertos con una malla contra pulgones, se construyen camas de 1 m de ancho x 30 m de largo, que contienen la mezcla de tierra descrita anteriormente. Las plántulas, densamente plantadas en

las camas (10 x 10 cm), pierden paulatinamente su estado juvenil; por ello es posible hacer propagaciones antes de que aparezcan las hojas compuestas y comience, por tanto, el proceso irreversible de la tuberización. Cuando su altura está cercana a los 10 cm, las plántulas se decapitan para estimular la formación de esquejes axilares que sirven, así como el ápice cortado, para obtener nuevas plantas. Este corte de esqueje puede realizarse a intervalos de unos 10 días, durante 10 semanas; de esta manera se eleva considerablemente la población de plántulas. Este material puede sembrarse en bloquitos de suelo enriquecido que se trasladan al campo para su siembra.

Después de cada corte se aplica a las plántulas de las camas una pequeña dosis de fertilizante nitrogenado, para que se eleven los coeficientes de multiplicación. Finalizado el corte de esquejes en esas plántulas, se comienza el aporque con suelo enriquecido (de dos a tres veces) para conformar la cama donde se producirán los pequeños tubérculos. Se obtienen así hasta mil tubérculos pequeños por metro cuadrado.

El Cuadro 19.7 presenta un esquema para la producción de semilla básica de papa, empleando el cultivo de tejidos.

## **Organización de Centros de Micropropagación**

Los métodos actuales del cultivo de tejidos pueden resolver los problemas de micropropagación de la papa y elevar sus coeficientes de multiplicación a niveles que no alcanzarían otras técnicas. Este hecho hace posibles los siguientes resultados: la obtención de millones de individuos para la producción de semilla de papa; el saneamiento de variedades contaminadas por enfermedades virales; el mantenimiento de un banco de variedades libres de enfermedades que servirían de punto de partida para el esquema de micropropagación.

El objetivo actual es la organización de centros especializados en estas técnicas de micropropagación. Países como Hungría, Viet Nam, Cuba, Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas, Francia y Perú emplean el cultivo de tejidos como una ayuda valiosa para la obtención de semilla básica de papa.

Cuadro 19.7: Esquema integral de producción de semilla básica de papa empleando el cultivo de tejidos.

Tasa de multiplicación	Descripción	Tiempo requerido (días)
<b>Fase I</b>	<b>Multiplicación in vitro</b>	
5	Tubos de ensayo	0
25	Tubos de ensayo	30
125	Tubos de ensayo	60
625	Tubos de ensayo	90
3125	Tubos de ensayo	120
<b>Fase II</b>	<b>Fase intermedia</b>	
2888	Tubos de ensayo	
x 3 =		
8664	Esquejes (120 cajas, 7 m <sup>2</sup> )	150
x 3 =		
25,992	Esquejes (361 cajas, 25 m <sup>2</sup> )	180
<b>Fase III</b>	<b>Multiplicación en suelo enriquecido</b>	
26,000	Esquejes en cajas	
x 3 =		
78,000	Esquejes	210
x 4 =		
312,000	Plántulas	240
<b>Fase IV</b>	<b>Producción de tubérculos pequeños</b>	
312,000	Plántulas sembradas	270
x 4 =		
1,250,000	Tubérculos <sup>a</sup>	80-90
1,250,000	Tubérculos conservados	
<b>Siembra</b>		
300 toneladas	Tubérculos	360

a. 4 tubérculos/planta.

El Cuadro 19.8 presenta el análisis económico de un esquema propuesto para producir esa semilla, fundado en la experiencia soviética. En él se comparan el sistema tradicional y un sistema que aplica el cultivo de tejidos, para producir 7.5 t de semilla básica.

Cuadro 19.8. Recursos de mano de obra y costo de la producción de 7500 t de semilla básica de papa en la URSS, en 1978.

Fases	Cantidad de material		Empleo de		Costo	
			Area	Trabajo	Rublos	US\$
	(miles)	(miles t)	(ha)	(hombres-día)	(miles)	(miles)
<b>Esquema tradicional</b>						
Clones para selección	300		—	1.85	6.7	4.46
Clones de primer año	300		75	18.75	225.0	149.63
Clones de segundo año	150		300	75.00	900.0	598.50
Semilla básica		7.50	750	75.00	1125.0	748.13
<b>Total</b>			1125	170.60	2256.7	1500.72
<b>Con cultivo de tejidos</b>						
Clones meristemáticos, obtención	—		—	10.08	277.0	184.20
Clones de primer año	50		8	2.00	24.0	16.00
Multiplicación preliminar de clones		0.16	40	4.00	60.0	40.00
Multiplicación de clones en áreas especializadas		0.80	200	20.00	300.0	200.00
Semilla básica		7.50	750	75.00	1125.0	748.13
<b>Total</b>			998	111.08	1786.0	1188.33

## Referencias

- Bajaj, Y. P. S. 1981. Regeneration of plants from potato meristems, freeze-preserved for 24 months. *Euphytica* 30:141-145.
- CIP (Centro Internacional de la Papa). 1982. World potato facts. Lima, Perú.
- Clark, M. F. y Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- Estrada, R.; Schilde-Rentschler, L. y Espinosa, N. 1983. *In vitro* storage of potato germplasm. En: International Congress Research for the Potato in the Year 2000. Memorias. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. p. 80-81.

- Fedotina, V. L. y Krilova, N. V. 1976. Ridding tobacco of the mycoplasmic infection big bud by the method of tissue culturing. Dokl. Bot. Sci. 228:49-51.
- Gugerli, P. 1979. Le test immuno-enzymatique (ELISA) et son application pour le diagnostic rapide des viroses de la pomme de terre. Revue Suisse Agric. 11:253-260.
- . 1980. Potato leafroll virus concentration in the vascular region of potato tubers examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Potato Res. 23:137-141.
- y Fries, P. 1981. Utilization d'anticorps monoclonaux pour le diagnostic de viroses chez les plantes. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. 13:323.
- y ———. 1983. Characterization of monoclonal antibodies to Potato Virus Y and their use for virus detection. J. Gen. Virol. 64:2471-2477.
- Hu, C. Y. y Wang, P. J. 1983. Meristem, shoot tip, and bud cultures. En: Evans, D. A. (ed.). Handbook of plant cell culture. v. 1, p. 177-227.
- Jacoli, G. G. 1978. Sequential degeneration of mycoplasma-like bodies in plant tissue culture infected with aster yellows. Can. J. Bot. 56:133-140.
- Kassanis, B. 1957. The use of tissue culture to produce virus-free clones from infected potato varieties. Ann. Appl. Biol. 45:422-427.
- Lizárraga, R. E.; Salazar, L. F. y Schilde-Rentschler, L. 1983. Effect of meristem size on eradication of potato spindle tuber viroid. En: International Congress Research for the Potato in the Year 2000. Memorias. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. p. 199.
- Mix, G. 1981. Abstracts of conference papers. En: eighth triennial conference of the European Association for Potato Research. p. 176-177.
- Morel, G. M. 1965. Clonal propagation of orchids by meristem culture. Cymbidium Soc. News 20:3-11.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Nguyen Van Uyen. 1984. Nueva aplicación del cultivo de tejidos y de la multiplicación rápida: Producción de papa por agricultores vietnamitas. CIP Circular. v. 11, no. 1, p. 7-10.
- Nitzsche, W. 1983. Germplasm preservation. En: Evans, D. A. (ed.). Handbook of plant cell culture. v. 1, 1970 p.
- Quak, F. 1977. Meristem cultures and virus-free plants. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Nueva York.

- Raatz, W. y Standke, K. C. 1978. Untersuchungen zum Minimalwachstum von Kartoffeln *in vitro*. *Landbauforschung (Volkenrode)* 28:75-78.
- Roca, W. M. 1981. Genetic Resources Unit: Tissue culture section. En: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Annual report 1980. Cali, Colombia: 21 p. (Mecanografiado.)
- ; Espinoza, N. O.; Roca, M. R. y Bryan, J. E. 1978. A tissue culture method for the rapid propagation of potatoes. *American Potato Journal* 55:691-701.
- Rossignol-Bancilhon, L. y Nozeran, R. 1979. La multiplication végétative 'conforme' de la pomme de terre: Aspects fondamentaux et utilisation agronomique. En: *Séminaire International de la Pomme de Terre*. Argelia.
- Salazar, L. F. 1982. Manual de enfermedades virósas de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 111 p.
- Schilde-Rentschler, L. 1979. Report of the planning conference on the exploration taxonomy and maintenance of potato germplasm; III. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. p. 181-193.
- y Roca, W. M. 1983. Virus elimination in potato and cassava. En: *Proceedings of a global workshop on root and tuber propagation*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 89-95.
- Trofimez, L. N. 1976. Metodología para el saneamiento y reproducción acelerada de la papa. Academia de Ciencias Agrícolas Lenín, URSS. 30 p. (En ruso.)
- Westcott, R. J.; Henshaw, G. G.; Grout, B. W. W. y Roca W. M. 1977. Tissue culture methods and germplasm storage in potato; 2. *Acta Horticulturae* 78:45-49.