

## I. INTRODUCCIÓN

La papa *Solanum tuberosum* L., es originaria de la región montañosa de los andes en América del Sur, es un cultivo alimenticio de importancia mundial en la dieta del hombre y en muchos casos es básico, tiene usos forrajeros e industriales; ocupa el cuarto lugar en el mundo entre las plantas cultivadas y ocupa una gran cantidad de mano de obra para su producción. En México la superficie sembrada con papa en el período 90-96 fue de 181,654.41 ha. y la superficie cosechada 67,777.15 ha., con una producción nacional de 1'204,510 ton. y un rendimiento promedio nacional de 21.17 ton.ha<sup>-1</sup>. Este cultivo a recibido inmensamente la influencia de los avances científicos y técnicos y ha sido mejorado en aspectos como el rendimiento, la calidad, el control de plagas y enfermedades, en la conservación e industrialización, lo que ha incrementado los rendimientos pero también los costos de producción. El cultivo presenta un gran número de problemas fitosanitarios, los cuales comienzan desde la siembra cuando se utiliza tubérculo semilla infectado por diversos fitopatógenos, obteniéndose a la emergencia un cultivo con plantas enfermas, caro por su control y de bajo potencial de rendimiento, por lo que el agricultor a reconocido que el sembrar tubérculo de papa libre de enfermedades y plagas, es determinante para obtener un cultivo sano que con un buen manejo garantizará un alto rendimiento en campo y menores costos de producción. En México hay un déficit de tubérculo semilla de papa de alta calidad fitosanitaria que se haya producido bajo la tecnología moderna que integra trabajos del laboratorio, invernadero y campo; por ello, en el presente estudio, se estableció como objetivo general llevar a cabo un conjunto de trabajos experimentales para integrar estas tres fases de la producción moderna de tubérculo

semilla de papa, particularmente bajo las condiciones del Noreste de México, donde el cultivo de la papa presenta los rendimientos más altos del país (40-50 ton. ha<sup>-1</sup>), resultado de una alta tecnología en su manejo.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Fase de laboratorio

#### 2.1. 1. La producción moderna de tubérculo semilla sano de papa

El cultivo *in vitro* de meristemas, yemas axilares y ápices de papa es una técnica que es ampliamente utilizada en la obtención de plantas libres de enfermedades, las cuales se mantienen *in vitro* para la conservación de germoplasma, para el intercambio internacional de material genético y como apoyo en la propagación masiva de tubérculo semilla de papa de alta calidad fitosanitaria y genética (Hawkins, 1992).

La producción moderna de tubérculo semilla de papa libre de patógenos que se utiliza en la producción comercial de campo tiene tres fases: a) obtención y multiplicación rápida de plantas *in vitro* libre de enfermedades, b) siembra bajo invernadero de la planta sana *in vitro* para la obtención de minitubérculos sanos y c) producción en campo de tubérculo semilla sano en la categoría Certificada, para una distribución en siembras comerciales la cual se logra, a partir del minitubérculo y siembras sucesivas para obtener semilla Básica, Registrada (R ), RI, RII, RIII y Certificada, esta ultima para producción de tubérculo para consumo (Valdés 1995).

#### 2.1.2. Procedimiento general para la obtención y multiplicación de papa *in vitro* sana.

La obtención y multiplicación de papa sana *in vitro*, en su primer fase de la producción de tubérculo-semilla se lleva a cabo en el laboratorio y se inicia con la siembra de una sección de tejido vegetal de la papa, llamado explante, en un medio de cultivo artificial, el cual bajo condiciones de esterilidad y los apropiados requerimientos de temperatura y luz, crece para dar origen a una plántula *in vitro* en

poco tiempo, que es seccionada en microestacas, las cuales son subcultivadas nuevamente y así sucesivamente hasta tener tantos miles de plantas *in vitro* como se hayan planeado (Gálvez y Lorence, 1997).

#### **2.1.2.1 Medio de cultivo para la multiplicación de papa *in vitro***

El medio de cultivo semisólido más utilizado para la multiplicación de explantes sencillos, se denomina MS dado que fué desarrollado por Murashige y Skoog en 1962; sus constituyentes inorgánicos y orgánicos se muestran en el Cuadro No. 1 (Murashige y Skoog, 1962).

#### **2.1.2.2. Establecimiento de plantas *in vitro***

Para la obtención de las primeras plantas *in vitro* sanas, se toman como explantes ápices de las yemas apicales y axilares de una planta visualmente sana o de los brotes de un tubérculo visualmente sano, los ápices son cuidadosamente lavados y desinfectados en hipoclorito de sodio al 2% para luego enjuagar con agua estéril y sembrarlos en tubos de ensaye u otros contenedores con el medio MS de cultivo, previamente esterilizado. Este trabajo se lleva a cabo bajo condiciones asépticas, lográndose esto en un ambiente que ha sido previamente aseado y desinfectado con hipoclorito de sodio (NaClO) al (0.05%) ó alcohol al 6%, efectuándose la siembra de los ápices en el medio, en una campana de flujo laminar (CIP, 1997).

#### **2.1.2.3. Crecimiento de la planta de papa *in vitro***

Una vez establecido el explante, los ápices inician rápidamente la brotación y en dos a cuatro semanas se obtiene una planta *in vitro* con seis o siete nudos. Las

plántulas *in vitro* son seccionadas en microestacas con una ó dos yemas para ser transferidas nuevamente a recipientes con medio de cultivo MS estéril y así sucesivamente para incrementar la cantidad de plantas *in vitro* hasta obtener un total preestablecido (Espinosa et. al, 1992).

**Cuadro No. 1 Sales inorgánicas que componen el medio de cultivo para la siembra de papa *in vitro*, Murashige y Skoog 1962.**

<b>Macronutrientes</b>	<b>mg/L</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	---
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	---
<b>Micronutrientes</b>	<b>mg/L</b>
KI	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	22.3
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	---
ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27.8
<b>Componentes orgánicos</b>	
	<b>mg/L</b>
Inositol	100
Tiamina Hcl	0.5
Acido giberelico GA <sub>3</sub>	100
Sacarosa	20,000
agar	4000
pH	5.7

#### **2.1.2.4. Condiciones ambientales en el cultivo de tejidos en papa**

Las plántulas de papa *in vitro* se mantienen y crecen bajo las condiciones de temperatura de 18 a 22°C, un fotoperíodo de 16 horas luz, una humedad relativa del 60 al 70% y una intensidad lumínica de 1200 lux (Gálvez y Lorence 1997).

#### **2.1.3. Obtención de plantas *in vitro* sanas**

En México se pueden obtener plantas libres de enfermedades si se importan de empresas especializadas privadas o gubernamentales, de Estados Unidos y Canadá así como de producción nacional, los precios van de \$ 0.25 USD a \$ 0.35 USD. Otra forma de obtener plantas sanas *in vitro* es a partir de minitubérculo sano nacional o importado el cual ha sido indexado por algún laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario acreditado ante la SAGARPA. Los ápices de los brotes de minitubérculo indexado serán los explantes a partir de los cuales se logrará establecer y producir plántulas sanas de papa *in vitro*, esto se ha logrado en el Proyecto SYREYES 95/034 FAUANL-HBR (Gálvez y Lorence 1997).

Una alternativa adicional consiste en proceder al uso de las técnicas de saneamiento por extracción de los meristemas de los ápices de brotes ó yemas axilares después de, al someter las plantas de papa a las técnicas de termoterapia, quimioterapia o electroterapia, las cuales permiten obtener ápices ó meristemas sanos con alta frecuencia y de ellos plantas *in vitro* sanas, incluso a partir de una planta infectada por virus (Valdés 1995).

### **2.1.3.1. Extracción de meristemos.**

El meristemo es un tejido indiferenciado localizado dentro del ápice de un brote o yema axilar ó apical en crecimiento, generalmente observándose bajo el microscopio como una estructura brillante en forma de domo, su medida es menor a 0.1 mm de longitud y en constante división celular, se asume que está libre de virus por carecer aún de los vasos del floema bien diferenciados, impidiéndose así la presencia de partículas vírales en el meristemo al no moverse del tejido infectado de una planta enferma, al tejido sano en formación. (Lizárraga, 1991).

### **2.1.3.2. Termoterapia**

Consiste en la aplicación de calor al tejido vegetal en crecimiento, buscando márgenes térmicos en los cuales las plantas se recuperen, en tanto que el ARN del virus se desnaturaliza o se dificulta su replicación después del tratamiento. Para un virus ó un fitoplasma, existen niveles de temperatura y tiempos de exposición, los cuales han dado mejor resultado en la eliminación de estos fitopatógenos, excepto los viroides, en los tejidos infectados (Lozoya, 1995), estos niveles de temperatura y tiempos de exposición se presentan en el Cuadro No. 2, (Lizarraga, 1991).

### **2.1.3.3. Quimioterapia**

Aun cuando no existen "viricidas" o productos que eliminen a los virus fitopatógenos directamente en el tejido infectado, se han identificado sustancias de acción directa y específica que actúan en contra de su replicación, tal es el caso del Ribavirin, el cual aplicado al medio de cultivo en el cual crecen las



plantas *in vitro* infectadas por virus, interfiere en la replicación viral, permitiendo que los meristemos crezcan libres de virus, tales meristemos se toman como explantes para la producción de plantas *in vitro* libres de virus (Lozoya, 1995)

#### 2.1.3.4. Electroterapia

Es la aplicación de corriente eléctrica la cual aumenta la temperatura del tejido vegetal por lo que podría ser una alternativa para el saneamiento de material vegetal infectado con virus, esta técnica es combinada con el cultivo de tejidos para multiplicar el material tratado, (Lozoya, 1995).

**Cuadro No. 2. Relación de intensidad de tratamiento con calor y la eliminación de fitopatógenos en papa.**

Patógeno	°C	Tiempo	Tejido
Punta Morada *	36	6 días	Tubérculo
Enrollamiento (LRV)	50	17 minutos	Tubérculo
	37.5	15-30 días	Tubérculo
PVY	38	7 días	Tallo-c.t-(**)
PVA	35	14 días	Tallo-c.t
PVX	35	15 semanas	Tallo-c.t.
	35	13 semanas	Tubérculo- c.t.
PVS	35	6 semanas	Tallo-c.t
	35	13 semanas	Tubérculo- c.t.
PSTV***	40	3 semanas	Tallo-c.t-
	35	39 días	Tubérculo

(\*) Fitoplasmas fácilmente eliminable.

(\*\*) Termoterapia con cultivo de tejidos.

(\*\*\*) Viroide no eliminado.

#### **2.1.4. Verificación de la fitosanidad de las plantas *in vitro* de papa**

Las técnicas modernas para evaluar la fitosanidad para virus, bacterias y fitoplasmas, tanto de la fuente de explantes como de las plantas *in vitro* una vez establecidas, son: la técnica serológica ELISA (Ensayo de Inmunoadsorción con Enzima Ligada) y la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa); sin embargo, también se utilizan técnicas tradicionales como el uso de plantas indicadoras diferenciales, medios de cultivo diferenciales y específicos para el caso de bacterias y hongos respectivamente. El conocer la fitosanidad del material vegetal permite continuar la propagación masiva de las plántulas de papa *in vitro* que han presentado un alto grado de calidad fitosanitaria, al estar libre de patógenos de importancia, los cuales son definidos en las normas fitosanitarias, para el caso de México la NOM-041-95 establecida por la Dirección General de Sanidad Vegetal de la SAGAR (SAGAR, 1996).

#### **2.1.5. Multiplicación masiva de planta *in vitro* sana**

Tal como se explicó en la sección anterior, independientemente del origen de la planta *in vitro* que se asume como sana, es recomendable la confirmación de su fitosanidad en un laboratorio autorizado para el efecto; para contar con la seguridad de tener plantas *in vitro* libres de enfermedades, para con ellas dar inicio a un programa de multiplicación masiva (SAGAR 1996).

La multiplicación masiva de las plantas *in vitro* sanas se logra mediante el corte del tallo en microestacas con una o dos yemas axilares, las cuales son transferidas al medio de cultivo descrito en la sección 2.1.2.3. En los subcultivos no

es necesaria la desinfección de las microestacas como en el caso de los explantes en la etapa de establecimiento sección 2.1.2.2.; sin embargo, la asepsia debe ser mantenida en el área de trabajo como se explica en la sección 2.1.4. y en todo el material y equipo de trabajo con la combinación de cloro (NaClO) al 2% y alcohol etílico al 70% flameado con la ayuda de un mechero, o bien el uso de hipoclorito de sodio al 2% y para la limpieza del área de trabajo e instrumental para siembra. Deberá esmerarse el aseo personal antes del inicio del trabajo de subcultivo, y utilizar tapabocas y gorra (Valdés 1995).

Al cabo de tres a cinco semanas la microestacas subcultivadas en medio de cultivo de multiplicación, se han convertido en nuevas plántulas *in vitro* para un siguiente subcultivo; como una regla general es recomendable no subcultivar por más de diez veces a partir del mismo explante, dado que algunos autores han observado que se puede presentar variación somaclonal, esto es, pueden obtenerse plantas *in vitro* las cuales presenten un genotipo diferente al de la planta original o planta donadora del explante, que es la que se desea micropropagar.

El número inicial de plantas *in vitro* a subcultivar depende de un programa previo de multiplicación masiva, en el cual se establece la cantidad de plantas *in vitro* a producir, dependiendo de los propósitos a alcanzar, ya sean de producción o de investigación (Valdés, 1998)

## **2.2. Fase de Invernadero.**

El objetivo en esta segunda fase de la producción moderna para la producción de tubérculo - semilla certificada, es transferir las plantas *in vitro* a suelo o algún otro sustrato estéril ó libre de fitopatógenos en la papa, bajo invernadero para la

producción de minitubérculo. El cultivo en invernadero debe contar con un control estricto de plagas para evitar la posible presencia de insectos vectores de enfermedades virales y también de enfermedades para mantener la sanidad original de la planta *in vitro* en los minitubérculos a cosechar.

### **2.2.1. Transferencia de la planta *in vitro* al suelo o sustrato en ambiente protegido.**

Las plántulas sanas de papa *in vitro* para producción de minitubérculos en ambiente protegido, se obtienen en un período de crecimiento de alrededor de cuatro semanas partiendo de la continua multiplicación en tubos de ensaye, frascos de vidrio ó cajas magenta, siendo transferidas al final de su crecimiento *in vitro*, directamente al suelo ó a bolsas ó cajas de plástico con un sustrato estéril, generalmente es utilizado el musgo asfángico ó composta mixta, bajo ambientes protegidos como son desde invernaderos sofisticados con control ambiental, invernaderos con mallas ó microtúnel con tela antiáfidos en clima favorable. Para un trasplante, las plantas *in vitro* deben tomarse con cuidado para evitar daños a las raíces, eliminar con agua limpia el resto del medio nutritivo artificial y al trasplante asegurar un buen contacto entre raíces y el sustrato de siembra (CIP 1992).

Dado que las plantas *in vitro* tienen un alto contenido de agua en el tejido, en la etapa de aclimatación deben de mantenerse en un ambiente con una humedad relativa alta durante los primeros días. Las plantas *in vitro* para trasplante directo en invernadero, deben ser de 3.5 a 4.5 cm de altura, deben tener al menos tres entrenudos, tres o cuatro pares de hojas y su ápice. En general y dependiendo de la variedad, las plantas más funcionales son las que tienen las hojas más anchas y el

tono de verde es más oscuro y raicillas en cada nudo (Gálvez y Lorence, 1997, Espinosa et al, 1992) , las cuales se transplantan a 10 cm equidistantes entre cada una de ellas, esto es 100 plantas por metro cuadrado.

### **2.2.2. Producción y Cosecha de Minitubérculos.**

El crecimiento de las plantas *in vitro* transcurre hasta su desecación artificial para la producción de minitubérculos aptos para cosecharse de 70 a 100 días, dependiendo de la variedad

Los minitubérculos producidos en invernadero, constituyen la categoría de tubérculo semilla pre-elite ó prebásica, una característica importante de los minitubérculos es su tamaño, en base al cual se han establecido categorías, las cuales varían poco entre autores, Cuadro No. 3.

### **.2.3. Fase de campo**

La fase de campo tiene como objetivo final producir el tubérculo - semilla en categoría Certificada, como resultado de cultivar subsecuentemente en el campo el minitubérculo producido en el invernadero para obtener las categorías: Básica, Registrada, (R ), RI, RII, RIII y Certificada. Lo anterior implica que para el caso de México, partiendo del minitubérculo, son seis generaciones autorizadas en campo para cosechar tubérculo - semilla en la categoría Certificada (SNICS - SAGAR, 1996); en el Cuadro No. 4 se muestran las equivalencias de las categorías de tubérculo semilla en México respecto a Canadá y algunos estados de la Unión Americana, en el cual se observar que en todos los casos se autorizan seis generaciones en campo excepto en Montana y Utah en donde sólo se autorizan cinco generaciones (SNICS - SAGAR, 1996).

**Cuadro No. 3 Calibres del minitubérculos en función de su tamaño Gálvez y Lorence (1997) (\*), Obtenidos en invernadero Valdés y Moreno (1998) (\*\*).**

<b>CATEGORÍA</b>	<b>TAMAÑO (diam. en cm)</b>
Perlita (**)	< 0.8
Categoría cero*	0.8 a 1.4
Categoría uno*	1.5 a 1.7
Categoría dos*	1.8 a 2.5
Categoría tres*	2.6 a 3.5
Categoría cuatro*	3.5 a 4.5
Gigantes* Categoría cinco**	4.6 en adelante

**Cuadro No. 4 Terminología por generación de material de papa en México, Canadá y los diferentes estados de producción de los EUA (SNICS-SAGAR, 1996).**

<b>ESTADO</b>	<b>ORIGEN (Anterior a campo)</b>	<b>1 año</b>	<b>2 años</b>	<b>3 años</b>	<b>4 años</b>	<b>5 años</b>	<b>6 años</b>
México	Lab. Gh*	Básica	Registrada	Registrada I	Registrada II	Registrada III	Certificada
Canadá	Lab. Gh*	Pre-Elite	Elite 1	Elite 2	Elite 3	Fundación	Certificada
Alaska	Lab. Gh*	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Generación 4	Generación 5	Generación 6
California	Lab. Gh*	Nuclear	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Fundación	Certificada
Colorado	Lab. Gh*	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Generación 4	Generación 5	Generación 6
Idaho	Lab. Gh*	Nuclear	Elite	Elite	Elite	Fundación	Certificada
Maine	Lab. Gh*	Nuclear 1	Nuclear 2	Nuclear 3	Generación 1	Generación 2	Generación 3
Michigan	Lab. Gh*	Nuclear 3	Generación 1	Generación 2	Fundación	Fundación	Certificada
Minnesota	Lab. Gh*	Nuclear	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Generación 4	Generación 5
Montana	Lab. Gh*	Nuclear	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Generación 4	-----
Nbraska	Lab. Gh*	Nuclear	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Fundación/FA	Certificada
New York	Lab. Gh*	Seed Plot	Fundación/ Uhlein Farm	Fundación/ Uhlein 1	Fundación/ Uhlein 2	Fundación/ Uhlein 3	Fundación
North Dakota	Lab. Gh*	Nuclear	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Generación 4	Generación 5
Oregon	Lab. Gh*	Nuclear	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Generación 4	Generación 5
Utah	Lab. Gh*	Nuclear	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Generación 4	-----
Wiscosin	Lab. Gh*	Univ. Farm	Univ. Farm	Fundación	Fundación	Fundación	Fundación

\* Laboratorio e Invernadero, minitubérculos.

### **2.3.1. Producción de tubérculo semilla Básica de papa o primera generación en campo**

En la producción de semilla básica, el objetivo es transferir al campo los minitubérculos producidos en invernadero, los cuales en su primera fase de laboratorio se obtuvieron de plantas *in vitro* libres de enfermedades, o bien producir tubérculo semilla básica a partir de un trasplante de planta *in vitro* sana directamente al campo, situación poco frecuente.

#### **2.3.1.1. Uso del minitubérculo**

Para sembrar una hectárea de minitubérculos en campo se requieren de 50 a 55 mil unidades, bajo una distancia entre surcos de 0.92 m y cinco minitubérculos por metro lineal. Se pueden producir de 18 a 25 ton ha<sup>-1</sup> de tubérculo semilla Básica en lugares cálidos, y de 25 a 30 ton ha<sup>-1</sup> en lugares templados (Gálvez y Lorence, 1997).

Es necesario tener especial cuidado con los tubérculos de categorías pequeñas ya que se recomienda enterrarse a mano, entre dos y tres veces su diámetro de profundidad. Los minitubérculos no deben tener daños físicos o "monos", es importante estar fisiológicamente maduros y brotados para obtener una emergencia uniforme. Son más lentos en su emergencia que las papas normales, ya que tardan una o dos semanas más, siendo la temperatura, el factor más importante que afecta la edad fisiológica de un minitubérculo; a mayor temperatura, la edad fisiológica será mayor, esto es, el minitubérculo estará más deteriorado (Gálvez y Lorence, 1997).



La semilla prebásica o minitubérculo y la semilla básica se producen generalmente en pequeña escala y en zonas aisladas, lejos de las zonas de producción comercial y libres de cuarentena, las cuales, son fácilmente supervisadas e inspeccionadas. (Van der Zaag, 1987).

### **2.3.1.2. Transplante de la planta *in vitro* sana directamente en campo.**

Aunque, como anteriormente se ha mencionado, el transplante es poco frecuente, la fase de aclimatación en el invernadero puede obviarse y las plantas *in vitro* pueden transplantarse directamente en el campo, usando hileras de gramíneas para protección contra insectos, después del trasplante, los días largos son favorables para la formación de raíces y estolones, lográndose en este caso la producción de tubérculo semilla en la categoría Básica. En esta etapa, se debe manejar de manera estricta el control de insectos vectores de virus y la presencia de enfermedades producidas por bacterias y hongos, esto permitirá cosechar tubérculos libres de enfermedades en la categoría Básica, correspondiente a la primera generación en campo (Atlantic Canada Potato Guide, 1993).

### **2.3.2. Producción de tubérculo semilla de papa certificada.**

A partir de la semilla Básica, se requieren de cinco años o cinco ciclos agrícolas para producir tubérculo semilla certificada para usarse en la producción comercial de papa. (Van der Zaag, 1987). Es importante que el estándar de fitosanidad del tubérculos semilla Básica hasta Certificada sea alto; y así mantener una constante producción de semilla sana en las explotaciones de semilla Certificada. (Bryan et al, 1991).

### **2.3.2.1. La región para producción de tubérculo semilla de papa.**

El suelo en el campo para la producción de tubérculo semilla de papa debe estar libre de patógenos que puedan ser transmitidos al tubérculo (Vargas, 1994), durante la etapa de crecimiento del cultivo. Las regiones seleccionadas para la producción de tubérculo semilla de papa deben estar libres de fitopatógenos y aislados de otras siembras comerciales de papa. Las zonas deben ser con un rendimiento potencial alto y permitir en el periodo de crecimiento mayor a 70 días. (Van der Zaag, 1987).

### **2.3.2.2. La temperatura en la producción de tubérculo semilla de papa**

Por lo general se acepta que la siembra de tubérculo semilla debe ser en un suelo con una temperatura alrededor de los 32°C cuando comienza a emerger, las temperaturas altas en el final de la etapa de crecimiento pueden afectar adversamente la calidad fitosanitaria y el vigor del tubérculo semilla. La duración del periodo de crecimiento puede acortarse defoliando, lo cual permite prevenir que las enfermedades foliares se extiendan a los tubérculos. (Van der Zaag, 1987).

La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan la edad fisiológica del tubérculo semilla (Atlantic Canadá Potato Guide, 1993). El desarrollo diario del tubérculo depende en gran medida de las temperaturas del día y de la noche y del suministro de agua. La temperatura óptima para la producción de papa es de 20-25°C durante el día y de 10-15°C en la noche. (Van der Zaag, 1987).

Las bajas temperaturas durante el día no afectan mucho al crecimiento. A temperaturas cercanas a 25°C la producción puede ser razonable, si el suministro de

agua es suficiente; a los 35°C la producción por lo general es menor. (Van der Zaag, 1987).

La duración del período de crecimiento está determinada con frecuencia por la temperatura prevaleciente. Las noches frías al comienzo del período de crecimiento son muy perjudiciales. Las temperaturas altas en el final de la etapa de crecimiento pueden afectar adversamente la calidad fitosanitaria y el vigor del tubérculo semilla de papa (Van der Zaag, 1987).

#### **2.3.2.3 Tamaño del tubérculo semilla de papa.**

Normalmente los calibres del tubérculo semilla Certificada comprenden entre 28 a 65 mm en variedades normales y entre 25 y 60 mm en variedades en que la longitud es más del doble de su ancho, el cual, de haberse producido bajo los cuidados de manejo antes mencionados permitirá una siembra de papa con un alto potencial de producción (Alonso, 1996).

#### **2.3.2.4. La fitosanidad del tubérculo semilla de papa de Básica a Certificada.**

En los países productores de tubérculo semilla de papa es muy importante el saneo al cultivo, el cual consiste en la eliminación de las plantas con síntomas de enfermedades, así como sus tubérculos, esto para prevenir la expansión de las mismas, por lo que esta práctica se debe hacer desde la emergencia hasta antes de la defoliación previa a la cosecha, para finalmente cosechar tubérculo semilla solamente de plantas sanas (Van der Zaag, 1987).

Un suelo ligero con buena estructura es el mejor para la producción de tubérculo semilla de papa, dado que las piedras y los terrones duros pueden causar

daños a los tubérculos, especialmente si la cosecha es mecanizada, el daño mecánico de los tubérculos a la cosecha es la causa de la infección por patógenos a través de las heridas y daños por enfermedades en bodega (Van der Zaag, 1987).

La Norma Mexicana exige una cierta fitosanidad del tubérculo semilla de papa, en las diferentes categorías, tal fitosanidad se da en el Cuadro No. 5, y como se observa, las bacterias que producen las enfermedades pierna negra y marchitez, así como el nemátodo dorado deben estar ausentes, siendo la tolerancia para los virus PVY, PVA, PVM, PVS y PLRV del 0.2% y para el PVX de 0.4%.

### **2.3.2.5. Aspectos relevantes de los principales virus de la papa presentes en México.**

En el cultivo de la papa uno de los principales problemas fitosanitarios son los virus debido a la forma de distribución, transmisión y su distribución geográfica. Los virus más importantes en México, dado que el tubérculo semilla tanto de importación como de producción nacional se exige por la NOM-041-FITO-1995, que esté prácticamente libre de ellos son los siguientes: PVX, PVY, PVA, PVS, PVM Y PLRV. Algunos aspectos relevantes referentes a estos virus han sido presentados por Lozoya, (1995) y estos se dan en el Cuadro No. 6 en el cual se puede observar que:

- 1 Es difícil distinguir entre los virus únicamente por sus síntomas.
- 2 Todos tienen como hospedero a especies de la familia solánaceas.
- 3 Excepto PLRV, en mayor o menor grado todos los virus se transmiten mecánicamente.
- 4 Excepto PVX, todos los demás virus se transmiten por áfidos.

5. En ninguno de los virus se ha reportado transmisión por semilla.
- 6 La reacción serológica no es uniforme entre los virus
- 7 Todos los principales virus de la papa son de ARN y de tipo varilla excepto para PLRV.
- 8 Todos estos virus están presentes en México.

Por lo anterior, la única forma de identificación plena de estos virus es mediante las técnica serológica ELISA ó PCR

#### **2.4. Variedades de Papa en México.**

Por consulta con productores de papa en México, el número de variedades más utilizadas es pequeño, particularmente por las exigencias del mercado para consumo fresco y por la industria del freído. Las variedades más usadas se describen a continuación (Valdés, 1998)

**Cuadro No. 5 Niveles de tolerancia permitida para algunas enfermedades y plagas en las diferentes categorías de tubérculo semilla de papa. NOM-041-FITO-1995. \***

Problema fitosanitario	Niveles de tolerancia permitidos					
	Básica	Registradas				Certificadas
Plagas B	B	R	RI	RII	RIII	C
Virus X de la papa	0.4%	0.4%	0.4%	0.4%	0.4%	3.0%
Virus Y de la papa	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	1.0%
Virus A de la papa	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	1.0%
Virus M de la papa	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	1.0%
Virus S de la papa	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	1.0%
Virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV)	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	1.0%
Pierna negra ( <i>Erwinia carotovora pv. atroseptica</i> )	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Pudrición de los tubérculos **1	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
<i>Streptomyces scabies</i>	0.5%	0.5%	1.0%	2.0%	2.0%	3.0%
<i>Spongospora subterranea</i>	0.5%	0.5%	1.0%	1.0%	2.0%	3.0%
Tizón tardío ( <i>Phytophthora infestans</i> )	0.5%	0.5%	1.0%	1.0%	2.0%	3.0%
<b>Plagas 2</b>						
Nemátodo dorado ( <i>Globodera rostochiensis</i> ) ***2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Marchitez bacteriana ( <i>Pseudomonas solanacearum</i> )	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

\* Formato modificado para su presentación en este escrito

Para plagas A1, la tolerancia son de 0.0%

\*\*1 Porcentaje de peso del tubérculo

\*\*\*2 Número de quistes por 200 g de suelo

**Cuadro No. 6. Principales virus de la papa; síntomas, hospederos, forma de transmisión y su distribución.**

	<b>PVX</b>	<b>PVS</b>	<b>PVY</b>	<b>PLRV</b>	<b>PVA</b>	<b>PVM</b>
Síntomas en papa	Desde asintomático hasta necrosis, mosaico ligero	Asintomático, mosaico ligero o clorosis	Moteado, necrosis sistemática y de las venas.	Enrollamiento foliar, coriacea necrosis vascular brote fino	Mosaico ligero rugosidad en el margen de la hoja.	Moteado, mosaico, enrollamiento, enanismo.
Hospedante	Solanáceas principalmente	Solanáceas principalmente	Solanáceas principalmente <sup>e</sup>	Solanáceas principalmente	Solanáceas	Limitada a algunas Solanáceas
Transmisión mecánica	Fácil y única	Hojas jóvenes solamente	Limitada	No	Con dificultad	Sí
Vectores	No reportados	Afidos de estilete	Afidos de estilete	Afidos circulatorios	Afidos de estilete	Afidos de estilete
Transmisión por semilla	No reportada	No reportada	No reportada	No reportada	No reportada	No reportada
Reacción serológica	Mosaicos del trébol, cactus x y del grupo potex	PVM y del grupo Carla	Variantes comunes y necróticas del mismo virus	Variantes del mismo virus	Miembros del grupo POTY	Distanciada con latente del clavel, PVS, B del crisantemo
Partícula	Varilla flexible ARN	Varilla flexible ARN	Varilla flexible ARN	Isometría ARN	Varilla flexible ARN	Varilla flexible ARN
Distribución geográfica	Mundial	Mundial	Mundial	Mundial	Solo en país con papa	Solo en país con papa

Fuente: Lozoya Saldaña, (1995)

**Alfa:** la forma del tubérculo es oval; con ojos poco profundos; piel, amarilla; pulpa, amarillo suave, flores malva, muy abundantes, tarda en desarrollarse. El rendimiento es alto; gravedad específica media; maduración tardía, 120 días; resistente a la enfermedad de la verruga; resistencia moderada a la defoliación tardía y a la polilla común de la papa, muy susceptible al virus del enrollamiento de la hoja (PLRV) y al virus Y de la papa (PVY). Poca brotación en almacenamiento. (Hettema S/F).

**Mondial:** Origen genealógico. Spunta x SVP Ve66-295. La maduración es semitardía en Europa del Norte, semitemprana en Medio Oriente y Norte de Africa. Los tubérculos son de forma oval alargada, ojos superficiales, piel amarilla, pulpa amarilla clara. Tamaño uniforme y alto rendimiento. El follaje con rápido desarrollo y alto grado de cobertura en el terreno, y flor blanca. Resistente al nemátodo dorado (*Globodera rosotochiensis*), inmune a la sarna verrugosa, algo sensible a *Phytophthora infestans* de la hoja y poco sensible a la del tubérculo, poco resistente al virus del enrollamiento de la hoja, resistente a los virus A de la papa (PVA) y al virus X de la papa (PVX), sensible a la sarna común de la papa (*Streptomyces scabies*), algo sensible al *Fusarium*. Requiere un aporte moderado de nitrógeno y distancia grande entre plantas, buena conservación, firme al cocer, resistente a la sequía (Hettema S/F).

**Atlantic.** La Forma de tubérculo es oval o redondo; ojos poco profundos; piel delgada o gruesa, pulpa blanca; para siembra se utilizan tubérculos de tamaño grande y mediano, tienen hojas grandes, flores, lavanda. El rendimiento es alto; gravedad específica, alta; maduración temprana. Tiene Resistencia cero a la



defoliación tardía; resistencia al nemátodo dorado; inmune al virus X de la papa (PVX) y a necrosis de tubérculo, tolerante a escarabajo común (*Hettema S/F*).

Otras variedades que se han sembrado son: Norteña, Gigant, Carola, Snowden, etc, siendo últimamente de interés las variedades Premier, Adora y Morene por ser precoces y de alta calidad para el mercado nacional y para la industria.

## **2.5. Evaluación de la sanidad del material de papa mediante ELISA**

La NOM -041- FITO - 1995 (Proyecto de Norma Oficial Mexicana) establece los requisitos y especificaciones fitosanitarias para la inspección y Certificación Fitosanitaria de planta *in vitro*, minitubérculo y tubérculo semilla de papa mediante ELISA, para los casos de los virus PVY, PVX, PVS, PVA, PVM, y PLRV, así como para la bacteria *Clavibacter michiganensis pv. sepedonicum*, causante de la pudrición anular de la papa.

La prueba de Inmunoadsorción con Enzimas Ligadas o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), es un método confiable y rápido para la detección de agentes fitopatógenos, ya que hace posible la detección de cantidades muy pequeñas de estos agentes en los órganos de las plantas y además permite estimar la concentración de los fitopatógenos en el tejido enfermo (Cruz y Farías, 1997).

La sensibilidad de ELISA es superior a otras pruebas serológicas como la aglutinación, y la reacción de la precipitina, por lo que ha sido extensamente utilizada para la detección de patógenos en humanos, animales y plantas (Cruz y Farías, 1997)

Las pruebas serológicas como ELISA están basadas en la capacidad que tienen los agentes fitopatógenos (antígeno) para desencadenar la producción de inmunoglobulinas (anticuerpo) cuando son inyectados en organismos de sangre caliente. Estos anticuerpos reaccionan específicamente con la proteína del patógeno inyectado.

Actualmente existe una gran variedad de anticuerpos ligados a enzimas que se encuentran comercialmente disponibles para detectar diferentes agentes patogénicos en órganos vegetales por medio de la técnica ELISA (Cruz y Farías, 1997).

Para obtener resultados confiables, es necesario utilizar la parte u órgano de la planta donde existan altas concentraciones de virus, generalmente, la parte foliar en crecimiento es la más empleada para detectar agentes fitopatógenos, para detectar virus en tubérculos de papa se recomienda hacer un muestreo en yemas o de preferencia los brotes en crecimiento. (Peralta y Frías, 1987).

Para la fijación del antígeno por el anticuerpo; se toman 100 µl de macerado de tejido y se agregan a un pocillo de la placa (Figura 4 B apéndice) debe utilizarse una puntilla para cada muestra. Normalmente pueden utilizarse todas las celdillas de la placa, pero la experiencia dicta que los pocillos de los bordes, frecuentemente producen reacciones no específicas y por ello es recomendable no utilizarlos, llenándolos con solución buffer de extracción. (Jayasinghe y Salazar, 1993).

## **2.6. Objetivos generales y objetivos particulares.**

Habiéndose considerado que el proceso de producción de tubérculo semilla de papa de alta calidad fitosanitaria involucra las etapas de laboratorio, invernadero y campo, en el presente estudio se estableció como objetivo general el proponer, evaluar e integrar algunas tecnologías en cada una de las fases mencionadas, para lo cual se establecieron seis objetivos particulares, tres para la fase de laboratorio, dos para la fase de invernadero y uno para la fase de campo, estos fueron los siguientes:

### **Fase de laboratorio.**

1. Determinar si las tapas transparentes de los recipientes de los recipientes mejoraban la calidad de la planta de papa *in vitro*.
- 2 Determinar si hay mejora en la calidad de la planta *in vitro*, si la contaminación exógena del explante y las siembras de papa *in vitro* se reduce con explantes de brotes tratados químicamente.
- 3 Determinar si el material experimental utilizado mantuvo su fitosanidad.

### **Fase de invernadero.**

- 4 Definir si era posible utilizar plantas *in vitro* envejecidas en la producción de minitubérculo
- 5 Establecer la mejor densidad de plantas por bolsas para lograr el máximo rendimiento de minitubérculo a partir de microtubérculo brotado.

### **Fase de campo.**

- 6 ¿Definir como el rendimiento de tubérculo semilla Básica de papa es afectado por el tamaño del minitubérculo sembrado en campo?

**Cuadro 7 Objetivos particulares por experimento para alcanzar el objetivo general de integración de tecnología en las fases de laboratorio, invernadero y campo. FAUANL-HBR.1996-1999.**

<b>Fase</b>	<b>Fecha</b>	<b>Experimento y titulo</b>	<b>Objetivo particular</b>
Laboratorio	27/VIII/97	Experimento 1 Efecto de diferentes tipos de tapas en el crecimiento de papa <i>in vitro</i>	Determinar si las tapas transparentes mejoraban la calidad de la planta de papa <i>in vitro</i>
	20/IX/97	Experimento 2. Efecto del tratamiento químico en rodajas brotadas de papa y sembradas <i>in vitro</i>	Determinar si hay mejora en la calidad de la planta <i>in vitro</i> , si la contaminación exógena del explante y las siembras de papa <i>in vitro</i> se reduce con explantes de brotes tratados químicamente.
	15/VIII/99	Experimento 3. Diagnóstico mediante la técnica serológica ELISA del material utilizado en los experimentos	Determinar si el material experimental utilizado mantuvo su fitosanidad.
Invernadero	26/IX/96	Experimento 4. Producción de minitubérculos a partir de planta <i>in vitro</i> envejecida	Definir si era posible utilizar plantas <i>in vitro</i> envejecidas en la producción de minitubérculo
	26/XI/96	Experimento 5. Efecto de densidades en la producción de minitubérculo a partir de microtubérculo brotado.	Establecer la mejor densidad de plantas por bolsas para lograr el máximo rendimiento de minitubérculo a partir de microtubérculo brotado.
Campo	6/VI/97	Experimento 6. Efecto del tamaño del minitubérculo de papa en el rendimiento de tubérculo semilla Básica.	Definir como el rendimiento de tubérculo semilla Básica de papa es afectado por el tamaño del minitubérculo sembrado en campo.

### **III. Materiales y Métodos**

Para cada uno de los seis objetivos particulares se tuvieron experimentos específicos, en estos experimentos se indicó la fase correspondiente, la fecha de establecimiento un número, título y objetivo particular asociado se presenta en el Cuadro 7.

#### **3.1. Fase de laboratorio**

##### **3.1.1. Experimento 1: Efecto de diferentes tipos de tapas en el crecimiento de papa *in vitro*.**

El experimento se realizó en las instalaciones de la empresa High Breeding (HBR), y en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL.), con el objetivo particular de definir si la calidad de la planta *in vitro* podría mejorarse mediante el uso de tapas de plástico transparente.

###### **3.1.1.1. Material genético:**

Se utilizaron plantas sanas *in vitro* de las variedades Gigant, Atlantic y el Clon 5175, las cuales fueron obtenidas del banco de germoplasma del convenio HBR - FAUANL, el cual se ha venido integrando como resultado de las actividades en el Proyecto SIREYES 95/034. La fase de incubación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la FAUANL. Las instituciones mencionadas se encuentran localizadas en el municipio de Marín, N. L.

### **3.1.1.2. Metodología:**

Se definieron cuatro tratamientos:

Tapa 1= tapa de polietileno translúcido de alta densidad; Tapa 2= tapa de plástico sólido de color verde, marca Sigma; Tapa 3= tapa de plástico sólido semitranslúcido marca Sigma y

Tapa 4= tapa de plástico transparente flexible marca Clean Pack (no esterilizable en autoclave).

Las tapas 1 y 4, fueron seleccionadas bajo la consideración de que por ser translúcidas, permitirían lograr las condiciones *in vitro* más favorables para el crecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro*, en tanto que las tapas 2 y 3, son las tapas comúnmente encontradas en el mercado para los tubos de ensaye utilizados en el cultivo *in vitro*, de tejidos vegetales.

El medio utilizado fue el de Murashige y Skoog (1962) modificado según el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central de las Villas, Cuba.

Se procedió a la siembra *in vitro*, para lo cual los explantes fueron tomados de las plantas *in vitro* ya existentes y se cortaron microestacas de 2 cm, identificándolos según su posición en la planta en: microestacas apicales, medias y basales, se sembró una microestaca por tubo de ensaye insertándola en el medio de cultivo por la parte basal del corte, así hasta completar nueve tubos por cada tipo de tapa y para cada una de las tres variedades, haciendo un total de 27 tubos sembrados.

### **3.1.1.3. Variables Evaluadas:**

A los quince días después de la siembra, se midieron las siguientes variables: longitud en centímetros, número de entrenudos, número de brotes laterales y el vigor de la planta *in vitro* medido en una escala arbitraria de 4 (excelente), 3 (bueno) 2 (regular) y 1 (pobre).

### **3.1.1.4. Análisis estadístico**

Los datos de las tres primeras variables se analizaron bajo un arreglo de tratamientos factorial 3X4X3, respectivamente para las tres variedades, para los cuatro tipos de tapas. y para los tres tipos de explantes. El análisis estadístico fué bajo un diseño experimental completamente al azar; en las variables donde se detectaran diferencias significativas, se procedió a la comparación de medias por la prueba de la diferencia mínima significativa (DMS) protegida de Fisher (Steel y Torrie 1980). Para la variable vigor, el análisis se efectuó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los análisis estadísticos se efectuaron mediante el paquete de cómputo FAUANL de diseños experimentales (Olivares, 1993).

## **3.1.2. Experimento 2:**

### **3.1.2.1. Efecto del tratamiento químico (fungicida - bactericida) en rodajas de papa sobre la contaminación y el vigor de la planta *in vitro*.**

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de la empresa High Breeding (HBR) en Marín N. L., en asociación con la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL), después del entrenamiento recibido del Dr.

Ricardo Hernández Pérez del Instituto de Biotecnología de las Plantas - Universidad Central de las Villas (IBP-UCLV), como actividad del proyecto SIREYES/95/034, con el objetivo particular de establecer si el tratamiento químico de brotes en crecimiento a utilizar como explantes, podría reducir la contaminación en el establecimiento de plantas *in vitro* de calidad.

### 3.1.2.2. Material genético:

El material genético utilizado fueron tubérculos brotados de la variedad Alfa de papa seleccionados de una cosecha comercial por una aparente sanidad.

### 3.1.2.3. Metodología.

El procedimiento de siembra consistió en lavar y desinfectar tubérculos de papa, para luego cortar rodajas con brotes y colocarlas invertidas sobre arena estéril, se efectuaron riegos con agua bidestilada y soluciones de agroquímicos. Para la siembra *in vitro* se utilizaron los ápices de los brotes de las rodajas como explantes. Se compararon en cuanto a sanidad las siembras tradicionales *in vitro* respecto a la siembra con explantes tomados de los ápices de los tubérculos brotados, de rodajas las cuales se lavaron y desinfectaron previo a la siembra.

Considerando el procedimiento general descrito, se definieron tres tratamientos T1, T2 y T3, los cuales se describen a continuación :

T1= corte del ápice del brote tomándolo directamente del tubérculo y siembra de acuerdo al procedimiento tradicional, esto es, desinfectando los brotes con hipoclorito de sodio comercial (NaOCl) al 15% (v/v) durante 15 minutos, enjuagando con agua estéril y cortando explantes de 5 mm para posteriormente proceder a su siembra *in vitro*, todo esto en el área de siembra aséptica en una campana de flujo laminar.



T2= consistió en la excisión de rodajas de tubérculos con un brote cada una y siembra invertida de las rodajas sobre arena estéril en contenedores asépticos; las rodajas, previamente a su siembra en la arena estéril, se lavaron y desinfectaron de acuerdo al procedimiento tradicional (15% de NaClO v/v por 15 minutos), y una vez sembradas con el brote hacia abajo, se mantuvieron bajo alta humedad, mediante el riego con agua bidestilada; cuando los brotes emergieron y tenían una altura de 5 cm, se procedió al corte del ápice en una longitud de 20 mm, para utilizarlo como explante y siembra *in vitro*, previo lavado y desinfectado por el método tradicional. Bajo este método de siembra en arena estéril se consideró que la movilización de los fitopatógenos al ápice que se utilizó como explante fuera baja y por lo tanto permitiría utilizar el ápice considerándolo libre de fitopatógenos endógenos y evitar con ello la contaminación *in vitro* por estos fitopatógenos.

T3= fue similar al T2 pero el riego de las rodajas sembradas en arena estéril se realizó con una solución que contenía un fungicida y un bactericida sistémicos, Ridomil Bravo 81 PH (metalaxil) y Agrimicin (oxitetraciclina + oxiclóruo de cobre a razón de 1.0 y 1.5 g l<sup>-1</sup>), respectivamente; esto con el fin de reducir la presencia de fitopatógenos endógenos y obtener ápices libres de los mismos. Bajo este método adicionalmente, se esperó que la movilización de fitopatógenos al ápice no ocurriera o se redujera debido a la mayor tasa de división celular del tejido vegetal y menor tasa de multiplicación de los posibles fitopatógenos endógenos por efecto de los productos químicos.

Tanto los brotes como los ápices en los tratamientos una vez desinfectados se cortaron para obtener un explante de 5 mm y proceder a su siembra *in vitro*.

#### **3.1.2.4. Variables a medir**

- 1) Contaminación en el medio después de 30 días. Se clasificarán en: ausencia (1) y presencia (2)
- 2) Longitud de la planta *in vitro* en cm.
- 3) Numero de entrenudos
- 4) Vigor de la planta *in vitro* medida en la escala: 4 (excelente), 3 (bueno), 2 (regular) y 1 (pobre)
- 5) Número de brotes laterales
- 6) Formación de raíces se clasificarán en: ausencia (0) y presencia(1).

#### **3.1.2.5. Análisis estadístico.**

La variable de contaminación en el medio después de 30 días y la formación de raíces fue analizada mediante una tabla de contingencia. Se utilizó un análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar para las variables longitud de la vitroplanta, número de entrenudos y número de brotes laterales. Para la variable vigor de la planta *in vitro* se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis de estadística no paramétrica; los análisis se efectuaron con el paquete de cómputo Diseños experimentales FAUANL (Olivares 1993).

### **3.1.3 Experimento 3.**

#### **3.1.3.1. Determinación de la sanidad de las plantas *in vitro* y minitubérculos de papa por medio de la técnica serológica ELISA.**

Con el objetivo particular de determinar si la planta *in vitro* y el minitubérculo utilizados conservaron la sanidad fitosanitaria, el presente experimento de diagnóstico se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico

Fitosanitario de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### 3.1.3.2. Material vegetal

Para realizar la prueba se utilizaron muestras compuestas de tejido de brote de cinco minitubérculos y de muestras de hoja de tallo de 5 o 6 plantas *in vitro* de papa de cada variedad, se utilizaron cuatro variedades: Atlantic, Herta, Carola y Snowden para los virus que se analizaron.

Se utilizaron cinco muestras compuestas cada una con 5 submuestras de tejido de brote de minitubérculo o de tallo y hoja de planta *in vitro* según el caso.

Se analizó la presencia de seis virus de la papa: PVA (virus A de la papa), PVM (virus M de la papa), PVS (virus S de la papa), PVX (virus X de la papa), PVY (virus Y de la papa) y PLRV (Virus del Enrollamiento de la hoja de la papa)

### 3.1.3.3. Metodología: Protocolo para los análisis por ELISA

#### 3.1.3.3.1. Sensibilización o cubrimiento de la placa.

Los anticuerpos (gammaglobulina) específicos para cada agente fitopatógeno son adsorbidos a la superficie de cada pocillo de la placa de microtitulación. Esto se logra cubriendo los pocillos de la placa de microtitulación con el anticuerpo (gammaglobulina purificada) específico para el agente patológico que se pretende detectar. Para lograrlo, es necesario efectuar los siguientes pasos:

## **Preparar una solución amortiguadora (SOLAM) de adsorción o cubrimiento.**

La SOLAM se prepara como sigue

Disolver en 1000 ml de agua destilada:

Carbonato de sodio	1.59 g
Bicarbonato de sodio	2.93 g
Azida de sodio	0.2 g
Ajustar pH a	9.6

La SOLAM puede almacenarse por un mes, siempre y cuando se refrigere de 4-6°C.

## **Dilución del anticuerpo purificado.**

Para proceder a la dilución del anticuerpo, se debe considerar los siguientes tres aspectos:

1. La dilución del anticuerpo que maneja el fabricante; por ejemplo, la empresa Agdia diluye 1µl de anticuerpo en 200µL de buffer.
2. Que una placa de poliestireno tiene 96 pocillos.
3. Que en cada pocillo de la placa se colocarán 100µL los cuales se integran con 0.5µL del anticuerpo diluido y 95.5µL de una solución amortiguadora; por tanto, 0.5µL x 96 pocillos implican 48µL de anticuerpo por placa.

En el punto tres, se procede de acuerdo a la recomendación del fabricante o a resultados previos de titulación realizados por el usuario; en este caso Agdia proporciona el anticuerpo diluido 1:200, esto es 1µL de anticuerpo diluido en 200µL de buffer. El anticuerpo se deposita en un recipiente que contenga la SOLAM suficiente para la cantidad de muestras que se analizarán, por ejemplo si en esta prueba se utilizaran 40 pozos incluyendo los blancos y controles de una placa de 96 pozos, solo se utilizaran 20µl de los 48µl

necesarios para una placa completa del anticuerpo específico en cada virus analizado Figura 2A del Apéndice.

### **Colocación del anticuerpo más la SOLAM en cada pocillo de la placa.**

La cantidad de solución del anticuerpo más SOLAM previamente preparada para la cantidad de muestras a analizar más ocho controles, se colocan en un recipiente que permita utilizar la micropipeta multicanal (8 cargas de 100µL c/u) para el llenado de 8 pocillos de la placa en cada carga Figura 2B del Apéndice.

### **Fijación del anticuerpo en la placa (incubación).**

En una cámara húmeda se coloca la placa con el anticuerpo por 12 horas a 4 °C, ó a temperatura de laboratorio (20-30°C) durante 4 horas según las recomendaciones del proveedor y/o experiencias del laboratorio. Sin embargo, en el Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario (LADIF) de la FAUANL, se incubaba durante 12 horas, lo cual permite tener la seguridad de que el anticuerpo se adhiera a cada pocillo de la placa.

### **Lavado de la placa**

Para el lavado de la placa se utiliza una SOLAM de fosfato más Tween (SF+T) 1X (buffer de lavado) y se prepara como sigue:

#### **Preparar SOLAM de Fosfato + Tween 1X (SF + T):**

Disolver en 1000 ml de agua destilada:

Cloruro de sodio	8.0 g.
Fosfato de sodio dibásico	1.15 g.
Fosfato de potasio monobásico	0.2 g.
Cloruro de potasio	0.2 g.
Tween 20	0.5 mL
Ajustar pH a 7.4	

La SOLAM de fosfatos más Tween (SF +T) una vez preparada se puede almacenar a temperatura ambiente y usarse como máximo una semana después de su preparación o bien almacenar a 4°C y usarse como máximo tres semanas después de su preparación, cuidando que el pH no varíe.

Después de la incubación de la placa se requiere de eliminar la SOLAM de adsorción o cubrimiento y el resto de anticuerpo no fijado en cada pocillo de la placa, para lo cual se requiere vaciar el contenido de los pocillos de la placa y posteriormente con la ayuda de una pizeta que contiene SF+T, se llenan los pozos de la placa de microtitulación y se vacían de inmediato, repitiéndose el lavado en tres ocasiones (Figura 3A de Apéndice).

Finalmente, después del tercer lavado, se lleva a cabo el secado, golpeando con firmeza la placa de microtitulación con los pocillos hacia abajo sobre el papel secante hasta eliminar completamente la SF+T (Figura 3B de Apéndice).

#### **3.1.3.3.2. Captura del antígeno por el anticuerpo fijado en la placa.**

El antígeno es, en este caso, el virus de interés que se sospecha puede estar presente en el tejido vegetal de la muestra. El antígeno en la muestra, de estar presente, debe ser extraído del tejido vegetal y colocarse en los pocillos de la placa para ser capturado por el anticuerpo específico; en términos generales esto se efectúa en los cuatro pasos siguientes:

1. Preparación de una SOLAM de extracción, en la cual se pretende aislar el antígeno que se sospecha que está presente en la muestra de tejido vegetal, la cual está compuesta de 5 submuestras para este caso.

2. Agregar la SOLAM de extracción al tejido vegetal de la muestra y proceder al macerado del tejido junto con la SOLAM para que el antígeno se disuelva en ésta.
3. Se da un orden y distribución de las muestras en la placa, para lo cual se realiza un croquis, para su identificación Figura No. 1
4. Con una micropipeta sencilla o multicanal se toman 100  $\mu$ L del macerado de tejido vegetal en la SOLAM de extracción, de cada muestra compuesta y se colocan en los pocillos correspondientes para en caso de existir el antígeno en la muestra, éste sea fijado por el anticuerpo absorbido en la placa (Figura 4C del Apéndice).

En forma detallada, los pasos anteriores se describen a continuación:

**a) Preparación de la SOLAM de extracción:**

Diluir en 100 ml de SF+T:

Sulfito de sodio	1.3 g
Polivinilpirrolidona MW 24-40,000	20 g
Albúmina de huevo	2.0 g
Tween 20	20 mL
Azida de sodio	0.2 g

Ajustar a pH de 7.4

La SOLAM de extracción una vez preparada se puede almacenar a 4-6°C y usarse como máximo una semana.

**Macerar el tejido y extracción del antígeno en su caso de estar presente.**

El tejido vegetal se coloca en bolsas de plástico de aproximadamente 10X15 cm agregando SOLAM de extracción en una proporción de 1:5

(peso:volumen) macerando con el pistilo de un mortero. Cuando se utiliza un macerador eléctrico de rodillos o tipo taladro, el tejido se macera primero. Posteriormente se agrega el SOLAM de extracción en proporción 1:5 (peso:volumen). Lo anterior se ilustra en las figuras 4A y 4B del Apéndice respectivamente para brotes de tubérculo y hojas de la planta de papa.

Fijación del antígeno de la muestra por el anticuerpo previamente adherido a la placa.

Se colocan 100  $\mu$ L del macerado de tejido, se agregan a un pocillo de la placa (Figura 4C, D del Apéndice). Debe utilizarse una puntilla para cada muestra. Se recomienda no usar los pocillos cercanos a los bordes ya que pueden desarrollar reacciones no específicas

En la Figura No. 1 se ilustra la disposición de muestras, testigos y blancos que se requieren en una prueba de ELISA. Cada prueba debe incluir las muestras por duplicado, cuatro pocillos en blanco, cuatro con testigo negativo y cuatro con testigo positivo, de estos últimos, dos deben estar concentrados para que reaccionen con una intensidad tal que en 0.5 a 1 hora de incubación con el sustrato se obtenga una lectura de (densidad óptica) mayor o igual a 1.0, los otros dos testigos positivos deben diluirse para obtener en el mismo tiempo de incubación (0.5 a 1 hora) una lectura de 0.2 de densidad óptica, la dilución de este testigo será determinada por el proveedor o por el propio laboratorio en base a ensayos experimentales.



## **Incubación de la placa**

De existir el antígeno en la muestra, el mismo será capturado por el anticuerpo previamente adherido los pocillos de la placa, el conjunto de anticuerpo + antígeno en la placa debe ser incubados por 2 horas a temperatura de laboratorio (20-30°C) en cámara húmeda (Figura 4E del Apéndice) o por 12 horas a 4°C.

**Figura No. 1. Datos y distribución de las muestras con su repetición en la placa de microtitulación en un análisis de ELISA.**

Marín N. L. a de 2002

Clave de la muestra \_\_\_\_\_  
 Cultivo \_\_\_\_\_  
 Variedad \_\_\_\_\_  
 Origen \_\_\_\_\_  
 Objetivo \_\_\_\_\_

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	1	2	3	4	B	B	1	2	3	4
B	5	6	7	8	9	10	5	6	7	8	9	10
C	11	12	13	14	15	16	11	12	13	14	15	16
D	17	18	19	20	21	22	17	18	19	20	21	22
E	23	24	25	26	27	28	23	24	25	26	27	28
F	29	30	31	32	33	34	29	30	31	32	33	34
G	35	36	37	38	39	40	35	36	37	38	39	40
H	-	-	BE	+	(+)	BE	-	-	BE	BE	+	(+)

B= Blanco (Sin anticuerpo, muestra ni conjugado) con sustrato.  
 (-) = Testigo negativo planta sana )  
 += Testigo positiva diluido con D.O. de aproximado 0.15 (planta enferma)  
 (+)= Testigo positivo con D.O. de 1.0 (Planta enferma)  
 BE= Buffer de Extracción

Resultados  
y Vo Bo

Observaciones

## **Lavado de la placa.**

Como antes se explicó, en el lavado de la placa, se procede a eliminar el excedente de la muestra contenida en la placa lavándola con la SOLAM de Fosfatos más Tween (SF+T). Para lavar adecuadamente y evitar la contaminación entre muestras (pocillos), la placa se coloca en posición inclinada, se agrega SF+T, iniciando con los pocillos de la parte inferior (columna 12 letra H de la placa), continuando hacia la parte superior (columna 1 letra A) hasta llenar toda la placa (Figura 3A del Apéndice). Posteriormente se deja reposar la placa con SF+T durante 3 minutos, se vacía y este proceso se repite 3 veces, para finalmente secar la placa golpeando sobre papel secante como se describió anteriormente en la sección de lavado de la placa.

### **3.1.3.3.3. Adicionar el conjugado (anticuerpo - fosfatasa alcalina).**

Para completar la reacción de doble anticuerpo en sandwich (DAS) se adhiere el mismo anticuerpo pero ahora conjugado con la enzima fosfatasa alcalina de haber esto capturado al antígeno por el anticuerpo en la placa, ahora el antígeno capturará el anticuerpo conjugado con la fosfatasa alcalina. La adición del conjugado se realiza en los siguientes pasos.

**Preparación de la SOLAM para diluir el conjugado anticuerpo-fosfatasa alcalina de acuerdo al siguiente procedimiento:**

Diluir en 1000 ml de SF+T:

Albúmina de suero de bovino	.....	2.0 g (0.2%)
Polivinilpirrolidona (MW 24-40,000)	.....	20.0 g (2%)
Azida de sodio	.....	0.2 g
Ajustar a pH de 7.4		

La SOLAM debe almacenarse de 4 a 6 °C y usarse como máximo una semana después de su preparación.

Diluir el conjugado anticuerpo - fosfatasa alcalina en un recipiente en la proporción de SOLAM, señalada por el proveedor o de acuerdo a resultados de titulaciones realizadas por el usuario, en el caso de LADIF-FAUANL se utiliza una dilución de 1:200, esto es un 1µL del conjugado anticuerpo - fosfatasa alcalina en 200µl de SOLAM; el conjugado anticuerpo - fosfatasa alcalina se deposita en un recipiente que contenga la SOLAM suficiente para la cantidad de muestras que se analizarán, como en esta prueba se utilizaron 40 pocillos incluyendo los blancos y ocho controles de una placa de 96 pocillo solo se utilizaron 20µL de los 48µL necesarios para una placa completa de la enzima específica para cada virus analizado (Figura 5A de Apéndice).

Agregar a cada pocillo de la placa 100µL (0.1 mL) de la mezcla de SOLAM más el anticuerpo - fosfatasa alcalina diluido (Figura 5B de Apéndice).

Incubar dos horas a temperatura de laboratorio (20-30°C) en cámara húmeda. Eliminar el conjugado enzimático y lavar de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente. En este paso se elimina el conjugado anticuerpo - fosfatasa alcalina que no esté adherido a las partículas del agente patogénico. Como se describe en la secciones anteriores sobre lavado de la placa.

#### **3.1.3.3.4. Adicionar el sustrato para la reacción de la fosfatasa alcalina**

Para preparar el sustrato para la reacción de la fosfatasa alcalina se precede diluyendo el Para-Nitrofenil Fosfato (PNP) (pastilla de 5 mg) en SOLAM de sustrato en una relación de 1 mg/mL y se agrega 100µL (0.1 mL) de ésta solución de sustrato a cada pocillo de la placa incluídos los blancos (Figura 6A de Apéndice).

La solución amortiguadora SOLAM del sustrato se preparo como sigue:

Agua destilada .....800 mL

Dietanolamina .....97.0 mL

Azida de sodio .....0.2 g

Agregar agua destilada hasta completar un volumen total de 1 litro.

Ajustar pH a 9.8 con ácido clorhídrico concentrado.

Nota: Esta solución amortiguadora SOLAM debe ser preparada 15 minutos antes de cada aplicación

**Incubación de la placa en cámara húmeda a temperatura de laboratorio (20-30°C) y oscuridad por 0.5-1 h para observar la reacción.**

La intensidad del cambio de color producida por la reacción de la fosfatasa alcalina del antígeno conjugado con el PNP, es una indicación de la cantidad de antígeno en la muestra. Cuanto más intenso es el color, mayor es la concentración de antígeno. Los pocillos transparentes, en los que no hay cambio de color corresponden a las muestras de plantas en las que no está presente el antígeno, es decir plantas sanas, así como los testigos sanos y el blanco sin muestra.

Para detener la reacción, esto se hace en el momento en que se obtiene una densidad óptica media de 0.20 en el testigo positivo diluido, añadiendo 50µl de hidróxido de sodio al 3 M a los pocillos de la placa, cuando se usa fosfatasa alcalina y ácido sulfúrico 3 M para el caso de la peroxidasa.

## **Lecturas y valores esperados de densidad óptica (D.O.) en la prueba serológica ELISA:**

Para considerar aceptables la prueba de una placa ELISA, la media de las lecturas de densidad óptica del testigo negativo deben ser menores a 0.06 y del testigo positivo diluído aproximadamente 0.20.

### **Criterios para declarar como positiva o negativa una muestra.**

Según Cruz y Farías, 1997 la reacción se considerará como positiva (presencia del fitopatógeno) si la lectura de densidad óptica es mayor o igual a tres veces la media del testigo negativo. Si el testigo negativo presenta en promedio valores de densidad óptica menores de 0.03, solo se considerarán positivos aquellas con densidades ópticas mayores a 0.1 Según (Cruz y Farías 1997).

Cuando solo una de las muestras es positiva y/o si la diferencia con su repetición es mayor o igual al 50 % de su valor, la muestra debe procesarse nuevamente para determinar la presencia de fitopatógenos.

Las pruebas que resulten positivas deberán analizarse una segunda vez para su confirmación.

#### **3.1.3.3.5. Terminología utilizada en ELISA**

**Adsorción.** Propiedad de algunos antígenos y anticuerpos de adherirse entre sí ó de estos últimos a un medio sólido, en este caso la placa de microtitulación.

**Antígeno fitopatógeno.** Microorganismo capaz de causar enfermedades a los vegetales.

**Anticuerpo.** Moléculas proteicas conocidas como inmunoglobulinas, que se encuentran en el suero sanguíneo y son producidas por las células linfáticas en respuesta al estímulo de un antígeno.

**Antígeno.** Sustancia extraña, normalmente proteína que es capaz de provocar la producción de anticuerpos específicos cuando es introducido al sistema sanguíneo de un organismo de diferente especie.

**Antisuero:** Suero que contiene anticuerpos que reaccionan contra un antígeno.

**ELISA.** Acrónimo de Enzima/ Linked Immunosorbent Assay, cuya traducción al idioma español es "Prueba de Inmunoadsorción con Enzimas Ligadas".

**Inmunoglobulinas:** Anticuerpos o moléculas de alto peso molecular llamadas IgG , IgM, entre otras.

**pH.** Es el logaritmo natural de la concentración de los iones hidrógeno en cualquier solución acuosa y tiene un rango de 0-14.

**Reactivos.** Sustancias químicas usadas para la preparación de soluciones requeridas para una técnica, de análisis.

**Reacción Antígeno-Anticuerpo** - Es la reacción que ocurre al infectarse un organismo con un antígeno el cual es atacado por el anticuerpo correspondiente, producido por el sistema inmunológico del organismo infectado. La reacción es dependiente de la proporción y concentración en que están ambos elementos (Curso Saneamiento, 1996).

**Sensibilidad.-** Mínima concentración de antígeno o IgG que se puede detectar con seguridad mediante la reacción antígeno anticuerpo.

**Solución amortiguadora.** Solución capaz de impedir cambios bruscos de pH aún

cuando se le agrega un ácido o base fuerte a la solución.

**Sustrato.** Sustancia química sobre la cual actúa una enzima.

**Técnicas serológicas.** Pruebas basadas en la especificidad de la reacción antígeno anticuerpo utilizada para el diagnóstico de agentes patogénicos (Cruz y Farías, 1997)

**Testigo negativo.** Muestra vegetal libre de agentes patogénicos usada como control o referencia en las pruebas serológicas.

**Testigo positivo.** Muestra vegetal infectada por un agente patogénico que se usa como control o referencia en las pruebas serológicas.



## **3.2. Fase de Invernadero**

### **3.2.1. Experimento 4:**

#### **3.2.1.1. Producción de minitubérculos a partir de planta *in vitro* envejecida de minitubérculo de papa.**

Para determinar si la planta *in vitro* envejecida podría utilizarse para la producción, el experimento se realizó en el laboratorio e invernadero en condiciones de microtúneles en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL).

#### **3.2.1.2. Material genético.**

Se utilizó como material genético plantas envejecidas *in vitro* de papa de la variedad Alfa, siendo clasificadas en tres tipos: con hojas, con tallo grueso y tipo estropajo.

#### **3.2.1.3. Metodología**

Se procedió a lavar la raíz de las plantas *in vitro*, con agua y eliminando el remanente de medio de cultivo para evitar la propagación de hongos.

Las plantas *in vitro* fueron colocadas en una bolsa de poliestireno (20 X 30) con sustrato estéril de musgo asfángico, dejando solamente la parte apical de la planta sobre el sustrato, finalmente se les colocó una malla antiáfidos humedecida sobre la bolsa para evitar la deshidratación de las mismas, a los 20 días se pasaron a un microtúnel cubierto con tela antiáfidos para la protección de insectos transmisores de enfermedades vírales, durante el desarrollo del experimento se realizó un control estricto de plagas y enfermedades.

#### **3.2.1.4. Variables evaluadas**

Número de minitubérculos por bolsa.

Categorías de los minitubérculos (tamaños) cosechados por bolsa

#### **3.2.1.5. Análisis Estadístico**

El Diseño Experimental utilizado fué el completamente al azar, con tres tratamientos que fueron los tres tipos de plantas envejecida: con hojas, con tallo grueso y tipo estropajo. Después para obtener los datos de las variables, se procedió al análisis de varianza, considerando que de detectarse diferencias entre los tratamientos, se procedería a la Prueba de Comparación de Medias por DMS protegida de Fisher (Steel y Torrie 1981). El análisis estadístico se efectuó con el paquete de cómputo Diseños experimentales FAUANL (Olivares, 1994 ).

### **3.2.2. Experimento 5:**

#### **3.2.2.1. Evaluación de diferentes densidades de plántulas provenientes de microtubérculo en la producción de Minitubérculos de papa en la variedad Atlántic.**

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL) bajo el proyecto SIREYES 95/034.

#### **3.2. 2.2. Material genético.**

Se utilizaron microtubérculos (obtenidos *in vitro*) de papa brotados, de la variedad Atlántic, los cuales provenían del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) de Cuba.

### **3.2.2.3. Metodología.**

Se realizó la siembra de los minitubérculos brotados en charolas de propagación de unícel de 200 cavidades con musgo esfágico como sustrato y posteriormente se dio un riego a los 40 días de la siembra y cuando las plántulas alcanzaron una altura de 15 cm se procedió al trasplante a bolsas de poliestireno de 15 x 30 cm, con el mismo sustrato y fertilizante comercial de la fórmula 17-17-17 a razón de 10 g por bolsa.

Se definieron 5 tratamientos, los cuales consistieron en colocar 1, 2, 3, 4 y 5 plántulas por bolsa utilizando musgo esfágico como sustrato, finalmente se aplicó un riego pesado, posteriormente las bolsas con las plántulas fueron colocadas en un microtúnel donde permanecieron 70 días después del trasplante hasta su desecación, para luego proceder a la cosecha a los 25 días después.

### **3.2.2.4. Variables Evaluadas**

A la cosecha se procedió a determinar dos variables:

Número de minitubérculos por bolsa y calibres de minitubérculos cosechados.

### **3.2.2.5. Cosecha:**

A los 70 días después del trasplante se procedió a desecar el follaje de las plántulas con el desecante comercial Paracuat y con el fin de lograr una completa suberización, a los 25 días después se procedió a cosechar los minitubérculos de cada uno de los tratamientos.

### **3.2.2.6. Análisis estadístico.**

El diseño experimental utilizado fue el de completamente al azar con los 5

tratamientos antes descritos, cada uno con diferente número de repeticiones. Se efectuó el análisis de varianza, para las dos variables y donde se detectó diferencia entre los tratamientos se procedió a la comparación de medias por DMS (0.05) protegida de Fisher. Los análisis se efectuaron con el paquete de computo Diseños Experimentales FAUANL (Olivares, 1993).

### **3.3. Fase de Campo**

#### **3.3.1. Experimento 6:**

##### **3.3.1.1. Efecto del tamaño de minitubérculo, en el rendimiento de tubérculo semilla básica.**

Con el objetivo de encontrar el tamaño óptimo de minitubérculos a sembrar para maximizar el rendimiento de semilla básica en campo, se utilizaron siembras de minitubérculo para la producción y de tubérculo semilla básica, con de tres orígenes de minitubérculos cada uno clasificado en cinco calibres o tamaño, para ser evaluados en su rendimiento promedio en ton ha<sup>1</sup> y su composición por categorías comerciales a saber: primeras, segundas, terceras, cuartas y quintas.

##### **3.3.1.2. Material genético.**

Como material genético se utilizaron minitubérculos de la variedad Atlantic de primera y segunda generación producidos por siembras de microtubérculo a bancales y tubérculo semilla básica de papa cosechados como primer generación de campo los cuales se clasificaron en calibres 4, 3, 2, 1 y 0 para su siembra en campo, con el fin de producir tubérculo semilla básica para siembra.

### 3.3.1.3. Metodología

De octubre a diciembre de 1996, en las instalaciones de la empresa HBR en Marín, N. L. y en el campo experimental de la FAUANL en Marín N. L. se produjeron minitubérculos a partir de siembras con microtubérculo (tubérculo producido *in vitro*) importado por la citada empresa del Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central de las Villas, Cuba.

Los minitubérculos se identificaron por tres orígenes 1ª generación de bancal 2ª generación de bancal y 1ª generación de campo y se clasificaron por su diámetro en las siguientes categorías: 4 (5 a 6 cm), 3(4 a 5 cm), 2 (4 a 3 cm), 1 (2 a 3 cm), 0(1 a 2 cm) y quinta (< 2 cm); se lavaron y trataron con hipoclorito de sodio al 5% y posteriormente se protegieron con un bactericida y un fungicida comerciales. En las instalaciones de la FAUANL, se almacenaron los minitubérculos y se llevaron a brotación bajo temperatura ambiente a la sombra una vez brotados se utilizaron en las siembras antes descritas de la cual se identificaron en el campo tanto los orígenes como su calibre.

El 3 de junio de 1997 en el Campo Experimental de la Ascensión, Aramberri, N. L. de la FAUANL, para la producción de semilla básica de papa se establecieron siembras con los minitubérculos cosechados el ciclo anterior en Marín N. L. identificando en el campo los tres orígenes y los cinco calibres sembrados.

El cultivo se atendió aplicando ocho riegos con equipo de aspersion y después del segundo riego se hicieron 7 aplicaciones con fertilizante foliar e insecticidas, fungicidas y bactericidas para prevenir ataques de insectos transmisores de virus, y enfermedades producidas por hongos y bacterias.

#### 3.3.1.4. Cosecha general y experimental.

El 6 de septiembre de 1997 se procedió al desvare y la cosecha general se realizó del 29 de septiembre al 1 de octubre de 1997. La cosecha para fines experimentales de estimación del rendimiento total por categorías de minitubérculo sembrado (calibres 4,3,2,1, y 0), se tomaron cuatro muestras al azar dentro de cada una de las áreas sembradas con cada uno de los tres orígenes de minitubérculo sembrado, el tamaño de muestra fue una parcela de un surco de 3 x 0.8 m.

#### 3.3.1.5. Variables Evaluadas.

El tubérculo semilla Básica cosechado se separó en cinco categorías comerciales denominadas, de mayor a menor tamaño, como primera, segunda, tercera, cuarta y quintas; se pesaron por separado para medir el rendimiento para cada categoría y la suma de los pesos de las cinco categorías permitió estimar el rendimiento total. El rendimiento total y su composición por categorías se expresó en  $\text{ton ha}^{-1}$  y se analizó estadísticamente.

#### 3.3.1.6. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó bajo un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial, donde el factor A consistió de tres niveles siendo los tres orígenes de minitubérculo sembrado ( $a_1$ = minitubérculo de segunda generación de bancal,  $a_2$ = minitubérculo de primera generación de bancal  $a_3$ = minitubérculo de primer generación de campo) y el factor B con cinco niveles siendo los calibres de los minitubérculos sembrados ( $b_1=4$ ,  $b_2=3$ ,  $b_3=2$ ,  $b_4=1$  y  $b_5=0$ ). La combinación de los tres niveles del factor A y los cinco niveles del factor B dieron 15 tratamientos. Para tener mayor confiabilidad se consideraron dos repeticiones utilizando los dos

datos más similares de los cuatro muestreos por sitio. Cuando se detectó significancia se procedió a definir la magnitud de las diferencias mediante la prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS 0.05) protegida de Fisher, se utilizó el paquete de cómputo Diseños experimentales para análisis estadístico FAUANL (Olivares, 1993).