

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA**

**PRODUCCION DE PLANTAS DE PAPA
(*Solanum tuberosum L. v.r. Loman*)
LIBRES DE LOS VIRUS X, Y y S,
A TRAVES DEL CULTIVO MERISTEMOS
Y EL USO DE TERMOTERAPIA
APLICADA A PLANTAS ENFERMAS CON ESTOS VIRUS**

TESIS

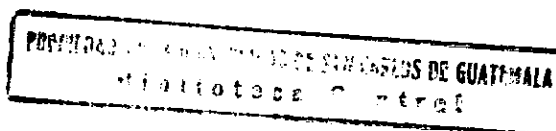
PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE AGRONOMIA

POR

BYRON MANUEL ZUÑIGA CASTILLO

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO
INGENIERO AGRONOMO
EN SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA
EN EL GRADO ACADEMICO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS AGRICOLAS

Guatemala, octubre de 1990



DL
01

T(1187)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

DR. ALFONSO FUENTES SORIA

JUNTA DIRECTIVA DE LA

FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO: ING. AGR. ANIBAL B. MARTINEZ M.
VOCAL PRIMERO: ING. AGR. GUSTAVO ADOLFO MENDEZ.
VOCAL SEGUNDO: ING. AGR. EFRAIN MEDINA G.
VOCAL TERCERO: ING. AGR. WOTZBELI MENDEZ ESTRADA.
VOCAL CUARTO: P. AGR. ALFREDO IZTEP.
VOCAL QUINTO: P. AGR. MARCO TULIO SANTOS
SECRETARIO: ING. AGR. ROLANDO LARA ALECIO.

Guatemala, 22 de octubre de 1990

SEÑORES JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE AGRONOMIA

De conformidad con las normas establecidas en la ley orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración el trabajo de tesis titulada:

PRODUCCION DE PLANTAS DE PAPA
(Solanum tuberosum L. v.r. Loman)
LIBRES DE LOS VIRUS X, Y y S,
A TRAVES DEL CULTIVO MERISTEMOS
Y EL USO DE TERMOTERAPIA
APLICADA A PLANTAS ENFERMAS CON ESTOS VIRUS

Presentado como requisito previo a optar el título de **Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola**, en el grado académico de Licenciado.

Esperando contar con la aprobación del mismo.

Atentamente,



P.A. Byron Manuel Zuñiga Castillo

TESIS QUE DEDICO:

A DIOS: Fuerza creadora de la vida, que me dió el conocimiento y las herramientas necesarias para conocer y transformar el mundo.

A MIS PADRES: Emma Elizabeth Castillo de Zuñiga, Manuel de Jesús Zuñiga Cáceres, Fundadores de la cimiento, que con esfuerzos y sacrificios guiaron la senda de mi camino.

A MIS HERMANAS: Norma y Yohana.
Que juntos caminamos hacia el futuro.

A MI ABUELA: Rosa Amanda Castillo, por su carino y comprension.

A MIS AMIGOS: Que juntos compartimos una fraternal amistad.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES A:

Samuel Córdova, Manuel Tum, Fernando Rodríguez, Marino Barrientos,
Víctor Cajas, Edgar Franco, Negli Gallardo, Salvador Sánchez,
Stephen Elliott (CIRMA) y a todas aquellas personas
que de alguna manera colaboraron
en la realización de este trabajo de tesis.

**JUNTOS HAREMOS
UNA GUATEMALA Y UNA UNIVERSIDAD
MEJOR.**

INDICE

Contenido	Página
Indice de Cuadros	iii
Indice de Cuadros del Apéndice	iv
Indice de Figuras	vi
Abreviaturas	vii
Resumen	viii
I. Introducción	1
II. Hipótesis	3
III. Objetivos	4
IV. Revisión de literatura	5
1. La papa	5
1.1. Características botánicas de la papa	5
2. Origen de la papa	6
3. Importancia de la papa	7
4. Tipos de papa cultivadas en el mundo	7
5. Importancia de la papa en Guatemala	8
5.1. Zonas de producción	8
5.2. Variedades presentes	9
6. Enfermedades de la papa	11
6.1. Enfermedades causadas por virus	11
6.2. Diagnostico de los virus	12
6.3. Enfermedades viróticas importantes para Guatemala	14
6.4. Insectos responsables en la transmisión de los virus	17
7. El cultivo de tejidos vegetales	18
7.1. Cultivo de meristemos	19
7.2. Adaptación de plantas libres de virus al campo	23
7.3. Inducción a formación de tubérculos	24

Contenido	Página
V. Metodología	25
1. Localización y características del área experimental	25
2. Materiales y reactivos	25
3. Metodología experimental	26
3.1. Manejo del experimento	26
3.2. Condiciones de cultivo	27
3.3. Aplicación de termoterapia	28
3.4. Extracción de meristemos	28
3.5. Aplicación de la técnica ELISA	29
3.6. Metodología para la inducción a la formación de tubérculos	29
3.7. Variables respuesta	30
VI. Resultados y discusión	33
1. Establecimiento del material para la extracción de meristemos	33
2. Plantas libres de los virus X, Y y S, por el cultivo de meristemos	35
3. Plantas procedentes de esquejes enfermos con los virus X, Y y S, sometidos a termoterapia, antes de la extracción de meristemos	36
4. Análisis entre metodologías	38
5. Análisis particular entre cada virus y entre métodos	41
5.1. Análisis para el virus X	41
5.2. Análisis para el virus S	42
5.3. Análisis para el virus Y	42
6. Inducción a la formación de tubérculos	43
6.1. Análisis en base al número de tubérculos	43
6.2. Análisis en base a peso de tubérculos	45
VII. Conclusiones	47
VIII. Recomendaciones	48
IX. Bibliografía	49
X. Apéndice	53

INDICE DE CUADROS

Cuadro Nº	Página
1. Resultados de las esquejes analizadas por medio de la prueba serológica ELISA, antes y después del estudio en función de la presencia o ausencia de los virus X.	34
2. Resultado de plántulas libres de los virus X, Y y S producto de la extracción de meristemos a plantas infectadas con éstos.	35
3. Resultado obtenido del tratamiento de estacas sometidas a termoterapia seguidas de la extracción de meristemos en la producción de plántulas libres de los virus X, Y y S.	37

INDICE DE CUADROS DEL APENDICE

Cuadro N°	Página
1. Medio nutritivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) adicionado con 0.25 ppm de ácido giberelico, 2 ppm de Acido D-pantoténico de calcio, 3% de sacarosa y 0.6 % de agar. y Composición del medio para inducción a tubérculillos, tomada de Estrada, <i>et al.</i> 1986.	55
2. Prueba de Q de COCHRAN; análisis de la relación entre cada uno de los virus estudiados y el tratamiento de meristemos.	58
3. Prueba de Q de COCHRAN: análisis de la relación entre virus presentes en los meristemos extraídos de esquejes previamente sometidos a termoterapia, y su relación con el método.	59
4. Prueba de la probabilidad exacta de Fisher, en el análisis de las proporciones de plantas sanas obtenidas, a través del subcultivo de esquejes de plantas enfermas de los virus X, Y y S para los tratamientos de solo extracción de meristemos, y aplicación de termoterapia previo a la extracción de meristemos.	60
5. Datos tabulados de las plantas sanas y enfermas de el virus X obtenidas de los tratamientos de cultivo de estacas "in vitro" seguidas de la extracción de meristemos, y de termoterapia aplicada a estacas cultivadas "in vitro" seguidas del cultivo de meristemos, para la prueba de probabilidad exacta de FISHER.	61
6. Datos tabulados de las plantas sanas y enfermas de el virus S obtenidas de los tratamientos de cultivo de esquejes cultivados in vitro seguidas de la extracción de meristemos, y de termoterapia aplicada a esquejes cultivados in vitro antes de la extracción de sus meristemos para la prueba de probabilidad exacta de FISHER.	62

7. Datos tabulados de las plantas sanas y enfermas de el virus Y obtenidas de los tratamientos de cultivo de esquejes subcultivados in vitro seguidas de la extraccion de meristemas, y del tratamiento de termoterapia aplicada a esquejes cultivadas in vitro antes de al extraccion de sus meristemas, para la prueba de χ^2 63
8. Datos tabulados de las plantas sanas y enfermas de el virus Y obtenidas de los tratamientos de subcultivo de esquejes in vitro ante de la extraccion de sus meristemas, y de termoterapia aplicada a esquejes subcultivadas in vitro antes de la extracción de sus meristemas, segun tabla de contingencia de la prueba de χ^2 64
9. Resultado del número de tubérculos inducidos por los tratamientos de Bencil aminopurina, al evaluar su efecto en la inducción en cuanto a número. 65
10. Análisis de varianza para el promedio de tubérculos producidos en el medio M.S. suplementado con 500 ppm de CCC. y los tratamientos con Bencil aminopurina en los rangos de 0 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 7.5 ppm y 10 ppm. . . 66
11. Análisis de la prueba de Tukey's en relación a las medias del de número de tubérculos bajo diferentes concentraciones de BAP, en un medio M.S. suplementado con 500 ppm de CCC. y los tratamientos con Bencil aminopurina en los rangos de 0 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 7.5 ppm y 10 ppm establecido para la induccion de tuberculillos. 67
12. Resultado de la media del peso de tubérculos en gramos por los tratamientos de Bencil aminopurina, al evaluar su efecto en la inducción en cuanto la media de pesos por tratamiento. 68
13. Análisis de varianza para el promedio de peso de tuberculos producidos en el medio M.S. suplementado con 500 ppm de CCC. y los tratamientos con Bencil aminopurina en los rangos de 0 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 7.5 ppm y 10 ppm. 69
14. Análisis de la prueba de Tukey's en relación a las medias del peso de tubérculos obtenidos bajo diferentes concentraciones de BAP, en un medio M.S. suplementado con 500 ppm de CCC. y los tratamientos con Bencil aminopurina en los rangos de 0 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 7.5 ppm y 10 ppm. establecido para la inducción de tuberculillos. 70

INDICE DE FIGURAS

Figura N ^o	Página
1. Proporciones de plantas de papa <i>Solanum tuberosum</i> L. v.r. <i>Loman</i> sanas de los virus X, Y y S, obtenidas de la extracción de meristemos y del tratamiento de aplicación de termoterapia antes de la extracción de meristemos, a plantas enfermas de los virus X, Y y S cultivadas in vitro. . . .	39
2. Número de tubérculos de papa producidos por diferentes concentraciones de Bencil aminopurina (BAP), al evaluar las concentraciones de 0 pp, 2.5 ppm, 5 ppm, 7.5 ppm y 10 ppm.	44
3. Peso de tubérculos de papa alcanzados por los diferentes tratamientos de Bencil aminopurina al ser cultivados in vitro.	46

ABREVIATURAS

A°	Angstrons
ADN	Acido Desoxirribonucleico
AMV	Alfalfa mosaic virus (virus del mosaico de la alfalfa)
ARN	Acido ribonucléico
ANDEVA	Análisis de Varianza
BAP	Bencil aminopurina
CCC	Cloruro de Clorocolina
CIP	Centro Internacional de la Papa
°C	Grados centígrados
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (Ensayo immunoabsorbente de enzimas ligadas)
FAUSAC	Facultad de Agronomía
GA ₃	Acido giberélico
HO	Hipótesis nula
HA	Hipótesis alternativa
ICTA	Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola
m	metro
mm	milímetro
ms	metros
msnm	metros sobre el nivel del mar
M.S.	Medio Murashige y Skoog
nn	nanómetro
NOPAR	no paramétrico (se refiere a un término estadístico)
PAR	parametrico (se refiere a un termino estadístico)
PLRV	Potato Leaf Roll Virus (Virus del enrollamiento de la papa)
ppm	partes por millon
PVA	Potato virus A (Virus A de la papa)
PVM	Potato Virus M (Virus M de la papa)
PVS	Potato Virus S (Virus S de la papa)
PVX	Potato Virus X (Virus X de la papa)
PVY	Potato Virus Y (Virus Y de la papa)
SAS	Prueba estadística de Varianza.
TMW	Tabacco mosaic virus (Virus del mosaico del tabaco)
Ton/Ha	Toneladas por hectárea
v.r.	variedad
%	porciento

PRODUCCION DE PLANTAS DE PAPA
(Solanum tuberosum L. v.r. Loman)
LIBRES DE LOS VIRUS X, Y y S,
A TRAVES DEL CULTIVO MERISTEMOS
Y EL USO DE TERMOTERAPIA
APLICADA A PLANTAS ENFERMAS CON ESTOS VIRUS

PRODUCTION OF POTATO PLANTS
(Solanum tuberosum L. v.r. Loman)
FREE FROM VIRUSES X, Y AND S,
BY MERISTEM CULTURE AND THERMOTHERAPY
APPLIED ON INFECTED PLANTS

RESUMEN

En Guatemala, la papa constituye un alimento que forma parte de la dieta alimenticia del guatemalteco, y al igual que el frijol y el maíz ocupa un lugar importante en la dieta del guatemalteco como fuente de carbohidratos.

Sin embargo, el cultivo de la papa se ve limitado debido a la presencia de una gran gama de enfermedades, dentro de las cuales, las que son causadas por virus juegan un papel muy importante en la reducción de los rendimientos.

La mayor parte de las áreas en las cuales se cultiva papa en nuestro país están infectados por virus, principalmente de los tipos X, Y, S y PRLV. Esto se debe a que no existe semilla libre de virus, ni se dispone de una metodología aplicada a nuestras condiciones que permita tener clones sanos.

El presente trabajo constituye investigación básica para producir plantas libres de los virus X, Y y S en nuestro país, a partir del cultivo de meristemos y del tratamiento con termoterapia antes de la extracción de meristemos a plantas enfermas cultivadas in vitro.

Los resultados obtenidos muestran una tendencia a obtener porcentajes mas altos de plantas sanas mediante el tratamiento con termoterapia, la que favorece la eliminación del virus S. Sin embargo el análisis estadístico nos indica que las proporciones en las metodologías empleadas son iguales.

Teóricamente se prevee que existió una dilución de los virus al clonar las plantas enfermas y extraerles posteriormente sus meristemos, por cualquiera de los dos métodos. Este fundamento se apoya en la hipótesis expresada por Limmasser Y Counvert en 1949 (22), en ésta hipótesis, los autores plantean que la concentración de

virus varía de acuerdo a la posición del meristemo y la edad de éste. Al clonar las plantas se prevee que en cada clonaje existe una dilución del virus, debido a que cada vez que se toman las partes jóvenes de las plantas, cada nuevo explante tendrá en relación al anterior una menor concentración de virus. Las partes mas cercanas a los meristemos (jóvenes) teóricamente tienen menor concentración de virus en su estructura.

Para preservar las plantas sanas obtenidas se indujo la formación de tuberculillos, para lo cuál previamente se evaluó el efecto de 0 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 7 ppm, y 10 ppm de Bencil aminopurina (BAP) en la inducción de tubérculos para lo cual se evaluó el número y peso de tubérculos producidos a los 40 días de tratamiento. Se observó que el tratamiento de 10 ppm de BAP induce el mayor número de tubérculos y que existe un efecto directamente proporcional en función del número y la dosis de BAP. Los mejores pesos por tubérculo se obtuvieron en los tratamientos que presentaron las medias de número menor, siendo el tratamiento de 2.5 ppm el que mejor peso por tubérculo presentó.

I. INTRODUCCION

La papa en Guatemala constituye un alimento muy consumido por la población, sus usos son variados y al igual que el maíz y frijol constituyen parte importante en la dieta básica alimenticia.

El rendimiento de este cultivo se ve seriamente afectado debido a que en Guatemala no se cuenta con semilla libre de los virus X, Y, S y PRLV que pueda ofrecerse a los agricultores. Estos virus se encuentran diseminados por toda el área donde se siembra papa en Guatemala (12, 13 y 14).

La principal fuente de contaminación la constituye la semilla que el agricultor utiliza y la falta de un riguroso control en la producción de semilla en los programas nacionales.

Se ha demostrado que a través del cultivo de meristemas *in vitro* es posible obtener plantas libres de virus, las cuales pueden ser reproducidas masivamente y ser utilizadas como semilla libre de estos patógenos. Alternativa que esta tomando liderazgo en muchos países.

En Guatemala no se producen plantas libres de virus a través del cultivo *in vitro*. Por medio de programas nacionales se recolectan plantas enfermas de virus y se envían al Centro Internacional de la Papa (CIP) localizado en el Perú. Esta institución realiza el procedimiento de eliminación de virus y retorna en tubos de ensayo las plantas libres de estos patógenos.

La presente investigación es una variante de la metodología utilizada por el CIP con el objeto de contribuir con investigación básica en este aspecto. La variante metodológica consistió en recolectar plantas enfermas de los virus X, Y y S, del campo. Estas plantas fueron analizadas por medio de la prueba serológica ELISA, las plantas positivas se cultivaron *in vitro* utilizando esquejes de 1 cm. de tamaño, los cultivos de plantas enfermas fueron divididos en dos grupos, a un grupo solo se le extrajo sus

meristemas, y a el otro grupo se le aplicó un tratamiento de 32 días con termoterapia antes de la extracción de los meristemas.

El análisis de los resultados se realizó utilizando estadística no paramétrica. Las pruebas utilizadas fueron: la prueba de Q de Cochran para el análisis de las proporciones obtenidas por cada método; las pruebas de probabilidad exacta de Fischer y la prueba de Ji cuadrado (χ^2) para comparar las proporciones obtenidas con los dos métodos empleados.

Los resultados de esta investigación muestran una proporción estadísticamente igual en la obtención de plantas sanas, de los virus X, Y y S, cuando son cultivados esquejes enfermos con estos virus y se someten a las pruebas de solo extracción de meristemas y al efecto de la termoterapia como agente liberador de los virus antes de la extracción de los meristemas. Sin embargo los análisis porcentuales tienen una tendencia a ser mas altos en los tratamientos con termoterapia.

Para preservar las plantas liberadas se evaluó la inducción a formación de tuberculillos, en un medio líquido con las sales básicas de MURASHIGE Y SKOOG (1962), para lo cual se evaluó el efecto de varias dosis de Bencil aminopurina en la inducción a tuberculillos, obteniendose el mejor tratamiento con 10 ppm de BAP en la inducción de número de tubérculos y el tratamiento de 2.5 ppm de BAP para el mayor peso.

II. HIPOTESIS

1. Cuando se cultivan in vitro meristemas derivados de plantas de papa *Solanum tuberosum* L. v.r. *Loman* infectados de los virus X, Y y S, la proporción de plantas libres de cada virus no será estadísticamente diferente.
2. Cuando se aplica termoterapia antes de extraer sus meristemas a plantas de papa *Solanum tuberosum* L. v.r. *Loman* infectadas de los virus X, Y y S, la proporción de plantas libres de cada virus no será estadísticamente diferente.
3. Al cultivar in vitro meristemas derivados de plantas de papa *Solanum tuberosum* L. v.r. *Loman* infectadas de los virus X, Y y S, la proporción de plantas libres de éstos no será estadísticamente diferente entre el uso de solo la extracción de meristemas versus la aplicación de termoterapia antes de la extracción de meristemas.

III. OBJETIVOS

1. GENERALES

- 1.1. Evaluar la eficiencia en la producción de plantas de papa *Solanum tuberosum* L. v.r. *Loman* libres de los virus X, Y y S obtenidas por el cultivo in vitro de meristemos provenientes de plantas infectadas con estos virus.

2. ESPECIFICOS

- 2.1. Evaluar la eficiencia en la producción in vitro de plantas de papa *Solanum tuberosum* L. v.r. *Loman* libres de los virus X, Y y S obtenidas a partir de la extracción de meristemos de plantas infectadas con estos virus.
- 2.2. Evaluar la eficiencia en la producción in vitro de plantas de papa *Solanum tuberosum* L. v.r. *Loman* libres de los virus X, Y y S obtenidas de la aplicación de termoterapia antes de la extracción de meristemos de plantas infectadas con estos virus.
- 2.3. Comparar la eficiencia de la metodología de solo extracción de meristemos y uso de termoterapia antes de la extracción de meristemos en la producción de plantas de papa *Solanum tuberosum* L. v.r. *Loman* libres de los virus X, Y y S.

IV. REVISION DE LITERATURA

1..LA PAPA

La papa *Solanum tuberosum* L. es una planta dicotiledónea, con características anuales, potencialmente perenne, pertenece a la familia Solanaceae. Se cultiva en regiones frías o templadas a altitudes de 2,000 metros sobre el nivel del mar (msnm). Su reproducción es típicamente asexual, realizándose por medio de tubérculos, los cuales constituyen la parte comestible de la planta. El tubérculo se forma subterráneamente en el extremo de un estolón, al existir proliferación de tejido de reserva. Mediante este método se producen plantas genéticamente idénticas, por lo que muchos de los cultivares conocidos son clones con baja variabilidad genética (12, 13, 14).

1.1. CARACTERISTICAS BOTANICAS

Existe una gran variedad de subespecies y cultivares que poseen características particulares, de las cuales algunas están claramente diferenciadas y otras aún conservan la propiedad de poderse mezclar. Los aspectos generales se definen a continuación:

Flores: posee flores pentámeras de colores diversos, ovario binocular, estilo y estigma simple, con autopolinización natural.

Frutos: posee frutos binoculares, generalmente estériles, redondos de color verde a castaños.

Tallo: posee tallos de forma angular, herbáceos cuando jóvenes y leñosos cuando adultos.

Hojas: presenta tres tipos de hojas; las primarias y las que provienen de tubérculos que son de tipo simple; las que se presentan cuando la planta se ha establecido de tipo pinnadocompuestas; y las que se originan del tallo subterráneo que tienen forma de escama, de las cuales a través de las yemas axilares emergen los estolones.

Raíces y estolones: provienen del tallo subterráneo. Si la planta sembrada proviene de semilla botánica poseerá una raíz principal delgada, fibrosa, en cambio si procede de un tubérculo el sistema radicular será un sistema fibroso lateral (6,4,17,).

2. ORIGEN DE LA PAPA

El origen de la papa se sitúa en la región Andina de Suramérica, en las altas mesetas de la cordillera de los Andes (6, 4,30). Se cree fue cultivada a la vecindad del lago TITICACA en los bordes de Perú y Bolivia (4).

Ducreux (6) encontró documentos arqueológicos y étnicos que señalan que las poblaciones andinas al sur del Perú empezaron a comer papas silvestres 3 a 4 mil años antes de nuestra era, produciéndose su domesticación antes de la llegada de los Incas.

La papa fue diseminada a casi todo el mundo desde sudamérica, introduciéndose a Europa hacia el año 1570, luego a Irlanda. Sin embargo la aceptación de la papa no fue del todo buena al considerarse que era alimento para animales, mendigos, e incluso se creía que producía Lepra. Actualmente su consumo se ha popularizado y forma la base de la dieta de muchos países en el mundo. Hasta el grado que 1840 su escases causo hambrunas extremas que provocaron la muerte de millares de personas en Irlanda, suceso conocido como " la hambruna de la papa", a causa de la susceptibilidad de los clones al hongo *Phytophthora infestans* (Tizón tardío), hongo que se constituyó en el causal de la enfermedad más importante de la papa en el mundo (6,4).

3. IMPORTANCIA DE LA PAPA.

La papa ocupa el quinto lugar entre los principales cultivos alimenticios del mundo, superada por el trigo, arroz, maíz y cebada. Su rendimiento en proteína excede en los factores siguientes a estos cultivos: trigo 2.2, arroz 1.33, maíz 1.20 (4, 16).

La papa constituye una fuente rica en almidón (fécula), que es la fuente de materia prima para producir dextrina, harina para galletas, repostería, pastelería, aguardiente como el Vodka o el Aguavit, excipiente para comprimidos, producción de engrudo, fabricación de papel como el Couche, Kraft, la fabricación de conglomerados de madera y otros (6,17).

4. TIPOS DE PAPA CULTIVADAS EN EL MUNDO

Las papas cultivadas actualmente, son especies o híbridos pertenecientes a la familia Solanaceae sección tuberina, con alrededor de 150 especies tuberíferas. Se conocen dos cultivares: *Solanum tuberosum* subespecie *andigena* procedente de los Andes y *Solanum tuberosum* subespecie *tuberosum* procedente del sur de Chile (17).

Según HOOKER (4) la más común de las papas *Solanum tuberosum* L. es un tetraploide ($2n = 48$ cromosomas) cuya procedencia se estima de una especie $2x = 24$ cromosomas, *Solanum stenotomun*. Esta compuesta por las subespecies *tuberosum* y *andigena* las cuales son completamente fértiles entre si.

La subespecie *andigena* se cultiva plenamente en Suramérica y se caracteriza por tener ojos profundos, a menudo pigmentados. Su tuberización es inducida en días cortos.

La subespecie *tuberosum* se cultiva en América del norte y el norte de Europa, tiene requerimientos de días largos.

HOOKER (4) menciona que no son subespecies diferentes, ya que por selección de material *andigena* se puede obtener material *tuberosum*.

5. IMPORTANCIA DE LA PAPA EN GUATEMALA

En Guatemala se cultiva actualmente más de 10,000 hectáreas de papa, su aceptación y presentación culinarias van desde lo artesanal doméstico hasta las comerciales muy difundidas como acompañantes de comidas rápidas. Su amplio rango de cultivo se debe principalmente a que Guatemala posee las condiciones de suelo y clima propicios para su desarrollo. El cultivo de la papa está difundido en el Altiplano occidental. En la parte baja a alturas que van de los 1500 a 2600 metros sobre el nivel del mar y en la parte alta a alturas que van de 2600 a 3200 msnm., principalmente donde las temperaturas oscilan entre los 15° a 20° centígrados (12,13,14).

5.1. ZONAS DE PRODUCCION

El país esta dividido en 3 zonas de siembra (14), la zona occidental, la zona central y la zona oriental; de las que se describen los departamentos y municipios más importantes:

a. ZONA OCCIDENTAL:

QUETZALTENANGO: Concepción Chiquirichapa, Almolonga, Zunil, San Martín Sacatepéquez y Cojolá.

TOTONICAPAN: San Francisco el Alto, San Cristóbal y San Andrés Xecul.

HUEHUETENANGO: Todos Santos Cuchumatanes, San Juan Ixcoy y San mateo Ixtatán.

QUICHE: Chichicastenango, San Antonio Ilostenango y Patzité.

SAN MARCOS: San lorenzo, Comitancillo, Ixchiguán, Tacaná, Tejutla, San José Ojotenan, Concepción Tutuapa, San Pedro Sacatepéquez y la parte alta de San Marcos.

b. ZONA CENTRAL:

SACATEPEQUEZ: Antigua Guatemala, Sumpango y Santa Lucía Milpas Altas.

GUATEMALA: Palencia, San José Pinúla, Villa Nueva, San José del Golfo.

c. ZONA ORIENTAL:

SANTA ROSA: Santa María Ixhuatán, San Rafael Las Flores.

JALAPA: Mataquescuintla, San Carlos Alzatate, Monjas.

JUTLAPA: Algunas aldeas de las regiones altas.

5.2. VARIEDADES PRESENTES

El Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola, ICTA (12,13,14) reporta las siguientes variedades en el país:

DIA-71: Posee flores blancas, tubérculos grandes y alargados, madura de 120 a 130 días. Su rendimiento aproximado es de 28 toneladas/hectárea (ton/ha.)

TECPAN-69: Sus flores son de rosadas a lila, posee tubérculos grandes y ovalados, madura de 110 a 120 días. Su rendimiento aproximado es de 25 ton/ha.

MARA: Con flores de color morado lila, tubérculos redondeado-ovalados, madura de los 100-110 días. Su rendimiento aproximado es de 22 ton/ha.

ANGOSTA: Flores morado lila, tubérculos redondo ovalado, madura a los 100-110 días. Su rendimiento aproximado es de 22 ton/ha.

ICTA 77: Tubérculo redondo ovalado, con piel rosada, madura a los 100-110 días. Su rendimiento aproximado es de 25 ton/ha.

ATZIMBA: Flores blancas, tubérculos amarillentos, en el exterior, y crema en el interior, de forma redonda-ovalado, madura de los 100 a 120 días. Su rendimiento aproximado es de 21 ton/ha.

TOLLOCAN: Flores blancas, tubérculos redondos de color crema, madura de los 90 a 100 días. Su rendimiento aproximado es de 21 ton/ha.

ICTA CHIQUIRICHAPA: Flores moradas, forma de tubérculo ovalado, madura de 90 a 100 días. Su rendimiento aproximado es de 25 ton/ha.

ICTA CUCHU: tubérculo ovalada, con piel color crema, madura de 90 a 100 días. Su rendimiento aproximado es de 25 ton/ha.

ICTA ALASKA: Tiene flores blancas, tubérculo redondo, con piel blanca, ojos con yemas semiprofundos, madura de 100 a 110 días. Su rendimiento aproximado es de 25 ton/ha.

ICTA PAQUIX: Tubérculo redondo con piel morado-lila, madura de 110 a 130 días. Su rendimiento aproximado es de 25 ton/ha.

ICTA TACANA: Tubérculos redondos, con piel roja, madura de 110 a 130 días. Su rendimiento aproximado es de 25 ton/ha.

LOMAN: Tubérculos largos y aplanados, por lo regular no florea, madura de 80 a 100 días. Es una variedad Holandesa, buena para consumo fresco. Su rendimiento aproximado es de 25 ton/ha.

ZACULEU 70: Tubérculos grandes con piel pigmentosa rosada o roja, madura a los 90 días. Su rendimiento aproximado es de 21 ton/ha.

ALPHA: Tubérculos ovalados o redondos, flores blancas escasas, madura de los 100 a 120 días. Su rendimiento aproximado es de 21 ton/ha.

UTATLAN 69: Tubérculos redondos ovalados, flores blancas, madura a los 130 días. Su rendimiento aproximado es de 21 ton/ha.

6. ENFERMEDADES DE LA PAPA

Dentro del rango de enfermedades que afecta a la papa están las causadas por hongos, bacterias, virus, micoplasmas, toxicidad inducida por insectos, nemátodos, y enfermedades abióticas (4). De las cuales, *Phytophthora infestans* (tizón tardío) se constituye a nivel mundial como la más importante. Siguiendole en su orden las enfermedades virosas y las enfermedades bacterianas. Sin embargo las enfermedades virosas, por sus características de diseminación, fuentes de inóculo y partes afectadas de la planta, se constituyen en el riesgo mas grande en cuanto a la producción y la desaparición de clones que al infectarse con estos virus pierden todo su valor agronómico (4,28,29).

6.1. ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIRUS

Las enfermedades causadas por virus que afectan a la papa generalmente nunca tienen un carácter letal en ésta, pero tienen una tendencia en la reducción del rendimiento, al provocar una reducción en el vigor (4).

Combinados algunos virus forman un complejo que puede inutilizar completamente a la planta como fuente de semilla y afectar drásticamente la producción (4,29).

6.1.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS VIRUS EN PAPA

Debido a la composición básica de los virus que puede ser ácido ribonucléico (ARN) o ácido desoxirribonucléico (ADN), sus cualidades de infección, reproducción, tamaño y forma son bastante complejos (1,29).

Salazar (29) menciona que los virus que afectan a la papa en su mayoría solo contienen ARN, sin embargo el virus de la punta crespa y el virus del enrollamiento apical de las solanáceas (*beet curly top virus* y *solanum apical leaf curl virus*) parecen contener ADN. También menciona que generalmente los virus que afectan a la papa

presentan variantes, que le confieren un tipo de protección cruzada contra una cepa del mismo virus de diferente virulencia.

La infección viral en la papa puede darse en función del hospedante, dando como resultante una infección primaria que es la que se adquiere en el cultivo propiamente y la infección secundaria que se denomina a la originada de tubérculos y partes vegetativas de las plantas (1,33,6,4).

6.2. DIAGNOSTICO DE LOS VIRUS

Los virus son patógenos difíciles de diagnosticar debido a que su sintomatología varía de acuerdo al tipo de virus, variedad de la planta, susceptibilidad y la influencia del medio ambiente (33,4,29).

Las técnicas utilizadas para la detección de virus en orden de eficiencia son las siguientes:

6.2.1. DIAGNOSTICO DE CAMPO:

Se basa en sintomatología asociada al follaje, que se manifiesta en cambios de forma, textura o tamaños de las hojas, síntomas asociados al tubérculo, así como cambios en el aspecto de la planta. Los síntomas asociados al follaje pueden ser: mosaicos o moteados; aclaramientos de nervaduras; líneas y arcos amarillos o cloróticos y amarillamiento de nervaduras. Los cambios en la forma, tamaño o textura de las hojas pueden darse por: reducción en el tamaño; enrollamiento; rugosidad; encrespamientos y hojas coriáceas. Los síntomas en los tubérculos pueden ser: ahusamiento; rajaduras; sobrecrecimiento; o ahilamiento de brotes. Los cambios en el aspecto de la planta se presentan como: enanismo y debilidad marcada en la planta (4,29).

6.2.2. PLANTAS INDICADORAS:

Generalmente los virus no son específicos en cuanto a un número determinado de hospedantes, sin embargo éstos se constituyen en agentes secundarios de abrigo debido a que su efecto no tiene importancia económica. Algunas plantas presentan síntomas característicos sistémicos o localizados en función de los cuales posible detectar su presencia o ausencia, entre las que se mencionan (4):

Datura stramonium y *Physalis floridana* son indicadoras del virus PLRV.

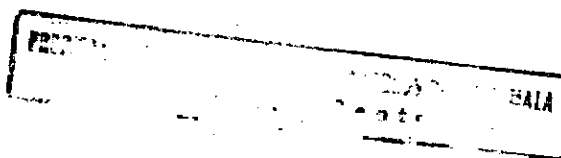
Nicotiana tabacum, *Datura stramonium* y *Gomphrena globosa* son indicadoras del virus PVX. Sin embargo se prefiere usar *Gomphrena globosa* específicamente para este virus, en virtud de que reacciona localmente.

Nicotiana tabacum, *Physalis floridana*, *Solanum demissum*, y clones de papa como el clon A6, son indicadores del virus Y, siendo la más utilizada *Solanum demissum*, por la característica de presentar reacciones locales que permiten diferenciar los virus en forma más precisa.

Nicotiana debneyi, *Solanum rostratum*, *Chenopodium album*, *Chenopodium quinoa* son indicadoras del virus S. Prefiriéndose usar *N. debneyi* y *C. quinoa* por presentar síntomas locales en sus hojas.

6.2.3. MÉTODOS SEROLOGICOS:

Estos se basan en las reacciones de especificidad de antígenos y anticuerpo. La especificidad que posee le confiere una alta sensibilidad en la detección de virus aún a bajas concentraciones. Entre los métodos serológicos están (2,3,11,30):



6.2.3.1. Microprecipitación:

Se basa en el uso de una gota de antisuero de uno o varios virus disuelta en una solución salina. Esta se aplica a una gota clarificada del extracto de planta a prueba. La muestra positiva formará un precipitado observable en el microscópio de luz con campo oscuro.

6.2.3.2. Látex sensibilizado con anticuerpos.

Se fundamenta en la prueba de microprecipitación. El látex (*esferas de poliestireno de 810 nm de diámetro*) proporciona un medio de adhesión de las partículas de virus cuando la muestra es positiva, formándose esferas de látex con partículas de virus agregadas.

6.2.3.3. Técnica serológica por medio de conjugados enzimáticos (ELISA).

Su principio se basa en el uso de una enzima conjugada a moléculas de anticuerpo (*gamma-globulinas*) para detectar las partículas de virus atrapadas por anticuerpos adheridos a un medio sólido. Una pequeña cantidad de la enzima es capaz de hidrolizar una cantidad mayor de sustrato amplificando así la reacción; confiriéndole el carácter de ser la más sensitiva de las técnicas serológicas en la detección de los virus.

6.3. ENFERMEDADES VIROTICAS IMPORTANTES PARA GUATEMALA

6.3.1. VIRUS DEL ENROLLAMIENTO (PLRV)

Este virus constituye el complejo más importante dentro de las enfermedades de la papa, tiene la más alta incidencia en la reducción del rendimiento en todo el mundo (4).

El virus se reportó primero en Brasil, posteriormente en Colombia, México, Ecuador y Perú. Su transmisión es por medio de áfidos, conociéndose al *Myzus persicae* como el más eficiente vector de los áfidos que colonizan a la papa. Su sintomatología primaria se presenta en las hojas jóvenes, que se tornan erectas y enrolladas con coloración pálida. Dependiendo del grado de infección ésta puede extenderse hacia las hojas inferiores (4,29).

Los síntomas secundarios se manifiestan en los tubérculos que se han infectado, presentándose los brotes superiores enrollados, con una coloración clara. Las hojas se presentan rígidas y coriáceas, las que cuando se secan producen ruido estrujante si se frotran. Presentándose a menudo plantas enanas y erectas (4,29).

El virus del *PLRV* esta formado por partículas icosaédricas de 24 nm de diámetro. La sintomatología celular presenta un engrosamiento de las paredes y necrosis del floema, acumulandose calosa alrededor de las placas cribosas del floema de tubérculos y tallos. Los tubérculos infectados pueden ser liberados del virus si se someten a tratamiento con calor a 37 grados centígrados durante 25 días (4,29).

6.3.2. MOSAICO LATENTE, MOSAICO SUAVE (PVX)

Es el virus de mayor diseminación, tiene capacidad de infestar campos completos cuando se presenta, en los cuales el rendimiento puede reducirse a un 15%. Se reportó primero en Brasil, luego en Perú, México y América Central, se considera que se encuentra prácticamente en todo los lugares donde se siembra papa; su transmisión se realiza por medio de contacto, efectos mecánicos, contacto entre plantas y animales principalmente insectos del tipo masticador. También se reporta a las zoosporas del hongo *Synchytrium endobioticum* que actúan como vectores. Los áfidos no han presentado evidencia de intervenir en su transmisión. Su sintomatología puede no expresarse debido a que el virus permenece latente en algunos casos, sin embargo las plantas se observan poco vigorosas con relación a las plantas sanas. Cuando la sintomatología se evidencia se presenta un moteado que puede ir de suave a severo, mosaicos rugosos con enanismo de la planta y una marcada reducción de los foliós. En combinación con el virus Y (PVY), o el virus A (PVA), puede provocar

encarrujamiento, rugosidad o necrosis. El virus PVX esta formado por partículas filamentosas flexuosas de 515 x 13 nm., con sub-estructura helicoidal. Las células infectadas presentan inclusiones amorfas observables al microscopio de luz (4,29).

6.3.3. VIRUS DEL MOSAICO RUGOSO O MOSAICO SEVERO VIRUS Y (PVY).

Es uno de los virus más dañinos en la reducción del rendimiento. Presenta varios formas, según HOOKER (4), el PVY^o y PVY^c, juntos son la causa del completo fracaso del cultivo de la papa; combinado con el PVX es generalmente muy destructivo, produciendo la enfermedad conocida como 'MOSAICO RUGOSO'.

Su distribución es mundial. La diseminación en el campo es por medio de la población de áfidos alados, quienes lo transmiten en forma no persistente. Existen cerca de 25 especies de áfidos responsables de la transmisión del virus, entre los cuales el más importante es el *Myzus persicae* (4,29).

La sintomatología varía de acuerdo al tipo del virus, dentro de los que se conocen como los más severos a los tipos PVY^o, PVY^c, y en menor grado el PVYⁿ. Los síntomas primarios para el PVY^o manifiestan necrosis, moteado o amarillamiento de los foliólos, decaimiento de las hojas y hasta la muerte prematura. En algunas oportunidades se presenta el síntoma tipo palmera en los foliolo. La sintomatología secundaria, se caracteriza por plantas enanas, con hojas encarrujadas, moteadas o con necrosis en el follaje y tallos con alto grado de severidad. El virus esta formado por partículas flexuosas helicoidales de 730 x 11 nm. (4,29).

6.3.4. VIRUS S (PVS).

Este virus no presenta síntomas visibles, se le atribuye pérdidas entre el 10% y 20%. Fue detectado accidentalmente en trabajos de serología. Su distribución geográfica esta reportada mundialmente. Se perpetúa a través de los tubérculos, su

transmisión puede ser mecánica y por medio de áfidos *Myzus persicae* en forma no persistente (2,3,4,8,11,29).

La sintomatología, cuando evidente, presenta rugosidad en las hojas, enanismo y hábito de crecimiento abierto. Algunos tipos pueden presentar moteados y manchas necróticas. En las hojas viejas es posible observar manchas verdosas en lugar de amarillas cuando éstas están colocadas a la sombra constante. El virus se presenta como bastones rígidos a ligeramente a flexuosos, de 650 x 12 nm. (2,3,4,8,11,29).

6.4. INSECTOS RESPONSABLES EN LA TRANSMISION DE LOS VIRUS

En general todos los insectos con aparato bucal picador chupador que afectan a las plantas de papa se consideran vectores de virus, cuando éstos succionan savia que procede de una planta contaminada y luego succionan savia de una planta sana. El principal vector de muchos virus en la papa, lo constituyen los áfidos o pulgones (*familia Aphididae*), quienes tienen la capacidad de transmitir virus en forma persistente (son circulativos en el cuerpo del áfido) y en forma no persistente (son llevados en el estilete). *Myzus persicae* es considerado el áfido más eficiente en la transmisión de los virus en papa, el cual tiene una distribución a nivel mundial. Los áfidos tienen generaciones aladas y ápteras, las que varían de acuerdo a la estación del año. Tienen dos tipos de reproducción; vivíparamente por medio de partenogénesis y ovípara donde los huevos son fertilizados sexualmente. Los virus *PLRV*, *PVY*, *PVA*, *PVM*, *PAMV*, *AMV*, son transmitidos por los áfidos: *Aphis nasturtii* (áfido del Rhamnus), *Macrosiphum euphorbiae* (áfido común de la papa), *Myzus persicae* (áfido verde del melocotonero) y en caso particular el afido *Rhopalosiphum rufiabdominales* (áfido de bulbos y papa)(1,2,4,18).

Para el control de áfidos o pulgones se utiliza control químico o bien control biológico, en este último se utilizan algunos géneros de la familia *Coccinellidae* quienes en estado larval y adulto devoran a los pulgones (18,33).

7. EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

La técnica del cultivo de tejidos se basa en el cultivo de explantes de planta en medios sintéticos con condiciones controladas, con el objeto de proveer al explante un ambiente similar al que tendría en condiciones naturales. El cultivo de tejidos in vitro fue desarrollado al darle aplicación al fenómeno de la totipotencia, que forma parte de la teoría celular actual. El pionero en este campo fue Alexis Carrel, quien a principios del siglo IX consiguió cultivar células animales in vitro (5,26,30).

Schwann en 1839 citado por Martin (20) expuso que una célula viviente de un organismo celular puede ser capaz de desarrollarse independientemente si son provistas de condiciones necesarias.

La totipotencia de una célula esta definida como la capacidad de desarrollar a un individuo completo, basado en que toda célula contiene la información genética necesaria para dar origen a un individuo completo. Este término fue acuñado en 1901 por Morgan (5,26,30).

El desarrollo histórico del cultivo de tejidos está lleno de descubrimientos que han tenido una aplicación casi inmediata a la mayoría de las ciencias básicas, tales como la fitopatología, entomología e ingeniería genética, entre algunas. Actualmente constituye una herramienta en el estudio de una serie de fenómenos celulares no bien comprendidos anteriormente, tales como las interrelaciones entre los tejidos y las correlaciones que se dan en organos, el papel de algunos componentes y otros, que solamente bajo condiciones in vitro pueden ser analizados al eliminar una serie de factores que interfieren bajo condiciones in situ. Haberlandt en 1902 fue el pionero en el intento de cultivo de células vegetales in vitro. Pero hubo que esperar a que J. P. WHITE en 1934 resolviera el problema al lograr cultivar células de ápices de raíces de tomate, *Lycopersicon sculentum* (20,34).

La aplicación de la técnica tuvo lugar cuando J. P. WHITE observó que los meristemas apicales de las raíces de tomate subcultivados regularmente sobre un medio de cultivo estaban generalmente indemnes a los virus. Actualmente la técnica de cultivo in vitro a desarrollado metodologías que incluyen: el cultivo de protoplastos,

transferencia de genes, cultivo de ploides, regeneración de embriones, cultivo de granos de polen, cultivo de endospermo y otros (20,26,30,33).

Entre las ventajas del cultivo de tejidos "in vitro" en general se cuentan (19,20,30):

- a. Propagación acelerada: es posible teóricamente obtener en un año a partir de una sola planta un millón de clones de ella.
- b. Ahorro y ganancia de espacio: en espacio reducido es posible mantener cantidades considerables de clones que servirán como semilla en el campo, por área disponible. Permite hacer uso del area vertical, acumulando varios niveles para el efecto.
- c. Ausencia de infecciones y factores climáticos adversos: Debido a las condiciones asépticas en que se tienen los explantes están libres de contaminantes, por lo que se cuenta con material que tiene la capacidad de someterse a las pruebas más rigurosas de cuarentena.
- d. Disponibilidad inmediata y permanente del material: permite el acceso oportuno a la micropropagación en épocas en que las condiciones del campo no son las adecuadas.

Las desventajas están basadas en los altos costos de mantenimiento e instalación de laboratorio, la necesidad de tener mano de obra calificada, la falta de presión de selección de los materiales con que se cuenta y la pérdida de variabilidad que para algunas técnicas no es posible evitar.

7.1. CULTIVO DE MERISTEMOS

El meristemo es un tejido de la planta que está compuesto por células indiferenciadas (células embrionarias) que conservan la capacidad de dividirse, lo que les confiere un crecimiento teóricamente indefinido. Están localizados en los ápices y axilas

de los tallos y raíces y el cambium en el interior de tallos y raíces que le permiten el crecimiento en grosor a los vegetales. El nombre de meristemo procede de la palabra griega *meristos* que significa compartir (19,20,30).

Su uso in vitro dió inicio con las observaciones de White en 1934 (34) con los cultivos in vitro de raíces de tomate *Lycopersicon sculentum* White estableció las bases del uso del cultivo de meristemos in vitro como método para la eliminación de infecciones virales sistémicas.

Limasser y Cornuet en 1949 (20) trabajando en Francia estudiaron la distribución de los virus en las plantas, demostrando la existencia de un gradiente de concentración de virus desde las partes jóvenes hacia las más viejas, con lo que postularon la hipótesis de que era posible producir clones libres de virus provenientes de plantas enfermas. Esta hipótesis fue confirmada por Morel y Martin en 1952, quienes produjeron plantas de dalia *Dalia sp. variedad el sueño*, libres de virus.

Estos resultados hicieron crecer el interés de muchos investigadores en el uso de la técnica, bien conocidos entre algunos: el rescate de los clones de papa variedad *Belle de Fontenay*, en Francia, de la cual los tubérculos existentes provienen de los meristemos libres de virus obtenidos en esa época (20), los trabajos del Centro Internacional de la Papa (CIP) en Perú; y otros menos relevantes, pero no menos importantes que se han realizado en fresas, frambuesas, manzano (*ROSACEAE*), claveles (*CARYOPHYLLACEAE*), lirios (*LILIACEAE*), crisantemos (*ASTERACEAE*), vid (*VITACEAE*), caña de azúcar (*POACEAE*), orquídeas (*ORCHIDACEAE*), banano (*MUSACEAE*), cardamomo (*ZYNGIBERACEAE*), ñame y colocasia (*ARACEAE*) (9,11,20,21,22,27,32).

Sin embargo actualmente se tiene evidencia que los meristemos no permanecen inmunes a todos los virus, por lo que es necesario la aplicación de otras técnicas complementarias. Estas técnicas comprenden el uso de quimioterapia, de reguladores de crecimiento, crioterapia y termoterapia, de las cuales la termoterapia ha demostrado ser más eficiente (9,26,30).

El cultivo de meristemas *in vitro*, además de lo mencionado anteriormente, posee la ventaja que permite una reproducción acelerada de plántulas obtenidas de él, teóricamente indefinida, mediante la replicación de sus brotes, una vez establecidos (20).

La desventaja es que las plantas producidas no quedan inmunizadas, por lo que al reingresar al campo y encontrar los vectores apropiados, pueden contaminarse nuevamente. Básicamente el problema se centra en que actualmente no se ha descubierto un sistema inmunológico a nivel vegetal que permita proteger clones valiosos de la contaminación por virus. Otra limitante del método es que los ejemplares utilizados para la liberación (limpia) no representan la base genética de la población, por lo que las nuevas plantas tienen una limitada variabilidad, la cual es útil en términos de características para el momento pero no para cambios a largo plazo, específicamente los tipos de plantas que tienen reproducción asexual bajo condiciones naturales (6,19).

7.1.1. LOS MERISTEMOS Y SU RELACION CON LAS INFECCIONES VIRALES

El meristemo es uno de los tejidos vegetales que al ser cultivado *in vitro* mantiene su estabilidad genética. Debido al hecho de estar formado por células indiferenciadas las que se encuentran agregadas en una cúpula en la yema que lo forma, se considera que los virus no tienen acceso a él. Esto es debido a que los tejidos vasculares están ausentes y a que los tejidos vasculares que provienen de los primordios foliares y hojas primarias que lo cubren no están aún en contacto con el sistema vascular principal. Además existe una división celular activa. Estos fundamentos apoyan la hipótesis que indica del por que los meristemas generalmente están libres de virus. Por el hecho de que no existe transporte o medio de locomoción del virus al meristemo por la ausencia de los tejidos vasculares, o el poco desarrollo de los mismos y la activa división celular que compite desfavorablemente con la división del virus (6,19,30).

7.1.2. EFECTO DE LA TERMOTERAPIA EN LA LIBERACION DE VIRUS EN LOS MERISTEMOS

No todos los virus son capaces de eliminarse por el método de extracción de meristemos, se han encontrado partículas de virus X, en meristemos de plantas enfermas, así como partículas del virus del mosaico del tabaco (TMW) en plantas procedentes de meristemos in vitro. De hecho existen una serie de factores que intervienen en la presencia o ausencia de los virus en los meristemos, entre los que se menciona el tamaño, el número de primordios foliares, la localización de éste y su edad. Lamentablemente el tamaño del meristemo se ve afectado inversamente en cuanto al número de primordios foliares, situación que pone en desventaja al método. Se ha demostrado que tratando plantas con calor (método conocido como "termoterapia") durante un período prolongado, antes de la extracción de sus meristemos se obtienen plantas libres de virus con mayor eficacia que la sola extracción del meristemo, con una tendencia porcentual mayor de plantas sanas obtenidas. Se han utilizado diversas fuentes de calor aplicadas a las plantas, concluyéndose que sobreviven mejor al aire caliente, que al tratamiento con agua caliente (5,9,19,26,33).

Sin embargo esto no ha sido la solución, el método ha resultado menos eficiente en la inactivación de virus abastados que virus esféricos (26).

Con respecto al efecto del calor sobre la eliminación de los virus, se han planteado varias hipótesis, de las cuales se mencionan algunas de las razones más aceptadas (2,8).

- a. Rotura del ácido nucléico (ADN ó ARN) por efecto del calor.
- b. Degradación de los componentes enzimáticos, en virus inestables.
- c. Inactivación de síntesis de la ARN-polimerasa viral, necesaria para la síntesis viral.
- d. Impedimento del ensamblaje de la partícula viral (no existiendo capacidad de la capa proteínica para encapsular al ácido nucleico viral).

- e. Limitación en el movimiento del virus durante el tratamiento con calor, de tal manera que el virus no pueda moverse al meristemo.

7.1.3. OTRAS METODOLOGIAS EN LA ELIMINACION DE VIRUS.

Se ha utilizado otra serie de metodologías con el efecto de sanear meristemos entre estas se encuentran: la crioterapia (utilización de frío para eliminar algunos virus y viroides) la quimioterapia (utilización de químicos como el virazole, auxinas y otros reguladores del crecimiento) pero presentan el inconveniente de que la sobrevivencia de plantas es muy baja, existe presencia de mutaciones y muchas veces el manejo de las plantas es impráctico, por lo que el método mas aceptado es el tratamiento con termoterapia seguida del cultivo de meristemos. (9,26,30).

7.2. ADAPTACION DE PLANTAS LIBRES DE VIRUS, AL CAMPO.

Una vez obtenidas las plantas libres de virus por cualquier método mencionado en los incisos anteriores, es necesario acondicionarla para regresarla a las condiciones de las cuales fue excluída, para eso es necesario aclimatarlas. (29)

Generalmente la forma más eficiente de conservar las plantas libres de virus es a través de la inducción a formación de tubérculos "in vitro", estos constituyen una fuente de semilla básica disponible para el productor de semilla, que evita una serie de dificultades en cuanto a los pasos de aclimatación de plantulas obtenidas "in vitro". Así como una reducción del costo en cuanto al manejo de mallas antiáfidos (6).

7.3. INDUCCION A FORMACION DE TUBÉRCULOS

En la producción de tubérculos se dan una serie de procesos anatómicos y bioquímicos que determinan la expresión del tubérculo formado. Los procesos anatómicos se basan básicamente en el ensanchamiento de las células de la médula, el incremento en la tasa de división celular en la zona subapical y el incremento en grosor y división celular del cortex (4).

Los procesos bioquímicos están relacionados con el incremento de almidón, elevada acumulación de patatina y aumento en la síntesis de antocianinas en las células sub-epidérmicas. Los procesos mencionados están influenciados por una serie de factores que pueden ser externos o internos. Los procesos externos que favorecen la tuberización son: fotoperíodo corto, intensidad de luz, temperatura, déficit de agua (stress de H_2O), cantidad de fertilización nitrogenada así como la cantidad de anhídrido carbónico (CO_2). Los factores internos no están muy bien definidos pero básicamente están relacionados con la edad fisiológica del estolón, necesitándose 8 nudos mínimos para poder inducir la formación de tubérculos. La traslocación de hormonas tales como las citocininas, favorece la tuberización, contrariamente al ácido giberélico (GA_3) que la inhibe (10,19,22,26,27,30).

V. METODOLOGIA

1. LOCALIZACION Y CARACTERISTICAS DEL AREA EXPERIMENTAL

La presente investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (FAUSAC). La temperatura media del cuarto de cultivo fue de 24 grados centígrados (°C), con máximas de 28°C y mínimas de 18°C.

2. MATERIALES REACTIVOS

En la presente investigación se utilizaron plantas de papa *Solanum tuberosum* L. v.r. *Loman* recolectadas del campo y contaminadas con los virus X, Y, y S. Un juego de reactivos de la técnica serológica ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) para los virus X, Y, y S proporcionado por el Centro Internacional de la papa, CIP (7).

Los medios de cultivo utilizados para el cultivo de meristemos fueron los propuestos por Murashige y Skoog (1962) modificados por el CIP.

Se utilizó una cámara de flujo laminar, balanza analítica, potenciómetro, un destilador de agua, un horno adaptado con luz de intensidad de 10000 lux y cristalería de laboratorio.

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1. MANEJO DEL EXPERIMENTO:

3.1.1. RECOLECCION DE PLANTAS EN EL CAMPO:

Se recolectaron en la región del altiplano del país un total de 10 plantas de papa infectadas con virus. La identificación preliminar de los virus se realizó por observación visual de los síntomas característicos que presentaban.

Con la prueba ELISA se seleccionaron un total de 6 plantas que contenían los virus X, Y y S conjuntamente.

3.1.2. SIEMBRA DE ESQUEJES DE PLANTAS SELECCIONADAS, EN TUBOS DE ENSAYO

Las plantas que resultaron infectadas con los virus estudiados se seleccionaron y se clonaron mediante su siembra in vitro por medio de su fraccionamiento en esquejes.

La siembra de esquejes se realizó tomando 10 yemas terminales de 0.01 metros (1 cm.) de cada planta. Los esquejes se esterilizaron por 30 segundos en etanol al 70% y por 5 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 0.025%. Esterilizados los esquejes, éstos se lavaron con agua estéril tres veces. Antes de sembrar los esquejes en el medio de cultivo, en la cámara de flujo laminar se eliminó con un bisturí la región basal a cada esqueje para remover las células que estuvieron en contacto con los desinfectantes usados.

Cada esqueje se cultivó en un tubo de ensayo con medio de cultivo M.S. y fue identificado como un clon independiente que correspondió a cada planta enferma. La clonación consistió en cultivar in vitro 4 veces cada 35 días la planta derivada de cada esqueje para extraer posteriormente los meristemas (140 días después de la siembra).

Las plantas así obtenidas se trataron de la forma siguiente:

3.1.3. PLANTAS DESTINADAS A LA EXTRACCIÓN DE MERISTEMOS

A cada clon procedente de las plantas enfermas se le extrajeron 16 meristemos (obteniéndose un total de 96 meristemos). Los explantes de los meristemos se mantuvieron durante su crecimiento con luz constante a 10,000 lux.

De los 96 meristemos cultivados in vitro se obtuvo el 16.66% de plantas desarrolladas (16 plantas). Estas plantas consideradas libres de virus fueron evaluadas con la prueba serológica ELISA.

3.1.4. PLANTAS DESTINADAS A LA APLICACION DE TERMOTERAPIA ANTES DEL CULTIVO DE MERISTEMOS

Se aplicó termoterapia a las plantas que alcanzaron 0.25 mts (25 cms) de altura en los tubos y que presentaban características visuales de desarrollo adecuado. El tratamiento consistió en la aplicación de una temperatura constante de 37°C y luz constante las 24 horas durante un período de 32 días.

Para compensar la pérdida de plantas por efecto del calor se hicieron 10 réplicas de cada clon sometido a termoterapia, de cada clon se extrajeron 5 meristemos; de los 150 meristemos extraídos se obtuvo el 12% de regeneración (18 plantas). Para realizar los análisis estadísticos respectivos, el número de plantas obtenido en los dos tratamientos se igualó al eliminar al azar 2 plantas del tratamiento donde se uso termoterapia.

3.2. CONDICIONES DE CULTIVO

Los tubos de ensayo que contenían las plantas enfermas derivadas de los esquejes y los que contenían las plantas derivadas de la extracción de meristemos fueron colocados bajo luz continua de 10000 lux de intensidad. La temperatura media del cuarto de cultivo fue de 24°C, con máximas de 28°C y mínimas de 18°C. Las plantas obtenidas de la extracción de meristemos por las dos metodologías fueron transferidas cada 30 días a nuevos medios. El tiempo de cultivo para los esquejes provenientes de plantas enfermas sometidos a proceso de dilución fue de 144 días.

3.2.1. PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

El medio utilizado para el cultivo de los esquejes iniciales fue el recomendado por el CIP, que corresponde al medio Murashige y Skoog 1962, (M.S.) suplementado con 0.25 ppm de ácido giberélico (GA_3), 2 ppm de ácido D-Pantoténico, 3% de sucrosa y 0.6% de agar.

Los medios para inducción de tubérculos se prepararon con sales de Murashige y Skoog 1962, (M.S.) suplementadas con 0.4 ppm de Tiamina HCl, 500 ppm de Cloruro de Clorocolina y cinco diferentes concentraciones de Bencil aminopurina (BAP).

Estos medios se esterilizaron en un autoclave a 15 PSI, y 121° grado centígrados durante 15 minutos. La composición detallada de cada uno de los medios de cultivo se presenta en el apéndice en el Cuadro 1 y 1a.

3.3. APLICACION DE TERMOTERAPIA

Para la aplicación de termoterapia se implementó un horno al cual se le adaptó luz interior de intensidad de 10000 lux y se calibró a una temperatura constante de 37°C. Este tratamiento tuvo una duración de 32 días.

3.4. EXTRACCION DE MERISTEMOS

La metodología para la extracción de los meristemos fue la misma para los dos tratamientos y se desarrolló con la ayuda de un estereomicroscopio. Se disectaron las yemas apicales de las plantas procurando dejar a lo sumo dos primordios foliares por meristemo. Se colocó un meristemo por tubo que se identificó como un clon de la planta de la cual fue extraído. El tamaño promedio del meristemo fue de 0.8 milímetros para el tratamiento de meristemos y de 0.5 milímetros para los del tratamiento de termoterapia.

3.5. APLICACION DE LA TECNICA ELISA

La técnica ELISA fue aplicada a las plantas regeneradas de los meristemos obtenidos de los dos tratamientos efectuados. Siguiendo la metodología propuesta por el CIP, esta técnica fue aplicada para determinar la presencia de los virus X, Y y S.

3.6. METODOLOGIA PARA LA INDUCCION A LA FORMACION DE TUBERCULOS

Las plantas seleccionadas como sanas con la prueba ELISA, se sometieron a una prueba de inducción de tubérculos in vitro con el fin de evaluar el mejor tratamiento y conservar el material libre de virus para semilla.

Para desarrollar esta actividad se tomaron esquejes con 8 nudos y se sembraron en beakers conteniendo el medio de cultivo M.S. en estado líquido. En estos beakers se evaluó el efecto de cinco concentraciones de Bencil aminopurina. Estas concentraciones fueron 0 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 7.5 ppm y 10 ppm. El experimento incluyó 4 repeticiones y la unidad experimental fue un beaker conteniendo una planta regenerada. Las variables analizadas fueron el número de tubérculos por tratamiento y el peso promedio de los tubérculos por tratamiento.

El procedimiento de inducción se realizó utilizando plantas regeneradas de cada esqueje que a los 25 días presentaron un promedio de 6 brotes y longitudes promedio de 0.07 mts. (7 cms). Bajo estas condiciones se eliminó el medio líquido que poseían y se adicionó el medio M.S. suplementado con 0.4 ppm de Tiamina HCl y 500 ppm de Cloruro de Clorocolina para inducir tubérculos. Luego de la aplicación del medio de inducción, las plantas se mantuvieron en completa oscuridad durante 44 días y se realizó el conteo de los tubérculos por beaker.

3.7 VARIABLES RESPUESTA

Las variables respuesta analizadas fueron: las proporciones de plantas sanas de los virus X, Y y S obtenidas para la comparación entre metodologías, la proporción de plantas sanas de cada virus en particular (X, Y y S) dentro de cada método y el número y peso de tubérculos inducidos.

3.7.1. ANALISIS ESTADISTICO

3.7.1.1. ESTADISTICA NO PARAMETRICA

El análisis estadístico utilizado se basó principalmente en estadística no paramétrica. Se utilizó la prueba de Q de Cochran, la prueba de probabilidad exacta de Fisher y la prueba de Ji cuadrado (χ^2). Estas pruebas se detallan a continuación:

1. La prueba de probabilidad de Q de Cochran se utilizó para realizar el análisis de las proporciones de plantas libres de cada uno de los virus y el método de extracción de meristemos. Esta prueba se uso para analizar las proporciones de las plantas libres de los virus en los tratamientos de extracción de meristemos y de termoterapia previo a la extracción de meristemos (diferencia de eliminación de virus de cada método por separado). El modelo estadístico se presenta a continuación:

Prueba de Q de COCHRAN.

$$Q = \frac{(k-1) \sum_{j=1}^k (G_j - \bar{G})^2}{k \sum_{i=1}^N L_i - \sum_{i=1}^N L_i^2}$$

de donde: $g-1 = k-1$

$G_j =$ Número total de éxitos en la columna j

$\bar{G} =$ Media de G_j

$L_i =$ Número total de éxitos en la hilera i

2. La prueba de probabilidad exacta de Fisher se utilizó para analizar la significancia estadística en las proporciones de plantas sanas obtenidas a través de los dos métodos empleados.

3. Para analizar si existía una relación significativamente estadística entre cada método y cada virus en particular (diferencia entre métodos y entre virus), se usó la prueba de probabilidad exacta de Fisher y la prueba de ji cuadrado (χ^2). Se utilizaron dos métodos de análisis diferentes debido a que los datos del virus Y no se ajustaban a la Prueba de Fisher.

Prueba de la probabilidad exacta de Fisher.

$$P = \frac{(A+B)! (C+D)! (A+C)! (B+D)!}{(N! A! B! C! D!)}$$

Donde P = es la probabilidad obtenida, para una prueba de una cola.

A, B, C, D = valores estimados de las frecuencias observadas colocados en una tabla de contingencia de 2 por 2.

N = corresponde al valor dado por la suma de filas y suma de columnas en la tabla de contingencia.

Prueba de Ji cuadrado (χ^2)

$$\chi^2 = \frac{(o - e)^2}{e}$$

de donde:

χ^2 = Estadístico chi cuadrado

o = valores observados

e = valores esperados, calculados en la tabla de contingencia

$$\text{cálculo del valor } e = \frac{(A \times B)}{(A + B)}$$

3.7.2. ESTADISTICA PARAMETRICA

La estadística paramétrica se utilizó para el análisis de la inducción de tubérculos. La prueba estadística paramétrica utilizada fue el análisis de varianza (ANDEVA), con un diseño completamente al azar. Para el análisis del número de tubérculos producidos se usó un ANDEVA con datos transformados (raíz cuadrada del número).

Modelo estadístico completamente al azar.

$$Y_{ij} = u + T_i + E_{ij}$$

De donde:

Y_{ij} = Variable respuesta

u = Medias de las concentraciones [] de BAP.

T_i = Efecto de los tratamientos.

E_{ij} = Efecto del error experimental.

i = Va de 1 hasta 5.

j = Va de 1 a 4.

Las diferencias significativas de las medias encontradas se analizaron con la prueba de Tukey para determinar los mejores tratamientos.

Prueba de Tukey.

$$W = q \times S\bar{X}$$

$$S\bar{X} = \sqrt{\frac{CMe}{r}}$$

De donde:

W = Comparador de Tukey

q = Valor tabular de la Tabla

$S\bar{X}$ = Error Standar

CMe = Cuadrado del error

r = repeticiones del experimento

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

1. ESTABLECIMIENTO DEL MATERIAL PARA LA EXTRACCION DE MERISTEMOS

El análisis de la presencia de virus en el material que se utilizó para aplicar los tratamientos se realizó con un juego de reactivos de la prueba serología ELISA para los virus X, Y y S. Esta prueba se aplicó al material vegetal (los esquejes) que se seleccionó para cultivarse in vitro y a los esquejes cultivados in vitro procedentes de plantas enfermas al final del experimento.

Los resultados obtenidos muestran que no existe ningún cambio en la presencia de virus antes y después de la clonación de esquejes contaminados con éstos, los resultados se presentan en el Cuadro 1.

La efectividad del establecimiento del material se observó por medio de la media de crecimiento a los 35 días, en la cual la altura promedio de la parte aérea dentro del tubo fue de 0.08 mts. (8 centímetros).

El clonaje de esquejes provenientes de plantas enfermas plantea la ventaja de que teóricamente existe una dilución de los virus que se encuentran presentes en la planta donadora, debido a que está demostrado que existe un gradiente de concentración de virus en una planta enferma. Este gradiente varía desde las partes jóvenes hasta las partes viejas de la planta (este concepto fue propuesto por Limasser y Cornuet en 1949). La clonación de plantas provee de material joven cada vez que se realiza una transferencia a un cultivo nuevo, de tal manera que teóricamente cada planta regenerada de un esqueje clonado debe contener menor concentración de virus. Esto debe influir positivamente en los meristemos, los que en cada clonaje deben contener menor concentración de virus si están infectados. Los procesos fisiológicos de crecimiento, establecen bases físicas que impiden el transporte de virus hacia los meristemos, con una velocidad tal que se mantenga una concentración equitativa para todas las partes, por lo tanto la concentración debe disminuir.

CUADRO 1. *Resultados de los esquejes analizados por medio de la prueba serologica ELISA, antes y después del subcultivo en función de la presencia o ausencia de los virus X, Y, S.*

PLANTA Nº	PRESENCIA DE VIRUS ANTES DE SU FRACCIONAMIENTO			PRESENCIA DE VIRUS DESPUÉS DE SU FRACCIONAMIENTO		
	VIRUS X	VIRUS Y	VIRUS S	VIRUS X	VIRUS Y	VIRUS S.
1	+	+	-	+	+	-
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	-	+	+	-
4	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+
7	+	+	-	+	+	-
8	+	+	+	+	+	+
9	+	+	-	+	+	-
10	+	+	+	+	+	+

Las simbologías: (+) representa plantas enfermas; (-) representa plantas sanas.

Las plantas obtenidas de la clonación se sometieron a dos tratamientos, los que se describen a continuación:

- a) solo extracción de meristemas;
- b) aplicación de termoterapia a una temperatura de 36°C con luz constante por 32 días antes de la extracción de meristemas. Los resultados se presentan a continuación.

2. PLANTAS LIBRES DE LOS VIRUS X, Y y S, POR EL CULTIVO DE MERISTEMOS

Al utilizar este procedimiento, se extrajeron meristemos con tamaño promedio de 0.8 milímetros. De los cuales se obtuvo el 16.66% de regeneración. A las plantas obtenidas se les aplicó la prueba serologica ELISA. A partir de la cual se diagnóstico que a través de la sólo extracción de meristemos se obtuvo un 37.5 % de plantas que se logro liberar de los virus X, Y y S (Seis de estas se encontraban completamente libres de estos virus) y un 62.5 % contenían al menos un virus analizado (diez plantas contenían al menos un virus), los resultados se presentan en el Cuadro 2.

CUADRO 2. *Plantas libres de los virus X, Y y S obtenidas de la extracción de meristemos a plantas infectadas con estos virus.*

MERISTEMO NO.	PRESENCIA VIRUS X	PRESENCIA DE VIRUS Y	PRESENCIA DE VIRUS S
1	-	-	-
2	-	-	-
3	+	-	+
4	-	+	+
5	-	-	-
6	-	+	-
7	+	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	+	-	-
11	+	+	-
12	+	+	+
13	-	-	-
14	+	-	+
15	+	+	-
16	+	+	-
Total plantas sanas	8	10	12
Total plantas enfermas	8	6	4
% de plantas sanas por virus:	50%	62.5%	75%
% de plantas libres de los virus X, Y y S	37.5		

Nota: La identificación de los clones no se presenta, debido a que solo tiene interés para identificar al autor las plantas liberadas de virus.

Las simbologías (+) representa presencia del virus y (-) ausencia del virus.



Los mejores resultados presentados en el cuadro anterior en cuanto a la eliminación por medio de este método son para la eliminación del virus S, para el cual se obtuvo un 75% de efectividad, en un grado intermedio el virus Y con 62.5% y en menor eficiencia el virus X con un 50% de efectividad.

Para determinar si las proporciones son significativas, es decir si existe una relación entre cada uno de los virus analizados y la sola extracción de meristemos se efectuó la prueba de Q. de COCHRAN, para la se evaluó si la probabilidad de eliminar por medio del cultivo de meristemos cualquiera de los virus X, Y y S es la misma para cada explante, o difiere en algún virus. Para esta prueba se trabajo con un nivel de significancia de 0.05, $n = 10$, $K = (3-1)$. Los resultados del análisis de la prueba de Q de COCHRAN se presentan en el apéndice en el Cuadro 3.

El Valor de Q calculado fue de 2.666 y el valor de Q tabulado 0.05 (k -1) fue de 5.99, lo que indica que no existe diferencia estadística significativa en la eliminación de los virus X, Y y S. Entonces la probabilidad de eliminar cualquiera de los tres virus estudiados es la misma para el tratamiento de extracción de meristemos, no obstante en los valores porcentuales existe diferencias en la facilidad de eliminación de virus. El virus S posee una facilidad de eliminación de un 75%, el virus Y de un 62.5% y el virus X solo en el 50% de los casos.

3. PLANTAS PROCEDENTES DE ESQUEJES ENFERMOS CON LOS VIRUS, X, Y y S, SOMETIDOS A TERMOTERAPIA, ANTES DE LA EXTRACCION DE MERISTEMOS

Al utilizar este procedimiento, se extrajeron meristemos con tamaño promedio de 0.5 milímetros. De los cuales se obtuvo el 12% de regeneración, debido a que el porcentaje de viabilidad estuvo muy afectado por el calor. A las plantas obtenidas se les aplicó la prueba serologica ELISA. A partir de la cual se diagnóstico que a través de la aplicación de termoterapia antes de la extracción de meristemos se obtuvo un 62.5% de plantas que se logro eliminar de los virus X, Y y S (10 plantas se encontraron completamene libres de estos virus) y un 37.5% contenían al menos un virus analizado (seis plantas contenían al menos un virus), los resultados se presentan en el Cuadro 3.

CUADRO 3. Resultado obtenido del tratamiento de esquejes sometidas a termoterapia antes de la extracción de meristemos para producir plantas libres de los virus X, Y y S.

MERISTEMO Nº	PRESENCIA VIRUS X	PRESENCIA DE VIRUS Y	PRESENCIA DE VIRUS S
1	+	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	+	-
5	+	-	-
6	+	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	+	-
11	+	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
Total plantas sanas	12	14	16
Total plantas enfermas	4	2	0
% de plantas sanas por virus:	75%	87.5%	100%
% de plantas libres de los virus X, Y y S	62.5		

Las simbologías (+) representa presencia del virus y (-) ausencia del virus.

Nota: La identificación de los clones no se presenta, debido a que solo tiene interés para identificar al autor las plantas liberadas de virus.

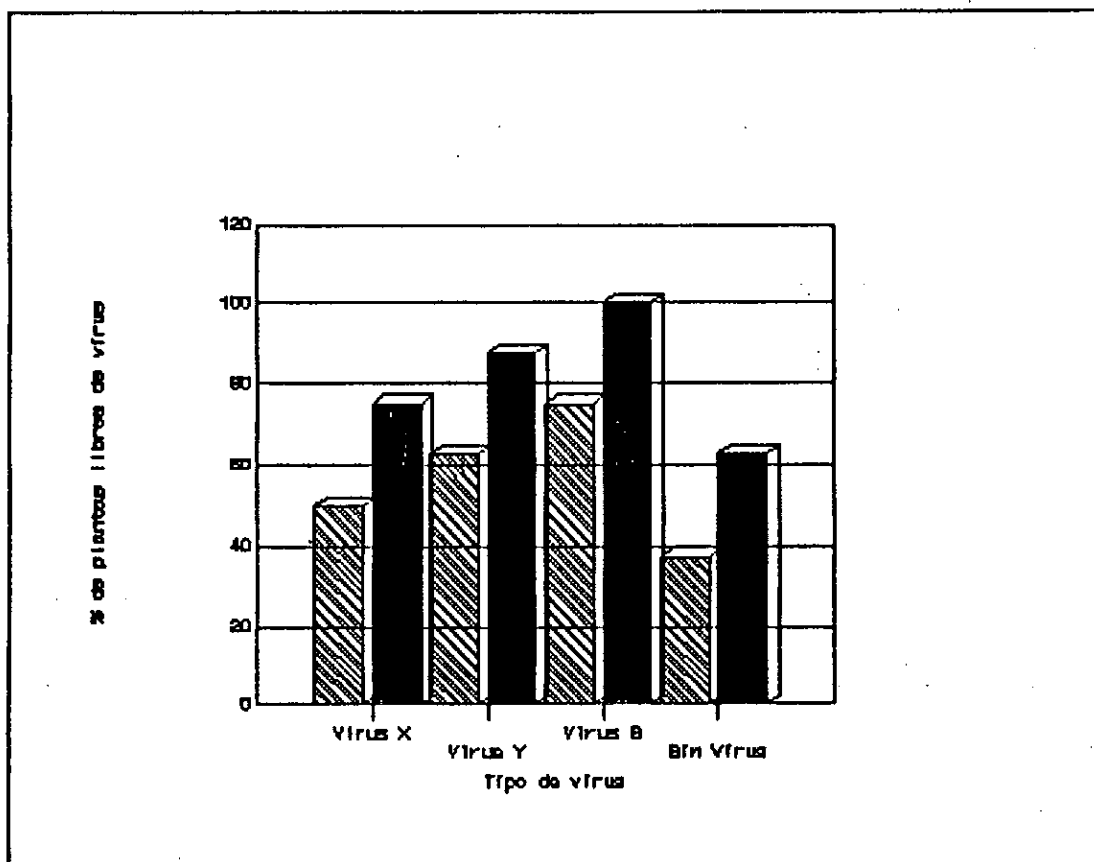
Los valores porcentuales de este tratamiento que se presentan en el cuadro anterior son mas altos, tanto para el porcentaje de plantas libres de los virus X, Y y S, como para cada virus en particular los que difieren del solo tratamiento de meristemos (véase Cuadro 2) en el que se presentan porcentajes de sanidad mas bajos para las plantas que fueron liberadas de los virus X, Y y S, como para las plantas que fueron liberadas de cada virus en particular. Los Mejores valores porcentuales son para el virus S, virus que por sus cualidades, según Hooker (17), le permiten ser teóricamente eliminado con la sola adición de calor a tubérculos infectados. Los valores porcentuales de los virus X y Y con la aplicación de calor se elevan significativamente siendo para el


virus X un valor porcentual del 75% y para el virus Y de un 87.5%. Para determinar la eficiencia porcentual en cuanto a la relación que existe entre cada uno de los virus analizados y el efecto de la termoterapia antes de la extracción de sus meristemos se utilizó la prueba de Q de COCHRAN, para la cual se analizó si la probabilidad estadística de eliminar cualquiera de los virus X, Y y S por medio del tratamiento de termoterapia antes de la extracción de meristemos es la misma para cada explante o si difiere en algún virus. Para dicha prueba se trabajó con un nivel de significancia de 0.05, $n = 10$, $K = (3-1)$. Los resultados de la prueba de Q de COCHRAN se presentan en el apéndice en el Cuadro 5.

El valor de Q calculado fue de 4, y el valor tabulado de Q $0.05 (k - 1)$ de 5.99, lo que indica que no existe diferencia estadística significativa en la probabilidad de eliminar cualquiera de los virus X, Y y S. Entonces la probabilidad de eliminar cualquiera de los tres virus estudiados es la misma para el tratamiento de termoterapia aplicado antes de la extracción de meristemos, no obstante los valores porcentuales tienen una tendencia mayor en la facilidad de eliminación particular de los virus, obteniéndose que para el virus S existe una facilidad de eliminación de un 100%, para el virus Y un 87.5% y para el virus X solo en el 75%.

4. ANALISIS ENTRE METODOLOGIAS

Con el objeto de verificar la relación estadística que existe en las proporciones de plantas sanas obtenidas a través de la extracción de meristemos a esquejes clonados in vitro con relación a la proporción estadística de plantas sanas obtenidas de la aplicación de termoterapia previo a la extracción de meristemos, en la eliminación de los tres virus analizados, se efectuó un análisis de la probabilidad exacta de FISHER, para la cual se evaluó si la proporción estadística de plantas sanas obtenidas de la extracción de meristemos de esquejes enfermos con los virus X, Y y S, cultivados in vitro (37.5%), y la proporción estadística de plantas sanas obtenidas del tratamiento a esquejes enfermos de estos virus con termoterapia previo a la extracción de sus meristemos (62.5%) es la misma para ambas o difiere en algún virus. El análisis de los resultados para la prueba de Fisher se presentan en el apéndice en el Cuadro 4. En dicho análisis el valor del estadístico tabulado tiene un valor de 3, y el estadístico calculado tiene un valor de 6, por lo que estadísticamente se acepta el hecho que las proporciones de plantas sanas de los virus X, Y y S obtenidas para el presente estudio es la misma para ambos métodos. El comportamiento general de los dos tratamientos se observa en la Figura 1.



 % de plantas libres de virus sin el uso de termoterapia


 % de plantas libres de virus con el uso de termoterapia

FIGURA 1. Comparación de las proporciones de plantas de papa *Solanum tuberosum* L. v.r. *Loman* sanas de los virus X, Y y S obtenidas a través del tratamiento de extracción de meristemas y del tratamiento de aplicación de termoterapia antes de la extracción de meristemas, a plantas enfermas de los virus X, Y y S cultivadas in vitro.

Al comparar las proporciones de plantas sanas obtenidas por los dos métodos, nos dejan ver que aunque los valores porcentuales son diferentes las proporciones son las mismas para las dos poblaciones analizadas, las cuales provienen de diferentes meristemas con diferentes concentraciones de virus cada una, (concepto vertido por Limmaseer y Counvert 1949, quienes probaron que las concentraciones de virus varían de acuerdo a la posición del meristemo, existiendo un gradiente de virus desde las partes jóvenes a las partes más viejas), existiendo mejores resultados en porcentaje para el tratamiento con termoterapia.

Haciendo un análisis detallado de otros investigadores como Stance-Smith y Mellor, 1970; Pennanzio y Rudulfi, 1973; Centro Internacional de la Papa y otros citados por Lizarraga (21); en sus observaciones obtuvieron resultados exitosos en la obtención de plantas libres de virus en papa al usar termoterapia en comparación con la sola extracción de meristemas, sin embargo sus resultados solo están expresados en porcentajes de las proporciones analizadas. Estos antecedentes fundamentan el concepto de que la dilución del virus X, Y y S, en la clonación de plantas *in vitro* que se encontraban contaminadas con estos virus es eficiente a tal grado que cuando se extraen los meristemas, en cualquiera de los dos métodos, solo meristemas o termoterapia antes de la extracción de sus meristemas estadísticamente son iguales, por lo tanto estadísticamente no importa cual metodología implementar, sin embargo en este trabajo (se obtuvo un 62.5% de plantas libres de los virus X, Y y S) como en los descritos por los autores mencionados arriba existe una tendencia a un porcentaje mayor de obtención de plantas sanas cuando se les aplica termoterapia.

El fundamento fisiológico de tal aseveración es que cada vez que se realiza una clonación, se diluye la concentración del virus de las plantas que se derivan de esta, al existir una desincronización de la velocidad de replicación del virus, con la velocidad de división de las estacas que se regeneran. Esta dilución permite al meristemo no infectarse por los virus.

Estos supuestos fundamentan las teorías del por que no se contaminan los meristemas o del por que regularmente pueden no contener partículas virales. Esto nos permite obtener meristemas sanos y por lo tanto plantas sanas, de los virus X, Y y S en el presente estudio. Cada fragmentación reduce la concentración del virus y por lo tanto reduce la capacidad e infección de los meristemas.

El método de clonación resulta ventajoso para la eliminación de algunos virus que son difíciles de eliminar aún cuando se aplique termoterapia, o para cuando el clon sea muy valioso agronómicamente y se encuentre completamente infectado, ya que elimina los riesgos de alta mortandad de plantas, problemas de mutaciones, u otros, que son consecuencia de los tratamientos aplicados.

La tendencia de obtener porcentajes mayores de plantas sanas al aplicar termoterapia a plantas infectadas con los virus X, Y y S se visualiza al analizar la relación particular entre virus y entre métodos. Este análisis individual nos permite apreciar como si existe una diferencia significativa en la eliminación del virus S por la termoterapia, en el incremento del número de plantulas sanas obtenidas, y la no significancia en las proporciones para los virus X, y Y.

5. ANALISIS PARTICULAR ENTRE CADA VIRUS Y ENTRE METODOS

Si bien es cierto no existe diferencia estadísticamente significativa entre métodos, las tendencias a un aumento en los porcentajes de plantas libres de cada virus cuando se utiliza termoterapia deben ser debidas al efecto de eliminación que provoca el calor en cada virus de acuerdo a las cualidades particulares que poseen en respuesta al calor. Para poder determinar estadísticamente la relación particular de eliminación entre cada virus y entre los dos métodos se analizó estadísticamente los resultados para cada virus en función de las dos metodologías usadas.

5.1. ANALISIS PARA EL VIRUS X

Este análisis se realizó para comparar si estadísticamente las proporciones de plantas sanas del virus X obtenidas a través de la sola extracción de meristemos, y de la termoterapia antes de la extracción de los meristemos para cada virus en particular son las mismas o difieren. Esto nos permite concluir de mejor manera al verificar si para este virus existe una tendencia a obtener porcentajes mayores debido al azar o debido al efecto de la aplicación de termoterapia.

Los resultados del análisis tienen un valor tabular de 2, que es menor que el valor calculado de 4, lo que nos indica que las proporciones de las dos metodologías son iguales, por lo tanto no existe una marcada influencia del calor sobre la eliminación del

virus X, por lo tanto bajo estas condiciones el virus X, no es modificado en cuanto a sus proporciones en cualquiera de los métodos, este análisis se presenta en el apéndice en el Cuadro 5.

5.2. ANALISIS PARA EL VIRUS S

El análisis de las proporciones de plantas sanas del virus S, se realizó con el mismo objetivo que se realizó el análisis para el virus X.

Los resultados del análisis tienen un valor calculado de 0, por lo que cualquier estadístico tabulado va a ser mayor que este valor, esto permite inferir que las proporciones obtenidas son diferentes estadísticamente por lo tanto bajo estas condiciones el virus S, es afectado por el tratamiento de calor. También podemos inferir que cuando se quiera eliminar particularmente este virus los mejores resultados se obtienen al aplicar un tratamiento de termoterapia. Esta situación probablemente se debe a las cualidades particulares del virus S, para las cuales la eficiencia del calor logra inactivarlo, pudiéndose generalizar esta situación para formas de virus similares, este análisis se presenta en el apéndice en el Cuadro 9.

5.3. ANALISIS PARA EL VIRUS Y

El análisis para el virus Y no cumple con las proporciones de los supuestos de la prueba de probabilidad exacta de fisher por lo que se utilizó la prueba de χ^2 con tabla de contingencia. Los resultados del análisis tienen un valor tabulado de 3.84 que es un mayor que el valor calculado obtenido de 2.1066. Dicho análisis nos indica que no existe diferencia estadística en cuanto a los métodos para eliminar el virus Y por lo que para este caso las proporciones estadísticas son iguales, el análisis se presenta en el apéndice en los Cuadros 7 y 8.

6. INDUCCION A LA FORMACION DE TUBERCULOS

Con el objeto de conservar las plantas sanas obtenidas de mejor manera se realizó una prueba para inducir la tuberización, evaluando 5 concentraciones de Bencil aminopurina, y su respuesta a la induccion a número de tubérculos, y la formación de tubérculos con los pesos mas altos.

6.1. ANALISIS EN BASE AL NUMERO DE TUBERCULOS

La concentración de 10 ppm de BAP indujo el mayor número de tubérculos, disminuyendo el número a medida que la concentración se redujo. El número promedio de tubérculos inducidos fue de 8 para el tratamiento de 10 ppm de BAP, siguiéndole en su orden: 5 para el tratamiento de 7.5 ppm de BAP, 4 para el tratamiento de 5 ppm de BAP, 4 para el tratamiento de 2.5 ppm de BAP y 3 para el tratamiento de 0 ppm de BAP. Estos resultados se pueden observar en el apéndice en el Cuadro 9.

En la Figura 2 puede apreciarse el comportamiento del número de tubérculos en relación a las concentraciones de Bencil aminopurina analizadas.

En el Análisis de Varianza se observa que existe diferencia significativa en cuanto a la induccion del número de tubérculos en los tratamientos. Estos resultados nos indica el efecto del BAP sobre la induccion a tuberculillos es diferente en cada tratamiento, en función de lo cual es necesario conocer cual es el tratamiento que posee las medias mas altas en la induccion a tuberculillos. El Cuadro 10 del apéndice muestra los resultados del ANDEVA realizado.

Para determinar cual es el mejor tratamiento se efectuó la prueba de medias de Tukey, en la que se contro que estadísticamente el tratamiento de 10 ppm tiene la media estadísticamente mas alta, por lo tanto es la que induce un alto número de tubérculos. Este análisis nos muestra que a medida que aumenta la concentración de BAP, aumenta la media de tubérculos, producidos. El análisis de la prueba de Tukey se observa en el apéndice en el Cuadro 11.

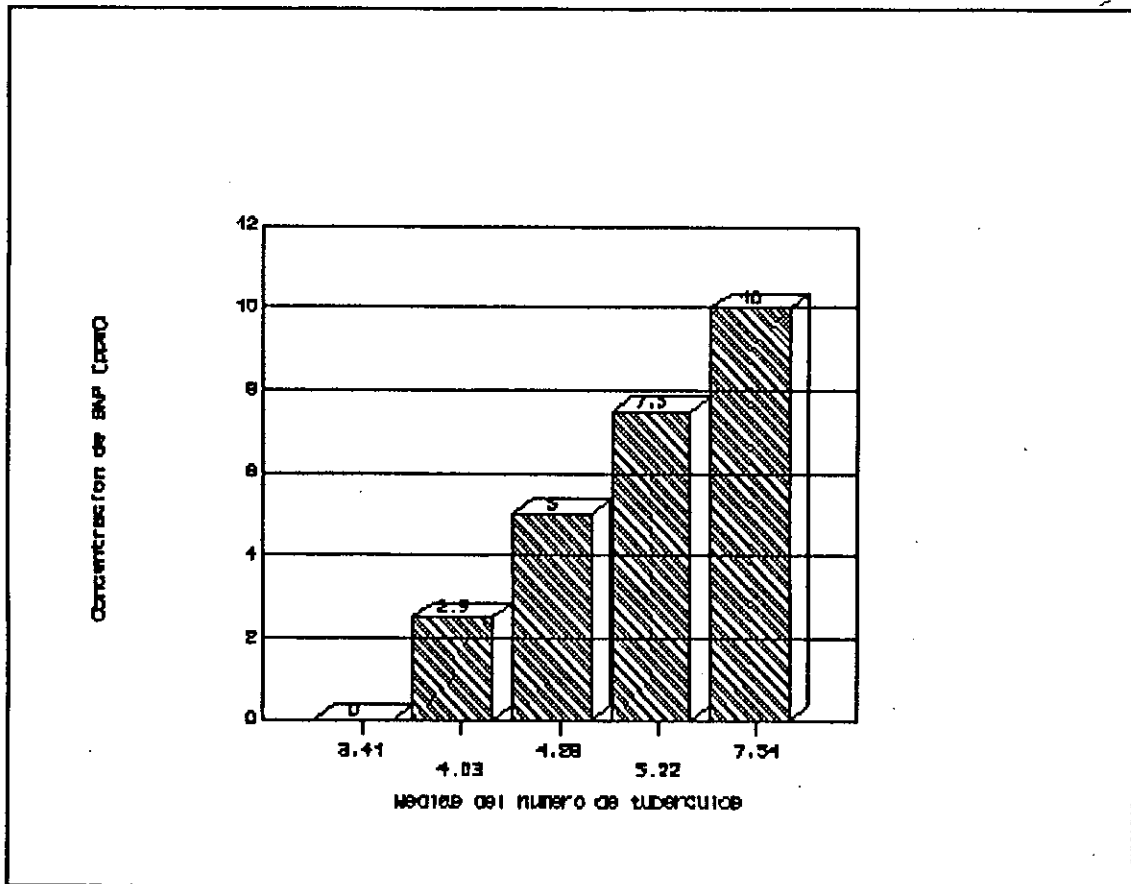


FIGURA 2. Número de tubérculos de papa *Solanum tuberosum* L. v.r. *Loman* producidos por diferentes concentraciones de Bencil aminopurina (BAP), al evaluar las concentraciones de 0 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 7.5 ppm y 10 ppm.

6.2. ANALISIS EN BASE A PESO DE TUBERCULOS

La medias de los pesos obtenidos que tuvo los pesos más altos fue la de la concentración de 2.5 ppm de Bencil aminopurina. Contrariamente a la inducción de número de tubérculos, las dosis son inversamente proporcionales en los pesos producidos por los tubérculos. Los resultados obtenidos en su orden fueron: 0.100 gramos para el tratamiento de 0 ppm de BAP; 0.475 gramos para el tratamiento de 2.5 ppm de BAP; 0.251 gramos para el tratamiento de 5 ppm de BAP; 0.149 gramos para el tratamiento de 7.5 ppm de BAP y de 0.182 gramos para el tratamiento de 10 ppm de BAP. Sin embargo el comportamiento de los pesos fue muy irregular de acuerdo a las dosis empleadas. Estos resultados pueden observar en el Cuadro 12 del apéndice. El comportamiento de los resultados se observa en el Figura 3.

El análisis de varianza indica que los pesos obtenidos son estadísticamente diferentes para las medias de los tratamientos. En estos resultados se observa el efecto del BAP sobre los pesos de los tubérculos es diferente en cada tratamiento.

En función de lo cual es necesario conocer cual es el tratamiento que posee las medias mas altas en la induccion a tubérculos. El análisis de estos resultados se presenta en el apéndice en el Cuadro 13.

Para determinar el mejor tratamiento se efectuó una prueba de Tukey la que nos indica que el tratamiento de 2.5 ppm es el que posee la media de pesos mas altos. El análisis de la prueba puede observarse en el apéndice en el Cuadro 14.

Un análisis general nos indica que los tratamientos con BAP actúan proporcionalmente en la inducción de tubérculos, pero no así en el peso de tubérculos, los cuales los hace variar significativamente.

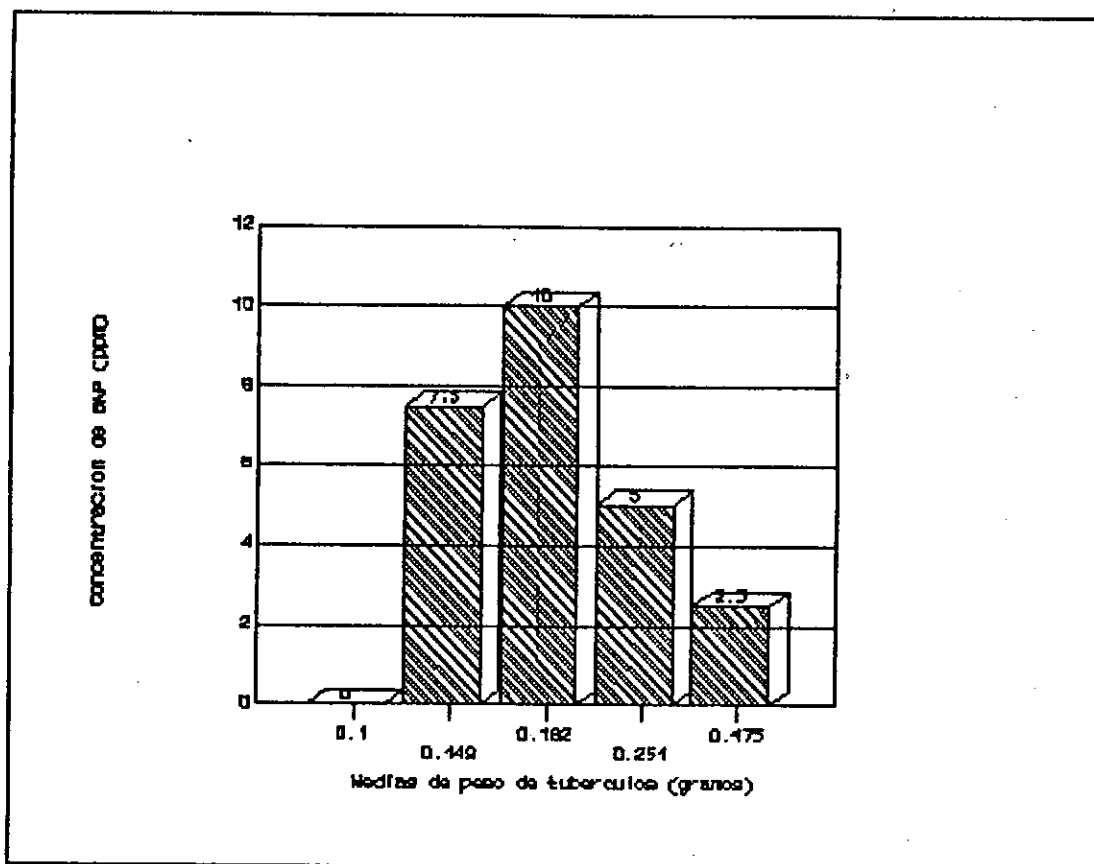


FIGURA 3. Pesos de tubérculos de papa *Solanum tuberosum* L. v.r. *Loman* alcanzados por los diferentes tratamientos de Bencil aminopurina al ser cultivados in vitro.

VII. CONCLUSIONES

Considerando los resultados expuestos en la presente investigación y bajo los supuestos de realización de estudio se concluye lo siguiente:

1. Estadísticamente no existe diferencias en la eliminación de cada uno de los virus X, Y y S en plantas de papa, *Solanum tuberosum* L. v.r. *Loman*. cuando se utiliza solo el cultivo de meristemos, sin embargo existe mayor facilidad para eliminar el virus S por este método, presentando mayor dificultad los virus Y y X en su orden.
2. Estadísticamente no existe diferencias en la eliminación de los virus X, Y y S en plantas de papa, *Solanum tuberosum* L. v.r. *Loman*., utilizando termoterapia previa a la extracción de sus meristemos. Sin embargo se elimina totalmente el virus S por esta metodología y en alto porcentaje los virus Y y X en su orden.
3. Estadísticamente no existe diferencias en la eliminación de los virus X, Y y S en plantas de papa, *Solanum tuberosum* L. v.r. *Loman*., utilizando solo cultivo de meristemos versus la aplicación de termoterapia previo a la extracción de meristemos. Sin embargo existe una tendencia a ser mas eficiente la eliminación de estos virus cuando se aplica termoterapia.
4. El virus S puede ser eliminado con mayor eficiencia previo a la extracción de meristemos de plantas de papa enfermas con este virus.
5. El virus S es afectado por la temperatura, por lo que a través del uso de termoterapia puede ser eliminado en un 100% de las plantas que estén infectadas con el.
6. La Bencil aminopurina tiene efectos en la inducción a la formación de tubérculos. Al incrementarse la concentración hasta 10 ppm se incrementa el número de tubérculos formados, este incremento es directamente proporcional a la concentración de Bencil aminopurina.

VIII. RECOMENDACIONES

En base a las conclusiones anteriores se recomienda:

1. Utilizar la presente metodología de aplicación de calor para eliminar los virus X, Y y S de plantas de papa *Solanum tuberosum L. v.r. Loman*. para obtener porcentajes altos de plantas sanas de estos virus, especialmente cuando los clones a sanar sean clones valiosos agronómicamente.
2. Utilizar la termoterapia para eliminar el virus S de plantas de papa infectadas con este virus.
3. Realizar estudios que cuantifiquen la dilución teórica de los virus X, Y y S al realizar clonación de plantas enfermas de estos virus y cultivarlas in vitro.
4. Probar esta técnica en otros virus de la papa, especialmente en aquellos que muestran dificultad en su erradicación.
5. Utilizar la técnica de inducción de tubérculillos para conservar el material libre de virus de manera mas eficiente y segura, para así reducir los costos de mantenimiento in vitro de los explantes sanos.
6. Evaluar concentraciones mayores de Bencil aminopurina para determinar el efecto proporcional a dosis mayores.
7. Someter a un análisis económico las metodologías utilizadas en esta investigación para obtener plantas de papa libres de los virus X, Y y S.
8. Considerando que la producción de plantas de papa *Solanum tuberosum L. v.r. Loman* libres de los virus X, Y y S a través del cultivo de meristemas con o sin aplicación de termoterapia no erradica los patógenos del campo de cultivo ni controla la infección a largo plazo porque las plantas no quedan inmunizadas, se recomienda, establecer un plan nacional para la liberación de virus del cultivo de la papa, el cual debe involucrar aspectos legales y varias instituciones del sector publico y privado. Tomando como metodología para la producción de plantas libres de virus el cultivo in vitro.

X. BIBLIOGRAFIA

- 1) BEEMSTER, A.B.R.; ROSENDAAL, A. 1972. Potato viruses properties and symptoms. *In* Viruses of potatoes and seed-potato production. Ed. de Box, J.A. Wageningen, Netherlands, s.n. p. 115-145.

Citado por: Mac Gillivray, M. E. 1981. Aphids. *In* Compendium of potato diseases. Ed. W.J. Hooker. Michigan, American Phytopathological Society. p. 101-103.
- 2) CISNEROS, F.H. 1986. Control biológico de las plagas con especial referencia al cultivo de la papa. *In* Curso sobre Control Integrado de Plagas de Papa (1.,1986. Bogotá, Col.). 1986. Memorias. Ed. por L. Valencia. Bogotá, Colombia, Centro Internacional de la Papa. p. 101-108.
- 3) CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-Linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virology* 34:475-483.
- 4) COMPENDIUM OF potato diseases. 1981. Ed. por W.J. HOOKER. Minesota, American Phytopathological Society. 125 p.

Citado por: Mac Gillivray, M. E. 1981. Aphids. *In* Compendium of potato diseases. Ed. W.J, Hooker. Michigan, American Phytopathological Society. p. 101-103.
- 5) DODDS, J.H.; LORIN, W.R. 1985. Experiments in plant tissue culture. 2 ed. New York, Cambridge University Press. 232 p.
- 6) DUCREUX, G.; ROSSIGNOL, L.; ROSSIGNOL, M. 1986. La patata. *La Recherche* (Francia) no. 57:409-423.
- 7) EQUIPO DE Elisa para la proteccion de virus en papa; instrucciones para su uso. s.f. Lima, Perú, Centro Internacional de la Papa. 10 p.
- 8) ESCALA, M.; GARCIA E.C. DE. 1981 Propagación in vitro de variedades de *Solanum tuberosum*, como método para la obtención de plantas libres de virus. *Agronomía Tropical* (Ven.) 3 (1-6):91-103.
- 9) ESPINOZA, N. *et al.* 1985. Cultivo de tejidos: micropropagación, conservación y exportación de germoplasma de papa. Lima, Perú, Centro Internacional de la Papa. 17 p. (Documento de Tecnología Especializada no.1).
- 10) ESTRADA, R.; TOBAR, P.; DOODS, J.H. 1986. Induction of in vitro tuber in a broad range of potato genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Netherlands) 7:3-10.

- 11) ESTRELLA, D.M. 1986. Producción de semilla de papa a partir de cultivo de tejidos. *In* Mejoramiento y Tecnología del Cultivo. (5., 1986, Quito, Ecuador). Ecuador, Universidad Central, Facultad de Ciencia Agrícolas. p. 187-205.
- 12) GUATEMALA. INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA AGRICOLAS. 1977. El cultivo de la papa en Guatemala. Guatemala. ICTA. Folleto Técnico no.6. p.23.
- 13) ----- 1988. Recomendaciones técnicas agropecuarias para los departamentos de Jutiapa y Jalapa. Guatemala. p.irr.
- 14) ----- 1988. Recomendaciones técnicas agropecuarias para el altiplano occidental. Guatemala. p.irr.
- 15) HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. 1984. Propagación de plantas, principios y prácticas. Trad. por Antonio M.A. México D.F., CECSA. 734 p.
- 16) HENKES, R.; DUNN, N. 1981. Aumenta el consumo de papa con nuevas variedades y nuevos métodos de producción, el cultivo de la papa puede extenderse a un número mayor de regiones. *El Surco* (Méx.) no.3:1-2.
- 17) HORTON, D. 1987. Potatoes, production, marketing and programs for developing countries. London, Westriew Press. 243 p.
- 18) KENNEDY, J.S.; DAY, M.F.; EASTOP, V.F. 1962. A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. London, Commonw. Inst. Entomology. 11 p.
- 19) LIZARRAGA, R. *et al.* 1987. Cultivo de tejidos para la eliminación de patógenos. Lima, Perú, Centro Internacional de la Papa. 23 p. (Guía de Investigación CIP. no.3)
- 20) MARTIN, C. 1985. La multiplicación de las plantas en probeta. *Mundo Científico* (España) no. 44:160-169.
- 21) MAX, R. 1984. La mejora de las plantas. *Mundo Científico* (España) no. 38:579.
- 22) MOORE, T.C. 1979. Biochemistry and physiology of plant hormones. Springer-Verlag, New York, Heiderberg Berlin. p. 274.
- 23) MOREL, G.G.; MARTIN, G. 1952. Guerison de dahlias atteintes d'une maladie a virus. *C.R. de L'Acad. LSc. (Paris)* 235:1324-1325.
- 24) MURASHIGE, T.G.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant. (EE.UU.)* 15:473-497.
- 25) NELSON, M.G.; MIGUEL, Q.B. 1980. Técnicas de multiplicación rápida de papa. Perú, Centro Internacional de la Papa. 43 p.

- 26) PEREA, M.; NAVARRO, A.W. 1988. Técnicas in vitro. Costa Rica, Universidad Nacional Costa Rica. 105 p.
- 27) REINERT, M.M.; YEOMAN, M.M. 1982. Plant cell and tissue culture, a laboratory manual. Springer-Verlag, New York, Berlin Heidelberg. 83 p.
- 28) ROHMAND & HASS (Florida). 1979. La papa; control de sus enfermedades y plagas en América Latina. Florida. 40 p.
- 29) SALAZAR, L.F. 1982. Enfermedades virosas de la papa. Lima, Perú, Centro Internacional de la Papa. p. 111.
- 30) SHIIDE-RENTSCHLER, L.; SHMIEDICHE, P.E. 1984. El cultivo de tejidos, su pasado, presente y futuro. CIP. Circular (Perú) 12(1):1-12.
- 31) SIBRIAN, R. 1984. Manual de técnicas estadísticas simplificadas. Guatemala, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. 265 p.
- 32) VILLALOBOS, M.; GARCIA, V. 1982. Plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), libres de virus por cultivo in vitro de meristemos y ápices vegetativos. Agrociencia (Méx.) no. 48:107-118.
- 33) VIRUSES OF potatoes and seed potato production. 1972. Ed. por J.A., de Bokx. Wageningen, Netherlands, s.n. 233 p.
- 34) WHITE, P.R. 1934 Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol. (EE.UU.) 9:585-600.

Vo. Co.
Patualla



APENDICE

APENDICE

1. MEDIOS DE CULTIVO

1.1. Medio de regeneración: Este medio fue usado para cultivar esquejes enfermos de los virus X, Y y S, para regenerar meristemos, y para regenerar plantas a partir de meristemos.

Cuadro 1. Medios de cultivo utilizados.

El medio nutritivo es el propuesto por Murashige y Skoog (1962), adicionado con 0.25 ppm de ácido giberelico, 2 ppm de Acido D-pantoténico de calcio, 3% de sacarosa y 0.6 % de agar.

Salas (Para preparar en 200 cm³ de agua destilada. Esta solución tiene una concentración de 10 x).

	NH ₄ NO ₃	33	g.
	KNO ₃	38	g.
	CaCl ₂ .2H ₂ O	8,8	g.
	KH ₂ PO ₄	3,4	g.
	H ₃ BO ₃	0,124	g.
	MnSO ₄ .4H ₂ O	0,446	g. (ó bien 0,338 g. de MnSO ₄ .H ₂ O)
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,172	g. (ó bien 0,1228 g. de ZnSO ₄ .H ₂ O)
	KI	0,0166	g.
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,005	g.
a	{	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0005 g.
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0005 g.

Preparar por aparte:

- a) 5 mg de estas dos sales en 10 cm³ de agua destilada y tomar 1 cm³ = 0,0005 g.
- b) 3.7 g de MgSO₄·7H₂O en 100 cm³ de agua destilada, para preparar una solución concentrada 100 x.
- c) Solución de Hierro; disolver en 100 cm³ los compuestos químicos de la manera siguiente:
 - 0,557 g. de FeSO₄·7H₂O en 20 cm³ de agua destilada.
 - 0,745 g. de Na₂EDTA en 20 cm³ de agua destilada a medida que se calienta el agua.
 (Mezclar los dos compuestos, y dejarlos enfriar, luego completar el volumen requerido.)
- d) Solución de vitaminas: disolver 40 mg de Tiamina HCl en 100 cm³ de agua destilada.

Un litro de medio de cultivo se prepara agregando en un litro de agua los preparados siguientes:

- 100 cm³ de sales
- 10 cm³ de MgSO₄·7H₂O
- 5 cm³ de solución de hierro
- 1 cm³ de vitaminas
- 100 mg de inositol.

A esta solución se le agrega los compuestos descritos arriba, se procede a esterilizarlos en un autoclave a 121°C, durante 15 minutos a una presión de 15 libras por pulgada cuadrada.

1.2. Para la inducción a tubérculillos se utilizaron dos medios sin agar, un medio se utilizó para regenerar esquejes y el otro para inducir tubérculillos. Los componentes fueron los mismos descritos, para el medio M. S. (1962), con la variante de los agregados hormonales que se describen a continuación:

Cuadro 1a. Composición del medio para inducción a tuberculillos, tomada de Estrada, *et al.* 1986.

Compuestos (mg/l)	Medio para crecimiento de esquejes	Medio para inducción a tuberización
	M.S. +	M.S. +
Thiamina HCl	0.4	0.4
Pantotenato de calcio	2.0	---
Acido Giberelico	0.4	---
Benzyl amino purina	0.5	*
Acido Naftalenacetico	0.01	---
Cloruro de colina (CCC)	---	500
Inositol	100	100
Sucrosa	2%	8%

* La concentración varió de acuerdo al tratamiento: 0, 2.5, 5, 7.5 y 10 ppm de BAP.

Cuadro 2. Prueba de Q de COCHRAN; análisis de la relación entre cada uno de los virus estudiados y el tratamiento de meristemos.

MERISTEMO Nº	VIRUS X	VIRUS Y	VIRUS S	L_i	l_i^2
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	1	0	1	2	4
4	0	1	1	2	4
5	0	0	0	0	0
6	0	1	0	1	1
7	1	0	0	1	1
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
10	1	0	0	1	1
11	1	1	0	2	4
12	1	1	1	3	9
13	0	0	0	0	0
14	1	0	1	2	4
15	1	1	0	2	4
16	1	1	0	2	4
$\Sigma G_j =$	8	6	4	$\sum_{i=1}^{16} L_i = 18$	$\sum_{i=1}^{16} L_i^2 = 36$

$\Sigma G_j^2 =$	64	36	16
------------------	----	----	----

Nota: el 1 significa presencia de virus, el 0 ausencia de virus.

Valor de Q calculado = 2.666

Valor de Q tabulado $\alpha 0.05 (k-1) = 5.99$

Entonces: $Q_c 2.666 < Q_t 5.99$ se acepta H_0 .

Cuadro 3. Prueba de Q de COCHRAN: análisis de la relación entre virus presentes en los meristemas extraídos de esquejes previamente sometidos a termoterapia y su relación con el método.

MERISTEMO NO.	VIRUS X	VIRUS Y	VIRUS S	L_i	l_i^2
1	1	0	0	1	1
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	1	0	1	1
5	1	0	0	1	1
6	1	0	0	1	1
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
10	0	1	0	1	1
11	1	0	0	1	1
12	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0
$\Sigma G_j =$	4	2	0	$\sum_{i=1}^{16} L_i = 6$	$\sum_{i=1}^{16} l_i^2 = 6$
$\Sigma G_j^2 =$	16	4	0		

El número 1 indica presencia y el 0 ausencia de virus.

Valor de Q Calculado = 4

Valor Tabulado de Q α 0.05 (k - 1) = 5.99

Entonces: $Q_c 4 < Q^t 5.99$; se acepta H_0 .

Cuadro 4. Prueba de la probabilidad exacta de Fisher, en el análisis de las proporciones de plantas sanas obtenidas, a través del cultivo de esquejes de plantas enfermas de los virus X, Y y S para los tratamientos de solo extracción de meristemos, y aplicación de termoterapia previo a la extracción de meristemos

Tratamiento	solo Meristemos	termoterapia seguida de extracción de Meristemos	
Plantas enfermas	10	6	16 = A
Plantas sanas	6	10	16 = B
Σ	16	16	

Valores del estadístico aplicado:

$$\alpha = 0.05 \text{ dos colas}$$

$$A = 16$$

$$B = 16$$

$$a = 10$$

Valor de la tabla de Fisher
estadístico tabulado. = 3

Entonces: $b = 6 > 3$ por lo que no se rechaza la hipótesis nula.

Cuadro 5. Datos tabulados de las plantas sanas y enfermas de el virus X obtenidas de los tratamientos de cultivo de estacas "in vitro" seguidas de la extracción de meristemos, y de termoterapia aplicada a estacas cultivadas in vitro seguidas del cultivo de meristemos, para la prueba de probabilidad exacta de FISHER.

Tratamiento	termoterapia seguida de Meristemos	solo extracción de Meristemos	
Plantas sanas	12	8	20 = A
Plantas enfermas	4	8	12 = B
	16	16	

oc = 0.05 dos colas

A = 20

B = 12

a = 12

b = 04

Valor de la tabla de Fisher
estadístico tabulado. = 2

b = 4 > 2 por lo que no se rechaza la hipótesis nula.

Cuadro 6. Datos tabulados de las plantas sanas y enfermas de el virus S obtenidas de los tratamientos de cultivo de esquejes cultivados in vitro seguidas de la extracción de meristemos, y de termoterapia aplicada a esquejes subcultivados in vitro antes de la extracción de sus meristemos para la prueba de probabilidad exacta de FISHER.

Tratamiento	termoterapia seguida de Meristemos	solo extracción de Meristemos	
Plantas sanas	16	12	28 =A
Plantas enfermas	0	4	04 =B
	16	16	

oc = 0.05 dos colas

A = 28

B = 04

a = 16

b = 00

Valor de la tabla de Fisher

estadístico tabulado. = 0

b = 0 < que cualquier estadístico calculado por lo que se rechaza la hipótesis nula, y se acepta la alternativa.

Cuadro 7. Datos tabulados de las plantas sanas y enfermas de el virus Y obtenidas de los tratamientos de cultivo de esquejes cultivados in vitro seguidas de la extracción de meristemos, y del tratamiento de termoterapia aplicada a esquejes subcultivadas in vitro antes de al extracción de sus meristemos, para la prueba de χ^2 .

Tratamiento	termoteria seguida de Meristemos	solo extracción de Meristemos	
Plantas sanas	14	10	24 = A
Plantas enfermas	2	6	08 = B
	16	16	

$$\alpha = 0.05 \text{ dos colas}$$

$$A = 28$$

$$B = 04$$

$$A+B = 32$$

Valor esperado:

$$\text{para plantas sanas} = 12$$

$$\text{para plantas enfermas} = 4$$



Cuadro 8. Datos tabulados de las plantas sanas y enfermas de el virus Y obtenidas de los tratamientos de cultivo de esquejes in vitro ante de la extracción de sus meristemas, y de termoterapia aplicada a esquejes subcultivadas in vitro antes de la extracción de sus meristemas, segun tabla de contingencia de la prueba de χ^2 .

Tratamiento	termoteria seguida de Meristemas	solo extracción de Meristemas	
Plantas sanas observadas	14	10	24 = A
Plantas sanas esperadas	12	12	
Plantas enfermas observadas	2	6	08 = B
Plantas enfermas esperadas	4	4	
	16	16	$\Sigma = 32$

Grados de libertad = $N-1 = 2-1 = 1$.

χ^2 calculado = $3.84 > 2.1066$.

Se acepta la hipotesis nula, por lo que las proporciones de plantas sanas del virus Y obtenidas para ambos metodos es la misma.

Cuadro 9. Resultado del número de tubérculos inducidos por los tratamientos de Bencil aminopurina, al evaluar su efecto en la inducción en cuanto a número.

TRATAMIENTO	0 PPM	2.5 PPM	5 PPM	7.5 PPM	10 PPM
Repetición I	4	7	4	5	12
Repetición II	2	5	4	6	8
Repetición III	3	3	4	5	5
Repetición IV	5	2	5	4	6

Cuadro 10. Análisis de varianza para el promedio de tubérculos producidos en el medio M.S. suplementado con 500 ppm de CCC. y los tratamientos con Bencil aminopurina en los rangos de 0 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 7.5 ppm y 10 ppm.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	FT (0.05)
TRATAMIENTO	4	1.94210411	0.48552603	3.15	0.0457*
ERROR	15	2.312668792	0.15417919		
TOTAL	19	4.25479203			

C.V. = 17.94607

ft = 0.0457 < 0.05

Se acepta h_0 . Existen diferencias significativas en los tratamientos en la inducción a tuberculillos.

Cuadro 11. Análisis de la prueba de Tukey's en relación a las medias del de número de tubérculos bajo diferentes concentraciones de BAP, en un medio M.S. suplementado con 500 ppm de CCC. y los tratamientos con Bencil aminopurina en los rangos de 0 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 7.5 ppm y 10 ppm. establecido para la inducción de tubérculillos.

Grupo de Tukey	Medias	N	Tratamientos con BAP en ppm
A	2.745	4	10 ppm
A			
B A	2.284	4	7.5 pmm
B A			
B A	2.059	4	5 ppm
B A	2.007	4	2.5 ppm
B			
B	1.846	4	0 ppm

Las medias con igual letra son estadísticamente iguales.

(Recuerdese que las medias estan transformadas por la raíz cuadrada.)

Cuadro 12. Resultado de la media del peso de tubérculos en gramos por los tratamientos de Bencil aminopurina, al evaluar su efecto en la inducción en cuanto la media de pesos por tratamiento.

TRATAMIENTO	0 PPM	2.5 PPM	5 PPM	7.5 PPM	10 PPM
Repetición I	0.09595	0.226314	0.5272	0.2491416	0.1675332
Repetición II	0.2256	0.64922	0.12925	0.0885833	0.149925
Repetición III	0.057833	0.298066	0.21875	0.220818	0.24594
Repetición IV	0.018880	0.72715	0.12908	0.036425	0.16555

Cuadro 13. Análisis de varianza para el promedio de peso de tubérculos producidos en el medio M.S. suplementado con 500 ppm de CCC. y los tratamientos con Bencil aminopurina en los rangos de 0 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 7.5 ppm y 10 ppm.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	FT (0.05)
TRATAMIENTO	4	0.34576499	0.08644125	3.65	0.0287*
ERROR	15	0.35531595	0.02368773		
TOTAL	19	0.70108093			

$$C.V. = 66.51379$$

$$ft = 0.0287 < 0.05$$

Se hacepta ha. Existen diferencias significativas en los tratamientos en función de los pesos obtenidos en la prueba de inducción a tuberculillos.

Cuadro 14. Análisis de la prueba de Tukey's en relación a las medias del peso de tuberculos obtenidos bajo diferentes concentraciones de BAP, en un medio M.S. suplementado con 500 ppm de CCC. y los tratamientos con Bencil aminopurina en los rangos de 0 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 7.5 ppm y 10 ppm establecido para la inducción de tubércuillos.

Grupo de Tukey	Medias	N	Tratamientos con BAP en ppm	
	A	0.475	4	2.5 ppm
	A			
B	A	0.251	4	5 ppm
B	A			
B	A	0.182	4	10 ppm
B	A			
B	A	0.149	4	7.5 ppm
B				
B		0.100	4	0 ppm

Las medias con igual letra son estadísticamente iguales.



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
 FACULTAD DE AGRONOMIA
 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
 AGRONOMICAS

LA TESIS TITULADA: PRODUCCION DE PLANTAS DE PAPA (Solanum tuberosum L.
 v.r. Loman) LIBRES DE LOS VIRUS X, Y y S, A TRAVES DEL CULTIVO DE MERIS-
 TEMOS Y EL USO DE TERMOTERAPIA APLICADA A PLANTAS ENFERMAS CON ESTOS VIRUS.

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: BYRON MANUEL ZUÑIGA CASTILLO.

CARNET No. 83- 13782

HA SIDO EVALUADA POR LOS SIGUIENTES PROFESIONALES: Ingenieros Agrónomos
 Fernando Rodríguez y Arturo López.

LOS ASESORES Y AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA HACEN CONSTAR QUE HA
 CUMPLIDO CON LAS NORMAS UNIVERSITARIAS Y REGLAMENTOS DE LA FACULTAD DE AGRO-
 NOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

Ing. Agr. Edgar Franco
 ASESOR

Ing. Agr. Edil Rodríguez
 ASESOR

Vo.Bo. Ing. Agr. Hugo A. Tobías
 DIRECTOR IIA



I M P R I M A S E :

Ing. Agr. Anibal Martínez
 D E C A N O



LM/dydea