

## MULTIPLICACION RAPIDA DE SEMILLA DE PAPA LIBRE DE VIRUS POR MEDIO DE CULTIVO DE TEJIDOS

\*Sonia Jaramillo V.I.A., M.S.

### INTRODUCCION

Para lograr los mejores rendimientos en la producción de papa, es necesario partir de semilla de la mejor calidad. La propagación de la papa por el tubérculo-semilla, permite mantener inalterable la constitución genética, pero facilita la transmisión y diseminación de patógenos, principalmente virus, responsables de la pérdida gradual de la capacidad de producción.

Por las razones anteriores, se hace necesario erradicar o disminuir la concentración de los principales virus que afectan los rendimientos de los clones comercialmente más utilizados, por medio de la técnica del cultivo de meristemas y luego aumentar este material lo más rápido que sea posible, mediante el empleo de las técnicas rápidas de multiplicación. Este material servirá de fuente para los programas de producción de semilla básica y certificada.

Según Bryan, Jackson y Meléndez (4) el empleo de uno de los métodos de multiplicación rápida o una combinación de ellos, puede incrementar las tasas de uno a cuarenta, hasta uno a varios miles de esquejes por año y cada esqueje puede producir cinco o más tubérculos-semilla; además de que se reduce el tiempo y los costos. Estos últimos pueden ser incrementados inicialmente, debido a que se requiere mucha mano de obra, equipos e instalaciones especiales, pero este efecto puede ser contrarrestado por la mayor cantidad de semilla producida, la reducción en el número de generaciones y un aumento en el vigor de la semilla.

Se tratarán algunos aspectos básicos sobre la erradicación de los principales virus, la micropropagación acelerada, transplante al invernadero, técnicas rápidas de multiplicación in vivo y transplante de los esquejes al campo.

### 1. ERRADICACION DE LOS PRINCIPALES VIRUS

Según Guerrero y Martínez (10) las pérdidas ocasionadas por los virus "X" y "Y", solo fueron significativas en mezcla o asociación, causando gran reducción en la producción. Sin embargo, el PLRV redujo la producción en casi 46.8% para la variedad ICA-Puracé y la asociación de los tres virus produjo pérdidas de 61.2% en relación al testigo. Estos son los tres virus principales que afectan los rendimientos en todo el país, pero Navarro y otros (15) y Tamayo y Navarro (22) han reportado que el virus del amarillamiento de las venas de la hoja de la papa (VAVP), el cual se ha presentado con severidad en algunas zonas del oriente Antioqueño, puede

\*Profesora Asistente de la Universidad Nacional, Seccional Medellín, Facultad de Agronomía. Apartado aéreo 568, Medellín, Colombia.

reducir los redimientes del 43 al 56%. Por estas razones en un programa de erradicación de virus, solo debemos asegurarnos que las plantas a multiplicar estén libres de aquellos virus de importancia local, como lo indican Bryan et al (4).

Según Roca y Jayasinghe (19), las etapas de saneamiento de clones afectados por virus son las siguientes: 1) Identificación del agente causante, 2) Aplicación de las técnicas de saneamiento (aprovechamiento de la distribución irregular de los virus en las plantas, quimioterapia, termoterapia, cultivo de meristemas, termoterapia seguida de cultivo de meristemas y termoterapia durante el cultivo de meristemas, 3) Aplicación de pruebas de detención de virus y 4) Propagación del material sano.

### 1.1 Termoterapia seguida de cultivo de meristemas

Para el caso de la papa se considera más importante discutir el método de erradicación de virus mediante termoterapia seguida de cultivo de meristemas, por las siguientes razones:

Según Roca y Jayasinghe (19) el principio básico de la termoterapia es que los microorganismos parásitos a menudo pueden ser eliminados o inactivados en rangos de temperatura y tiempo que son ligeramente determinantes para el hospedero. En virus la situación más frecuente es la inactivación, de ahí la conveniencia de hacer la combinación con cultivo de meristemas para lograr la eliminación.

El cultivo de meristemas como técnica de saneamiento, especialmente de virus, se basa en una distribución viral desuniforme dentro del vegetal y su concentración tiende a disminuir hacia el meristema apical del tallo. A veces se han detectado partículas virales en las células del meristema apical, pero las plantas obtenidas a partir de un meristema han resultado libres de virus (virus X en papa). Esta situación indica que hay otros factores que operan en el cultivo in vitro y son responsables de inactivación de los virus en las nuevas plantas. Las hipótesis al respecto son: 1) La interrupción temporal de la organización normal del tejido meristemático que ocasiona la inhibición de la multiplicación de los virus, debido a la no disponibilidad de enzimas claves; 2) La ausencia de tejidos vasculares en la proximidad del meristema apical y las conexiones "plasmodesmáticas" en las células de estos tejidos son muy pequeñas, entonces el virus se desplaza muy lentamente hacia el meristema; 3) La multiplicación celular activa en la zona meristemática, lo que implica la utilización de casi la totalidad de la maquinaria bioquímica celular para la formación de macromoléculas y otras estructuras de las células nuevas, dejando por lo tanto a los virus (parásitos obligados) en condiciones desventajosas para su propia multiplicación (19).

En resumen se puede decir que los tratamientos de termoterapia a los tejidos infectados, pueden alterar la síntesis viral y retardar la translocación de los virus en la planta, lo que permite que la región libre de virus del meristema apical aumente de tamaño y por lo tanto se hace más factible la limpieza (19,20).

Según Roca y Jayasinghe (19) el virus del enrollamiento de la hoja de la

papa (PLRV) es particularmente sensible al calor y puede ser eliminado in vivo por medio de la termoterapia, pero para el viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTV) es necesario temperaturas bajas, pues las altas lo incrementan. Según Lizárraga et al, citados por Roca y Jayasinghe (19), para erradicar el PSTV es necesario tratar las plantas de papa con temperaturas bajas (5 °C durante seis meses) y posteriormente hacer el cultivo de meristemas. Con esta práctica obtuvieron el 54% de clones sanos.

En ensayos para sanear material infectado del virus X de la papa, la termoterapia no solo disminuyó la infectividad, sino que contribuyó a aumentar significativamente el porcentaje de plantas sanas obtenidas por el cultivo de meristemas, como puede observarse en la Tabla 1 (19).

TABLA 1. Efecto de la termoterapia en la infectividad relativa\* y en el saneamiento de clones infectados por virus, utilizando cultivos de meristemas.

Diluciones de extracto de hoja	800244		720057	
	Termoterapia	Testigo	Termoterapia	Testigo
1/10	+	+++	+	+++
1/100	-	++	+	+++
1/1000	-	++	-	++
1/10000	-	+	-	+
% de plantas sanas por medio de cultivo de meristemas	90	5	40	2

\* Número de lesiones locales en media hoja de G. globosa.

Para Roca y Jayasinghe (19) la duración y grado de temperatura de la termoterapia no solo dependerán de virus, sino del tamaño, estado fisiológico y contenido de agua del material. Los materiales de tamaño pequeño y con bajo contenido de agua, así como las yemas en estado de latencia, pueden ser tratadas con temperaturas elevadas. Así el PLRV es eliminado al tratar los tubérculos en latencia con aire de 36 °C durante 20 a 30 días, pero su control se hace más difícil cuando se tratan las plantas infectadas.

1.2 Método de erradicación empleado en forma rutinaria en el CIP (Según L. Schilde, 20).

1.2.1 Precultivo de las plantas

El primer paso es hacer crecer una yema de un tubérculo a temperaturas superiores a los 25 °C, las cuales estimulan la multiplicación del viroide PSTV. La planta desarrollada se prueba por electroforesis en gel (Morris and Smith, modificado por Salazar). Todo material que presente PSTV es descartado. En este caso se prueba un tubérculo adicional. Si la prueba de PSTV es negativa, la planta es indexada para otro virus. El resto del tubérculo se siembra y cuando alcanza una altura de 30 a 50 cm., se suprimen las yemas apicales y se induce el crecimiento rápido de las

yemas axilares. Luego se exponen a termoterapia.

### 1.2.2 Termoterapia

Las plantas son tratadas a 36 °C por 16 horas y 30 °C por 8 horas, con una humedad relativa de aproximadamente 70% y luz continua de tubos fluorescentes con una intensidad de 10.000 lux. Las plantas se mantienen en termoterapia por cuatro semanas si es posible.

Las yemas axilares crecen rápidamente. Luego de este tratamiento se toma una muestra para probar nuevamente para PSTV por electroforesis en gel.

### 1.2.3 Cultivo de meristemas

Después de las cuatro semanas bajo termoterapia, se cortan y esterilizan las yemas apicales y laterales. Los meristemas con uno o dos folíolos se aíslan y cultivan sobre un medio que contenga los constituyentes básicos de Murashige and Skoog (14) (ver apéndice) y se le adiciona 0.25 mg/l de ácido giberélico, 2.00 mg/l de pantotenato de calcio, 100 mg/l de m-inositol, 3% de sacarosa y 0.6% de agar, como puede observarse en la Tabla 2.

TABLA 2. Medios usados en la micropropagación de la papa.

Medio	M S* complementado con:
A Meristema	Acido giberélico . . . . . 0.25 ppm
	Pantotenato de calcio . . . . . 2.00 ppm
	Sacarosa . . . . . 3.00 %
	Agar . . . . . 0.60 %
B Enraizamiento de nudos	Acido giberélico . . . . . 0.25 ppm
	Pantotenato de calcio . . . . . 2.00 ppm
	Sacarosa . . . . . 3.00 %
	Agar . . . . . 0.80 %
C Líquido	Acido giberélico . . . . . 0.40 ppm
	Pantotenato de calcio . . . . . 2.00 ppm
	Benzilaminopurina . . . . . 0.50 ppm
	Acido naftalenacético . . . . . 0.01 ppm
	Sacarosa . . . . . 2.00 %

\* M S : Apéndice

Es ventajoso transferir los meristemas al mismo medio por tres a cuatro veces, pues se incrementa la rata de crecimiento y se puede lograr el desarrollo completo de las plántulas al cabo de la sexta a octava semana (9, 20).

Las plántulas obtenidas por cultivo de meristemas se multiplicarán para

probar nuevamente para virus y PSTV (20).

#### 1.2.4 Pruebas para virus y PSTV

Cuando el material ha crecido suficientemente se prueba para virosis y PSTV mediante serología, plantas indicadoras, microscopía electrónica y electroforesis. Si las cuatro pruebas son negativas, las plántulas del material propagado son almacenadas in vitro para la conservación y la multiplicación (20).

### 2. MICROPROPAGACION ACELERADA

Una vez se dispone del material libre de virus, se procede a la micropropagación, cuya finalidad según Espinosa et al (9) es la obtención de grandes cantidades de plantas clonales en un período corto. Según estos autores en el CIP se lleva a cabo la micropropagación por dos métodos, nudos de tallo en medio sólido y fragmentos de tallo con varios nudos en medio líquido.

El primer método consiste en remover las hojas grandes de los tallos y luego cortar los esquejes con un solo nudo, los cuales se colocan sobre el medio B (Tabla 2) solidificado con agar. La yema axilar crece rápidamente y en tres a cuatro semanas se dispone de una planta con seis a siete nudos. En el segundo método se colocan fragmentos de tallo con tres a cuatro nudos, a los cuales se ha removido las hojas grandes, en un recipiente de vidrio (erlenmyer) el cual deberá contener 15 mililitros de medio C (Tabla 2). Este medio por ser líquido deberá agitarse a 80 RPM. Al cabo de tres a cuatro semanas se pueden obtener hasta 60 a 70 nudos. Una vez se tenga un número adecuado de plántulas es necesario enraizarlas y transferirlas bajo condiciones no estériles (9).

### 3. ENRAIZAMIENTO Y TRANSFERENCIA A CONDICIONES NO ESTÉRILES.

Espinoza et al (9) recomiendan sembrar un solo nudo por tallo en el medio B (Tabla 2). Estos nudos deberán proceder de plántulas in vitro a las cuales se les remueve las hojas mas grandes.

Cuando las plántulas alcanzan de 3 a 5 cm. y tienen un sistema radical bien desarrollado, se transplantan a potes o bandejas que contengan un sustrato adecuado. Este sustrato debe ser determinado según las condiciones y disponibilidades de cada zona. Lo importante es que el sustrato permita aeración y drenaje adecuados. Así por ejemplo, en Vietnam emplean una mezcla de subsuelo y abono (16), en Ecuador pomina (piedra pómez) y solución nutritiva cada ocho días; para el caso de la yuca en el CIAT se prepara una mezcla conformada por dos partes de arena fina y una de suelo, esta mezcla se esteriliza a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante una hora. Es importante aclimatar los cultivos al medio ambiente antes de proceder al trasplante, con el fin de proporcionarles tolerancia al estrés producido por la baja humedad

relativa, a la vez que se facilita la adaptación de las plantas a una condición autotrófica, con una adecuada absorción, translocación y transpiración (18).

La aclimatación se logra aumentando la intensidad luminosa y la temperatura y disminuyendo simultáneamente la humedad relativa, tres a cuatro días antes del trasplante (18).

Una vez se trasplante bajo condiciones de invernadero, se debe mantener una alta humedad relativa, la cual puede ir disminuyendo paulatinamente hasta que se logre un crecimiento adecuado bajo las condiciones del medio ambiente (18).

Es conveniente una aplicación semanal de un fertilizante soluble en agua y rico en P (10-52-10 y 10-50-17) con el fin de promover un crecimiento rápido del sistema radical.

Las plantas procedentes de este trasplante pueden emplearse para la producción de tubérculos semilla o para la multiplicación por esquejes, empleando las técnicas de multiplicación rápida.

#### 4. MULTIPLICACION ACELERADA.

Una vez obtenida una o varias plantas libres de patógenos, se pueden propagar rápidamente bajo las condiciones de invernadero y para ello se emplean diversas técnicas: esquejes de tallo, esquejes de hojaya, corte de brotes y corte de tubérculos.

Según Meléndez y Quevedo (13) en las técnicas de multiplicación rápida se debe tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Manejo de todos estos sistemas a nivel de invernadero, donde se adquiere experiencia para trabajar posteriormente en el campo.
- Disponibilidad de por lo menos un invernadero y un almacén para el manejo de la semilla.
- Conocer las variedades y la rata de multiplicación.
- Manejo de la asepsia dentro del invernadero.
- Personal entrenado en las diferentes labores.

##### 4.1 Ventajas

Se logra aumentar las tasas de multiplicación de 1:40 hasta uno a varios miles de esquejes por año y cada esqueje puede producir cinco o más tubérculos semilla, además de que se reduce el tiempo y los costos, pues el alto costo inicial es contrarrestado por una cantidad mayor de semilla producida, una reducción en el número de generaciones y un aumento en el vigor de la semilla. También se pueden eliminar en forma efectiva los

patógenos no sistémicos y nemátodos que se transmitan por el suelo y el tubérculo, excepto en el caso de emplearse esquejes de brote (4,8).

Según Nguyen Van Uyen (16) en Vietnam y Cuba se está haciendo la multiplicación de semilla a partir de plántulas procedentes de clones libres de virus in vitro, mediante seis fases que teóricamente podrían producir  $3^{18}$  plántulas en un año. Los agricultores usan esquejes que enraizan en arena estéril y suelo, luego los pasan a suelo esterilizado en macetas y finalmente al campo con una alta densidad de siembra. A partir de 100 plantas in vitro, se espera una producción de 10 a 15 t/ha. de tubérculos al cabo de la sexta fase en un año (6).

#### 4.2 Desventajas

Algunas variedades presentan dificultades para enraizar y otras desarrollan un sistema radical muy pobre; se puede presentar desuniformidad en el campo en cuanto a tamaño, debido a las diferentes fechas de siembra de los esquejes; el agricultor desconoce las técnicas y manejo adecuado a nivel de campo (13).

#### 4.3 Sustratos para enraizamiento

En comparación a otros cultivos la papa tiene un sistema radical débil, por lo tanto necesita un suelo de muy buenas condiciones físicas para su crecimiento (7). Hartman y Kester (11) opinan que la combinación de algunos materiales como suelo, arena, musgo, vermiculita, perlita, agua y aire saturado de humedad, por lo general dan mejores resultados que el uso de cualquiera de éstos cuando se emplea solo. Sin embargo, para determinar la mejor mezcla de enraizamiento, es aconsejable experimentar con las plantas en las condiciones ambientales bajo las cuales se va a trabajar.

Inose (12) observó que el material de difícil enraizamiento lograba tener buen éxito en un sustrato tipo piedra pómez (pomina), el cual presenta ventajas como: 1) químicamente inerte, 2) estéril, y 3) tiene muy buen drenaje cuando se usa con un sistema de neblina. En la Granja Santa Catalina, propiedad del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Ecuador, se emplea este tipo de material como sustrato para todas las técnicas de multiplicación rápida de papa con excelentes resultados.

Para Bryan, Jackson y Meléndez (4) las mejores condiciones para el enraizamiento son proporcionadas por un medio con buena aireación y una retención de humedad adecuada pero no excesiva. La arena común tiene las mejores propiedades. Musgos, cascarilla de arroz, arena de río, suelo común y perlita, retienen excesiva humedad, lo que conduce a enraizamientos pobres. En lo posible debe evitarse el uso de cámaras de humedad y vaporizadores, pues el empleo de éstos conduce a pérdidas altas, debido a patógenos que causan el "damping-off". Con un medio adecuado y sombra, los esquejes enraizan sin el uso de vaporizadores.

#### 4.4 Factores que Afectan el enraizamiento

Algunas veces no se logra el enraizamiento de esquejes, aunque se haya utilizado la hormona adecuada. Según Bryan, Jackson y Meléndez (4), los factores que influyen en el enraizamiento son: senectud, estado fisiológico de las plantas madres, contacto entre el esqueje y la arena y aplicación de fungicidas.

##### 4.4.1 Estado fisiológico de las plantas madres

Para producir esquejes vigorosos de tallo juvenil y tallo lateral, las plantas madres deben estar creciendo en forma óptima, pues cuando éstas han empezado la senectud, es más difícil el enraizamiento (4).

Bryan, Jackson y Meléndez (4) indican que cuando se forman estolones o tubérculos en los esquejes de tallo juvenil o lateral, las plantas madres tienen una edad fisiológica avanzada y que para evitar este problema, se deben tomar los esquejes de plantas fisiológicamente jóvenes, o conservar las plantas madres bajo condiciones de días largos. Para el caso de tallo juvenil, la planta madre solo debe tener hojas simples.

Se puede presentar crecimiento apical del esqueje sin raíces por las siguientes razones: utilización de una hormona inadecuada, mal contacto del esqueje con la arena o drenaje e irrigación inadecuados. Si se presentan raíces y estolones con tubérculos en la base del esqueje, puede deberse a que la planta madre está iniciando la maduración o está bajo condiciones de días muy cortos (5).

El CIP (7) reportó que la remoción de estolones de las plantas madres, las cuales estaban fertilizadas adecuadamente, permitió mantener un crecimiento vegetativo vigoroso, retardando la senescencia, por lo que la rata de producción de esquejes se incrementó gradualmente y se prolongó hasta los 150 días.

En la Granja Santa Catalina INIAP-Ecuador, no se hace aporque a las plantas madres de tallos laterales, lo cual permite que los estolones emerjan y se conviertan en nuevos tallos laterales, aumentándose por lo tanto la eficiencia de este sistema.

##### 4.4.2 Contacto del esqueje con el sustrato

Según Bryan, Jackson y Meléndez (4), la falta de enraizamiento de los esquejes de tallo lateral, frecuentemente se debe al contacto insuficiente entre el esqueje y la arena. Cuando una yema axilar queda cubierta por arena, tiende a formar estolón, tubérculo o ambos, en especial si el esqueje fue tomado de una planta madre fisiológicamente vieja. Este autor recomienda que debe dejarse una longitud de 5 cm. entre el punto de corte inferior del esqueje y el primer nudo.

##### 4.4.3 Temperatura

La temperatura entre 20 y 22 °C es la óptima para el enraizamiento, tanto

en arena como en otros medios. El alargamiento del tallo, esencial para esquejes de brote y de tallo juvenil, se acelera con temperaturas entre 23 y 26 °C, bajo luz de buena calidad (4).

#### 4.4.4 Uso de hormonas de enraizamiento

Las yemas activas de los esquejes promueven el enraizamiento de éstos, debido a las auxinas que se sintetizan allí y se translocan a la base del esqueje. Hay situaciones en las cuales las auxinas sintéticas promueven el enraizamiento de esquejes. La respuesta a éstas depende ampliamente de las especies y además es modificada por la edad de la planta madre, época del año, temperatura de la cama de enraizamiento, etc. Después de la iniciación de las raíces, la tiamina y otros compuestos estimulan la elongación (23).

Bryan et al (4,5) indican que el uso de hormonas de enraizamiento puede ser ventajoso para variedades que difícilmente enraizan o cuando éste es lento. Sin embargo, las hormonas no son la única solución para todos los problemas relacionados con el enraizamiento.

Para esquejes de papa debe conseguirse en enraizador recomendado para maderas blandas. La duración de la inmersión depende de la variedad y de la hormona usada (4).

La hormona además de acelerar el enraizamiento afecta el número y la localización de las raíces, pues estimula un mayor desarrollo de éstas a lo largo de la posición basal del esqueje, de tal manera que si se dañan algunas raíces, los esquejes enraizados sufren menos al ser removidos del sustrato (3).

La siguiente fórmula mejora el enraizamiento de las variedades que han presentado dificultades para enraizar. Para preparar 100 ml. de solución se disuelven 100 mg. de ácido indol-3 butírico (AIB) en gotitas de etanol al 96% y una solución acuosa 0.1 N de KOH. Por otro lado se disuelven 50 mg. de ácido naftalenacético (ANA) en gotitas de alcohol. Se mezclan estas dos partes y se les agrega 17.5 mg. de ácido bórico, luego 2 ml. de sulfóxido dimetílico (SODM) o "Tween 80". Se adicionan 33 ml. de etanol del 96% y 65 ml. de agua desionizada. El pH de la solución resultante debe ser llevado a 5.5 con KOH 1 N o HCl 1 N. Esta solución debe guardarse en refrigerador y se debe preparar una disolución fresca para tratar los esquejes producidos en un día. Para tal efecto se diluye una parte de la solución madre en cinco partes de agua destilada (4).

#### 4.4.5 Humedad del sustrato

Bryan, Jackson y Meléndez (3, 4, 5) recomiendan proporcionar sombra a los esquejes para prevenir la evapotranspiración excesiva y el marchitamiento, para lo cual sugieren colocar una tela blanca, con el fin de reflejar el calor. Según ellos nunca se debe permitir que los esquejes sufran estrés durante el proceso de enraizamiento y al hacer el trasplante no se debe eliminar el sustrato adherido a las raíces, ni permitir que éstas se sequen. Un exceso de agua inhibe la formación de las raíces, pues limita

la cantidad de oxígeno.

#### 4.4.6 Otros factores

La nutrición con fosfatos y nitratos, amonio o aminoácidos (asparagina y arginina) también pueden promover el enraizamiento (23).

La desinfección adecuada del medio de enraizamiento, del suelo y de los recipientes utilizados, así como el control de la cantidad de agua de riego, pueden ayudar a disminuir los problemas causados por Rhizoctonia solani y Pythium sp. Los fungicidas sistémicos como Benomyl (1000 ppm. de ingrediente activo) aplicados a la planta madre o al esqueje, o los carbamatos no sistémicos cuando se aplican al medio de enraizamiento o al suelo, pueden reducir las pérdidas ocasionadas por dichos microorganismos (4).

#### 4.5 Descripción de las técnicas de multiplicación rápida de la papa.

Según Bryan, Jackson y Meléndez (4), antes de iniciar un programa grande de multiplicación rápida "es esencial que se determine cuáles son las mejores técnicas para satisfacer las condiciones locales, incluyendo el clima, las variedades de papa y las instalaciones disponibles, así como las tasas de multiplicación esperadas y otros detalles de logística".

Hay varias técnicas de multiplicación rápida, pero solo se describirán las cuatro técnicas empleadas por el CIP. Para cualquiera de las técnicas se requiere observar estrictamente las normas de asepsia para prevenir la diseminación de virus por contacto y otras enfermedades.

Bryan, Jackson y Meléndez (2, 3, 4) indican los siguientes pasos:

- a. Lavar las manos y las cuchillas en una solución jabonosa fuerte o en otros productos químicos aprobados que tengan un pH alto.
- b. Usar otros productos químicos o métodos de acuerdo con los posibles problemas de enfermedades (virus que se transmiten por contacto, viroides, bacterias y hongos).
- c. Vestir ropa limpia que no haya estado en contacto con otras plantas.

Una buena combinación de productos para la desinfección del equipo es la inmersión en alcohol, más la exposición a llama, seguida de lavado en agua jabonosa y de inmersión en hipoclorito de calcio. Para la desinfección de las manos se usan estos dos últimos productos (4).

##### 4.5.1 Esquejes de brote

Según Bryan, Jackson y Meléndez (2, 4) la producción óptima de esquejes

tiene lugar cuando el tubérculo se expone alternativamente varios días a la oscuridad y varios días a la luz difusa, hasta que el brote se torne verde y tanto su longitud como la distancia entre los nudos faciliten el corte de los brotes.

El número de esquejes de brote se puede incrementar cortando el ápice de los brotes cuando éstos hayan alcanzado 2-3 cm. y sumergiéndolos en una solución de ácido giberélico (1-2 ppm). La tasa de multiplicación depende de la longitud del brote lateral, del tamaño del corte y de las habilidades de los operarios para hacer enraizar los pequeños esquejes. De cada tubérculo se pueden hacer dos o tres cosechas de brotes (2, 4).

Según Bryan, Jackson y Meléndez (2) el procedimiento es el siguiente:

- Se seleccionan cuidadosamente los tubérculos libres de patógenos sistémicos importantes. Estos deben haber sido desinfectados previamente. Si no están brotados, emplear los métodos recomendados por Bryan (1).
- Observar estrictamente los procedimientos de asepsia.
- Desbrotar los tubérculos, cortando los brotes con una navaja desinfectada. Dejar en el tubérculo una pequeña porción del brote si se desea otra cosecha de esquejes. Cuando no se necesita otra cosecha, se pueden quitar los brotes con la mano, dando a cada brote ramificado una flexión firme. Si va a sembrar el tubérculo, sólo haga una o dos cosechas.
- Seccionar los brotes en proporción de uno a dos nudos. Se requiere mucho cuidado para no dañar la yema que después de cortada, dará origen a un nuevo tallo o a rudimentos radicales: El esqueje debe tener por lo menos un rudimento caulinar y dos radicales para asegurar el crecimiento de la nueva plántula. Un tubérculo puede producir aproximadamente 40 esquejes de brote en cada cosecha, según el tamaño del tubérculo, el número de yemas y el manejo de los brotes.
- Preparar el sustrato, asegurándose que tenga un drenaje adecuado, lo que se consigue ubicando la capa de piedrecillas debajo de la arena fina.
- Plantar el esqueje en arena fina y húmeda. Se debe asegurar un buen contacto entre ella y el esqueje. La porción apical del esqueje debe sobresalir ligeramente en la arena fina. Los esquejes de las porciones apicales del brote, deben ser plantados aparte de los esquejes basales y medios, porque los primeros enraizan y crecen más rápidamente.
- Una vez los esquejes formen raíces y tallos (10 a 15 días después de la siembra), se deben transplantar a macetas, pero se deberá aplicar abono foliar dos días antes. Estos esquejes también podrán transplantarse en el campo. El fertilizante seco no deberá entrar en contacto directo con las raíces. La producción promedia en el campo es de 500 g. de tubérculos normales por planta.

#### 4.5.2 Esquejes de tallo Juvenil

Según Bryan, Jackson y Meléndez (4), se pueden hacer entre dos y diez cosechas sucesivas de tallos, dejando una nueva hoja en cada cosecha. La tasa de multiplicación depende del número de cosechas obtenidas de cada planta madre y puede ser de varios millares cuando este método se combina con el de esquejes de brote ..

Según Bryan et al (5) el siguiente es el procedimiento observado en el CIP.

La plántula madre debe proceder de brotes, de meristemas, esquejes de tallos, tubérculos o de semilla botánica y debe tener de 5 a 6 hojas.

Se deberán observar las normas de asepsia recomendadas y aplicar un fertilizante foliar dos o tres días antes de la cosecha de esquejes.

Con un bisturí o navaja asépticos, se corta el talluelo encima del nudo basal, sin dañar la yema axilar y dejando una hoja vigorosa .

Un papel toalla doblado sirve de soporte sólido para hacer un corte limpio y no herirse los dedos.

Después, el talluelo se corta cuidadosamente en secciones, cada una con una hoja y su yema axilar hacia el medio. Los esquejes apicales se hacen enraizar separados, porque crecen más rápido.

Inmediatamente después de cada corte del tallo, se debe aplicar a la planta madre un fertilizante líquido a base de N,P,K (12-14-12), a razón de 5 g/l y regando 50ml. de esta solución a cada maceta.

Se sumerge toda la porción del tallo del esqueje en una solución hormonal por 10 segundos, antes de sembrar los esquejes en el sustrato, los cuales no se deben plantar muy juntos para evitar que se traslapen las hojas y/o se entrelacen las raíces. Debe asegurarse que el tallo y el nudo queden cubiertos con arenay no sean expuestos después de varios riegos . La velocidad de enraizamiento y desarrollo depende de la variedad, la temperatura y el manejo.

Una planta con raíces adecuadas y 3 a 4 hojas (15 a 20 días después de la siembra) está lista para el transplante al campo.

#### 4.5.3 Esquejes de tallo lateral

Según Bryan, Jackson y Meléndez (3,4) un tubérculo puede producir entre 20 y 60 esquejes, cada uno de los cuales puede producir en el campo de 0.5 a 1.0 kg de tubérculos. Para obtener el máximo número de esquejes de tallo lateral, se toman tubérculos bien brotados (3 a 4 brotes por tubérculo) y se siembran superficialmente para promover el crecimiento aéreo de estolones. Se pueden hacer de 2-4 cosechas de cada planta madre. Las temperaturas moderadas y la fertilización abundante con N, estimulan la producción y el crecimiento rápido de los esquejes de tallo lateral, Días con más de 15 horas de luz aceleran el crecimiento de las ramas y de los esquejes, así como el desarrollo de las raíces (4).

Bryan, Jackson y Meléndez (3) indican el siguiente procedimiento:

Use los mejores tubérculos disponibles para producir la planta madre inicial. Lo ideal es que posean de tres a cuatro brotes verdes para asegurar una emergencia rápida. Mantenga estas plantas bien fertilizadas.

Los tubérculos se siembran profundos en macetas con buen drenaje y se cubren con poca tierra. El aporque se debe realizar una vez que los estolones se vuelvan aéreos para maximizar el crecimiento de la parte superior de la planta.

Mantenga en forma estricta los procedimientos de asepsia ya indicados.

Elimine el punto de crecimiento apical de cada tallo cuando la planta madre alcance de 25 a 30 cm. de altura. El despunte puede hacerse con pinzas o con los dedos.

La cosecha de esquejes se puede hacer entre los 15 y 20 días después del despunte apical. Las cosechas sucesivas se hacen con intervalos de 12 a 15 días.

Para obtener los esquejes se coloca la cuchilla en ángulo recto y se hace un corte limpio y firme. El papel toalla ayuda en esta labor. El corte se hace cerca a una yema axilar sin dañarla.

Los esquejes deben tener de 12 a 15cm. de largo. En lo posible se deben dejar de 4-5cm. de tallo debajo del primer nudo. Los esquejes podrían ser almacenados en refrigerador a 4-6°C por dos días.

Se debe aplicar a la planta madre un fertilizante adicional en forma líquida después del despunte y de cada cosecha de esquejes.

Se disuelven 5g. de un fertilizante de grado 12-14-12 o de grado similar en un litro de agua y se aplican 150ml. de esa solución por planta. La segunda y subsiguientes cosechas de esquejes producirán de 30 a 60 por ciento más que la primera, debido al nuevo crecimiento de tallos y al desarrollo de nudos dobles.

El sustrato ideal es arena de uno a dos milímetros, humedecida y compactada antes de siembra. Los agujeros para los esquejes son hechos a 5cm. en cuadro y deben tener aproximadamente 4cm de profundidad.

Cuando es necesario los esquejes son sumergidos en una solución hormonal de enraizamiento. La duración de la inmersión depende de la hormona y de la variedad. Su uso no siempre es recomendado.

Coloque los esquejes en los hoyos. Observe que el primer nudo quede encima de la superficie de la arena durante el enraizamiento. Presione con los dedos el sustrato contra el esqueje para asegurar un buen contacto.

Si no se usó hormona, se recomienda regar inmediatamente después de la siembra; en caso contrario, espere dos o tres horas. Los riegos deben ser ligeros y frecuentes. Es recomendable sombrear los esquejes mediante el empleo de una tela blanca para reflejar el calor y evitar la evapotranspiración excesiva.

El esqueje está enraizado y listo para el transplante catorce días después

de sembrado. No se debe eliminar el sustrato adherido a las raíces y no permita que éstas se sequen.

#### 4.5.4 Esquejes de tallo adulto

Se pueden obtener de toda planta que empieza la senectud. Las plantas madres deben crecer bajo condiciones de días largos (15-18 horas de luz), para promover el máximo crecimiento de las ramas. Dos semanas antes de cosechar los esquejes, es necesario reducir la duración de los días a 10-13 horas de luz para favorecer el desarrollo de los tubérculos. No se usan hormonas de enraizamiento. Se debe establecer el día de menor horas luz que sea posible, ya que este factor tiene efecto directo en el número y tamaño de los tubérculos producidos. Las variedades que son indiferentes a la duración del día son menos afectadas que las demás (4).

Los tubérculos de 0.5 a 1.0 cm de diámetro, se cosechan cuando todas las hojas han muerto. Las tasas de multiplicación dependen del número de tallos cosechados a partir de la planta madre, pero en general se pueden producir entre 100 y 120 tuberculillos por planta madre. Cuando se siembran en el campo, cada uno de los tuberculillos puede producir hasta 0.5 kg. de tubérculos comunes (4).

Los tuberculillos más pequeños se deben descartar. Como la ruptura de la latencia es tan difícil, lo más conveniente es almacenarlos por cuatro a seis meses en condiciones frías o en refrigerador a 4 °C, con humedad relativa del 90 por ciento (4)'.  
(4)'

Según Quevedo et al (17) el procedimiento para el cultivo de esquejes de tallo adulto es el siguiente:

Selección de las plantas madres. La planta óptima es la que empieza la senescencia, lo cual se nota por el amarillamiento de las hojas basales. Los mejores esquejes son los de la parte media.

Tenga en cuenta todas las recomendaciones de asepsia. Corte los tallos por la base, 2-3 cm. por encima del suelo, fracciones los esquejes que contengan una hoja y su yema y cuyos tamaños no excedan de los 3 cm. La yema debe quedar en el centro del esqueje. Seleccione los esquejes a utilizar .

Siembre los esquejes lo más rápido posible para evitar deshidratación, cúbralos con papel toalla humedecido. La porción de tallo de los esquejes se coloca en la arena fina (1.0mm.) bien drenada, con la yema debajo y la hoja encima de la superficie. La siembra debe hacerse en surcos y la distancia puede variar según el tamaño de las hojas, pues debe evitarse el trasplante. Debe presionarse un poco el sustrato para que haya un buen contacto entre éste y el esqueje.

Riegue ligeramente para mantener una humedad adecuada. En días calurosos se debe sombrear los esquejes para evitar pérdida excesiva de humedad y prevenir el marchitamiento de la hoja.

A las dos semanas empieza la formación de tuberculillos y la cosecha se

hace cuando las hojas están muertas, cuatro a seis semanas después de la siembra. Si muchos de los esquejes no forman un tuberculillo adecuado, determine las causas.

Una vez brotados los tuberculillos se siembran en el campo. Un solo brote es suficiente y deberá tenerse mucho cuidado para evitar que éste se dañe, pues la formación de un nuevo brote es muy lenta. La distancia entre plantas en el surco depende de la variedad, las condiciones del suelo y el tamaño del tubérculo deseado, pero generalmente no es más de 20 cm.

#### 4.6 Esquema integral de la multiplicación rápida en papa

Bryan, Jackson y Meléndez (4) proponen el siguiente esquema:

## UN ESQUEMA INTEGRAL DE LA MULTIPLICACION RAPIDA EN PAPA

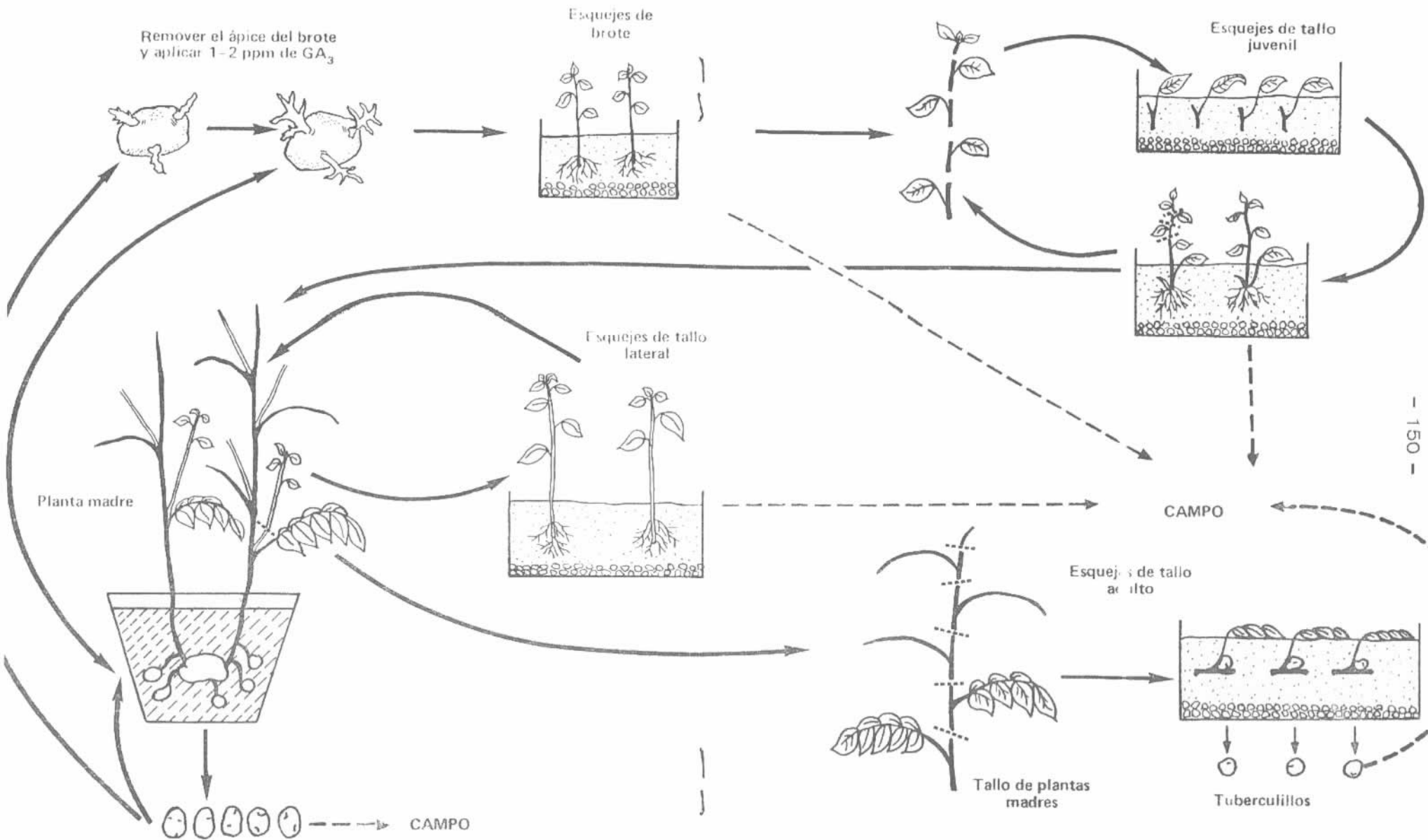


Diagrama de flujo que muestra las posibilidades existentes al utilizar diversas técnicas de multiplicación

rápida, sea que se emplee una técnica en forma independiente o varias de ellas en combinación.

#### 4.7 Manejo de los esquejes

Según Bryan, Jackson y Meléndez (4) una vez se desarrollan las raíces, los esquejes deberán ser transplantados a macetas en el invernadero o directamente al campo. El trasplante es crítico, pues no poseen tubérculos que les proporcionen nutrimentos, mientras las raíces llegan a ser capaces de absorberlos juntamente con el agua. Al momento del trasplante se debe evitar el exceso de raíces y de crecimiento aéreo. Las yemas axilares subterráneas originan los estolones, razón por la cual es conveniente al momento del trasplante cubrir con el suelo al menos dos nudos. Otros nudos pueden cubrirse mediante aporque temprano.

##### 4.7.1 Manejo en el invernadero

Según Bryan, Jackson y Meléndez (4) para lograr un uso más eficiente del espacio disponible en el invernadero, se transplantan 3-4 esquejes en una maceta de 20 x 20 cm. El fertilizante foliar promueve el crecimiento temprano y vigoroso, por lo tanto es conveniente emplear fertilizante foliar tres días antes del trasplante y repetir la aplicación una a dos semanas después del mismo.

##### 4.7.2 Manejo en el campo

Bryan, Jackson y Meléndez (4) recomiendan los siguientes cuidados:

###### 4.7.2.1 Preparación del suelo

El suelo debe estar bien preparado y sin terrones, húmedo pero no saturado. Se deben cubrir las raíces húmedas con suelo húmedo y luego aplicar un riego para que se de un buen contacto suelo-raíz, sin exceso de presión.

###### 4.7.2.2 Agua

Se debe evitar el exceso de irrigación, pues éste inhibe la formación de raíces y causa la formación de costras en el suelo.

###### 4.7.2.3 Fertilizante

El fertilizante deberá colocarse cercano a la raíz, pero que no quede en contacto con éstas. Es conveniente aplicar fertilizante foliar tres días antes del trasplante. Los fertilizantes solubles en agua y que contengan una dosis alta de P (10-52-10 y 10-50-17) aplicados en el primer riego, promueven el crecimiento rápido del sistema radical.

#### 4.7.2.4 Distancias de siembra

La distancia de siembra depende del tamaño deseado para los tubérculos que se van a producir. Por cada esqueje hay un solo tallo, por lo tanto se debe usar un espaciado uniforme y compacto entre plantas. El aporte temprano cubre otros nudos y produce estolones adicionales que incrementarán los rendimientos.

#### 4.7.2.5 Pesticidas

En esta etapa es esencial el control de insectos dañinos. Los esquejes libres de virus deben ser protegidos con insecticidas sistémicos granulares (Furadán 3 G) aplicados al momento de la siembra para prevenir el ataque de áfidos en el campo. Los insectos del suelo como los trozadores deberán ser controlados con insecticidas de contacto o cebos, aplicados al momento de la siembra.

Los fungicidas para el suelo como Benomyl o los carbamatos sirven para controlar Rhizoctonia solani y Pythium sp.

#### 4.7.2.6 Tamaño de los tuberculillos de esqueje de tallo adulto

La profundidad de siembra debe estar correlacionada con el tamaño de los tuberculillos. Mientras mas pequeño sea el tuberculillo, menor será la profundidad de siembra.

APENDICE

Solución basal para el cultivo de meristemas (14)

Constituyentes	mg/l	mm
$\text{KNO}_3$	1900	18.8
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	20.6
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	3.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	370	1.5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	1.25
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	22.3	0.10
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	8.6	0.03
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2	0.10
KI	0.83	0.005
$\text{NaMnO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.25	0.001
$\text{CoCl}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0001
$\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0001
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	27.8	0.1 (como quelato)
Tiamina	0.4	5.92
Mianositol	100	555.06

Este medio basal es complementado con sacarosa, hormonas, vitaminas y agar, según la utilización.

BIBLIOGRAFIA

1. BRYAN, J. 1983. Ruptura del período de reposo de tubérculos de papa. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 14 p.
2. \_\_\_\_\_, MELENDEZ, N. y JACKSON, M. 1981. Esquejes de brote, una técnica de multiplicación rápida de papa. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 10p.
3. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ y \_\_\_\_\_. 1981. Esquejes de tallo lateral, una técnica de multiplicación rápida de papa. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 16p.
4. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ y \_\_\_\_\_. 1981. Técnicas de multiplicación rápida de papa. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 20p.
5. BRYAN, J. et al. 1981 Esquejes de tallo juvenil, una técnica de multiplicación rápida de papa. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 8p.
6. CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP). 1983. Producción de semilla mediante cultivo de tejidos. CIP circular 11 (2) 4p.
7. \_\_\_\_\_. 1976. Seed production technology for development countries. Annual Report. Lima, Perú. pp. 67-78.
8. \_\_\_\_\_. 1975. Seed production technology for development countries. Annual Report. Lima, Perú. pp. 69-76.
9. ESPINOSA, N. et al. 1984. Tissue culture micropropagation, conservation and export of potato germoplasm. International Potato Center (CIP). Lima, Perú. 20p.
10. GUERRERO, A. y MARTINEZ, L.G. 1980. Evaluación de pérdidas ocasionadas en la variedad de papa ICA- Puracé por los virus "Potato Virus X", "Potato Y" y "Potato Leafroll Virus". Fitopatología colombiana. 9 (11) : 33-40.
11. HARTMAN, H.T. y KESTER, D.E. 1981. Propagación de plantas, Principios y prácticas. 2 ed., CECSA, Méjico. 814p.
12. INOSE, K. 1971. Pumice as a rooting medium. The International Plant Propagator Society. 21: 82-83.
13. MELENDEZ, N. y QUEVEDO, M. 1980. Técnicas de multiplicación rápida de papa. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. pp.69-76.
14. MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays of tabaco tissue cultures. Physiological Plantarum 15: 135-166.
15. NAVARRO, R., ZAPATA, J.L. y TAMAYO, P.L. 1984. Observaciones sobre la transmisión del virus del amarillamiento de venas de la papa (VAVP). Ascolfi Informa. 10(4): 34.

16. NGUYEN Van UYEN, 1984. Nueva aplicación de cultivo de tejidos y de multiplicación rápida. Producción de papa por agricultores vietnamitas. CIP circular, 11 (1): 7-10.
17. QUEVEDO, M. et al. 1981. Esquejes de tallo adulto, una técnica de multiplicación rápida de papa. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. 11p.
18. ROCA, W. 1980. El cultivo de meristemas de yuca. Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, 40p.
19. \_\_\_\_\_ y JAYASINGUE, U. 1982. El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca. Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 47p.
20. SCHILDE, L. 1980. Virus eradication through tissue culture techniques. In: Report of the planning conference on the strategy for virus management in potatoes II. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. 163p.
21. \_\_\_\_\_ y SCHMIEDICHE, P. 1984. El cultivo de tejidos: su pasado, presente y futuro. CIP circular, 11 (1): 1-6.
22. TAMAYO M., P.L. y NAVARRO., R. 1984. Aumenta la incidencia del virus del amarillamiento de venas de la papa en Antioquia. Ascolfi Informa: 10 (5): 40-42.
23. THIMANN, K.V. 1979. The auxins. In: Physiology of plant growth and development. Wilkins Editor. M.B.T.U.H. La India, pp.3-45.