

REPRODUCCIÓN VEGETATIVA DE MATERIALES PARA LA SIEMBRA LIBRE DE ENFERMEDADES\*

W. M. Roca

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)  
Apartado Aéreo 67-13, Cali-Colombia

RESUMEN

El rendimiento de muchos cultivos de propagación vegetativa es afectado por problemas fitosanitarios inherentes a este modo de propagación; los patógenos sistémicos en especial continúan su desarrollo en la progenie llegando a infectar los materiales completamente. Además, las tasas de multiplicación que generalmente se obtienen son muy bajas para producir cantidades suficientes de materiales para la siembra. Es necesario que se adopten métodos mejorados de reproducción vegetativa los cuales, al mismo tiempo que aumentan las tasas de multiplicación y que minimicen la transmisión y diseminación de enfermedades, requieran el uso intensivo de mano de obra. Esto último es un requisito importante para países en desarrollo.

En este artículo se discuten metodologías usando resultados obtenidos con la Yuca (Manihot esculenta Crantz) y la papa (Solanum tuberosum L.). Se presentan resultados de limpieza clonal por medio de la termoterapia y el cultivo de meristemas in vitro. Se proponen dos métodos para la multiplicación rápida de la yuca: por medio de retoños de estacas y por medio de esquejes de una hoja, los cuales tienen el potencial de producir 36,000 y 300,000 estacas comerciales al año, respectivamente. Finalmente se presentan métodos de multiplicación in vitro para asegurar la máxima limpieza de los materiales propagativos.

INTRODUCCION

El uso de semilla<sup>1</sup> de buena calidad es esencial para la producción agrícola. La calidad de la semilla está dada por los grados de sanidad y pureza varietal. Muchas plantas tropicales y sub-tropicales de importancia económica, incluyendo a los cultivos de raíces y tallos tuberosos, árboles frutales,

1. A menos que se especifique lo contrario, el término "semilla" se refiere aquí a la parte vegetativa de la planta que se usa como material para la siembra.

\* Trabajo presentado en la Conferencia Internacional sobre Producción de Semilla Mejorada, organizada por la FAO y el SIDA en Nairobi, Kenya, Junio 1-6, 1981.

hortalizas y ornamentales, conservan su pureza varietal cuando se propagan vegetativamente por medio de estacas, esquejes, cor- mos, etc. ya que por lo general la segregación genética de es- tas plantas es muy alta cuando se propagan sexualmente. Sin embargo, la propagación vegetativa acarrea problemas en el con- trol de la sanidad de los materiales para la siembra los cuales no existen o son de menor importancia en los cultivos que se propagan sexualmente. Con frecuencia, los materiales de repro- ducción vegetativa constituyen un medio de transmisión y dise- minación de plagas y enfermedades, especialmente de aquellas que son causadas por organismos sistémicos.

La provisión de semilla nueva limpia es necesaria cuando una variedad ha sido cultivada durante muchas generaciones u- sando el mismo material propagativo. Los patógenos que ya exis- ten en el material de propagación continúan su desarrollo en la progenie; por otra parte, los daños o heridas en la superficie de los materiales constituyen entradas para la infección.

Uno de los mayores problemas de la producción de alimentos en los trópicos es la disponibilidad de semilla en cantidades suficientes, en el lugar y momento adecuado. Muchos países tropicales importan la semilla de países templados lo cual im- pone una fuerte carga de divisas extranjeras. La semilla impor- tada puede ser multiplicada una sola vez en el país siempre y cuando se tomen precauciones para mantener niveles adecuados de calidad, especialmente en lo referente a su limpieza de en- fermedades.

Es necesario desarrollar programas para la propagación ve- getativa que permitan minimizar la incidencia de plagas y en- fermedades en los materiales para la siembra que se suministran a los agricultores. El uso de materiales sanos no sólo ofrece ventajas en el aumento de los rendimientos sino que también fa- cilitaría la conservación y el intercambio de germoplasma en forma vegetativa, reduciendo los peligros de diseminación de plagas y enfermedades.

La reproducción vegetativa de materiales para la siembra libre de enfermedades debe iniciarse con la selección de la va- riedad, o más específicamente, del clon. El clon seleccionado consiste por lo general de una sola planta que reúne los atri- butos agronómicos deseables o de algunas unidades propagativas, las cuales deben encontrarse tan libres (estacas, tubérculos, etc.) de enfermedades como sea posible. Si el material ini- cial se encuentra infectado, debe ser sometido a procesos de limpieza clonal. Seguidamente, este material es multiplicado en etapas sucesivas hasta llegar a cantidades suficientes para la siembra. Por lo tanto, el programa completo puede ser di- vidido en las siguientes etapas: a. producción del material libre de enfermedades mediante la aplicación de métodos para la limpieza clonal; b. propagación del material limpio.

minimizando las probabilidades de re-infección. El producto de esta etapa constituye la semilla básica o de fundación;  
c. Multiplicación de la semilla básica para producir cantidades suficientes de material para la siembra. Las probabilidades de re-infección son mayores en esta etapa que en la etapa (b); por este motivo es necesario que se establezca un flujo continuo de materiales limpios producidos en la etapa (b) para ser multiplicados en la etapa (c). Como se apreciará más adelante, un programa de esta naturaleza utiliza en todas sus etapas mano de obra intensiva.

La organización y el funcionamiento de estos programas demanda gastos que la mayoría de los agricultores de los países en desarrollo no podrían afrontar, a menos que se centralice como un servicio asociativo para uno o más cultivos en una región del país. De lo contrario, sería apropiado que el programa se establezca en instituciones estatales o privadas. La organización y funcionamiento de estas empresas no es el objetivo principal de este artículo; un excelente tratado al respecto ha sido recientemente compilado y editado por Douglas (1980).

#### PRODUCCION DE MATERIALES LIBRES DE ENFERMEDADES

Las enfermedades causadas por hongos y bacterias por lo general pueden ser detectadas visualmente en el material para la siembra o en las plantas derivadas. En otros casos los síntomas de la infección son menos obvios, dificultándose su detección y diagnóstico, tal como ocurre en las infecciones causadas por virus. Como consecuencia, numerosas variedades locales han resultado infectadas con uno o más virus, lo que ha producido reducciones graduales en los rendimientos. De acuerdo a una publicación del Departamento de Agricultura de Canadá (1974), la deterioración gradual de la papa se manifiesta en la disminución del número, vigor y tamaño de los tubérculos, los cuales son rechazados como semilla. Se ha demostrado que dicha deterioración se debe a enfermedades causadas por los virus llamados "latentes", lo cual obliga a que la mayoría de los agricultores cambien su semilla con frecuencia. Sing, et al (1971) encontraron un promedio de 3.8% de plantas infectadas con el virus del tubérculo ahusado en tres variedades de papa canadienses y pérdidas en el rendimiento de 17-24% y de 64% cuando los materiales fueron infectados con razas suaves y severas del virus, respectivamente. Se han señalado además disminuciones en el rendimiento de 20-40% y de 50-95% en cultivos de papa afectados por razas suaves del virus X y por el virus del enrollamiento de la hoja, respectivamente. El sinergismo del virus X y del virus Y de la papa produce el llamado mosaico rugoso ocasionando reducciones significativas del rendimiento. Shepard y Claflin (1975) hacen referencia a aumentos del 14 al 37% en los rendimientos cuando se utilizó semilla libre de los

virus "latentes" X y S de la papa. Otros (Lozano, et al, 1977) atribuyen el buen vigor de las estacas y la uniformidad en el brotamiento y en los rendimientos de la yuca, entre otros factores, al uso de estacas sanas para la siembra.

Las enfermedades causadas por virus presentan la mayor dificultad para su erradicación de los materiales de siembra. La multiplicación de los virus depende estrictamente del metabolismo celular del hospedero; por lo tanto, a diferencia de los hongos y las bacterias, los virus no pueden ser eliminados por medio de la aplicación de pesticidas a las plantas infectadas.

Los métodos más utilizados para la erradicación de los virus son los siguientes: a. escape natural de la infección; b. quimoterapia; c. termoterapia y, d. cultivo in vitro de meristemas.

#### Escape Natural de la Infección

La distribución desuniforme de virus en la planta podría resultar en que algunos tejidos de crecimiento rápido escapen de la invasión por el virus. En un campo infectado pueden encontrarse algunas plantas sin síntomas de la virosis; estas plantas deben aislarse y someterse a pruebas de detección para virus. La dificultad que se encuentra en el uso de este método es que el desarrollo de los síntomas causados por la virosis es influenciado por el virus, la variedad y el clima. Sin embargo, esta técnica es utilizada con frecuencia para la selección de semilla de papa en los programas de producción de semilla de varios países.

#### Quimoterapia

De acuerdo a Quak (1977), la mayoría de las sustancias quimoterapéuticas investigadas han resultado fitotóxicas y las plantas revierten al estado original de la infección cuando cesa el tratamiento. Sin embargo, de acuerdo a Hollings (1965) dichas sustancias podrían ser usadas para aumentar la efectividad del cultivo de meristemas en la erradicación de virus. Entre los compuestos quimoterapéuticos más estudiados se encuentran los análogos de purinas y pirimidinas, los inhibidores metabólicos y algunos reguladores de crecimiento. Lerch (1977) reportó que la aplicación de la sustancia llamada "virasol", un compuesto de acción antivírica amplia, a plantas de papa resultó en la disminución de la síntesis del virus X, y Shepard (1977) corroboró estos resultados al obtener plantas de tabaco (Nicotiana tabacum, L.) libres de virus X de la papa a partir de cultivos de tejidos tratados con virasol. A pesar de estos y otros resultados prometedores, la quimoterapia todavía no es utilizada en la práctica.

## Termoterapia

Desde que se le empezó a utilizar para "curar" materiales de caña de azúcar (Saccharum officinarum L.) con virosis, la termoterapia se ha convertido en una de las técnicas más exitosas para producir materiales relativamente limpios para la siembra.

El método consiste en tratar la planta o partes de la planta infectada con temperaturas elevadas en forma de agua o aire caliente; los tratamientos con agua caliente son por lo general de corta duración (alrededor de 30 minutos) pero cuando se usa aire caliente, el tratamiento del material puede durar de 2 semanas hasta varios meses. De acuerdo a Baker (1962) la duración y la intensidad de la termoterapia dependerán finalmente no sólo del virus sino también del tamaño, estado fisiológico y contenido de agua del material vegetal. Los materiales de tamaño pequeño y con bajo contenido de agua, así como las yemas en estado de dormancia, pueden ser tratados con temperaturas más altas y por períodos cortos. El virus del enrollamiento de la hoja de papa es eliminado al tratar los tubérculos en dormancia con aire a 36°C-37°C durante 20-30 días, pero su erradicación es más difícil cuando se tratan las plantas infectadas; además Kaiser (1980) ha demostrado que la termoterapia de tubérculos con aire caliente es mucho más efectiva que con agua caliente para la erradicación del virus mencionado y sin embargo, ninguna fué efectiva para la eliminación del virus Y de la papa.

Los síntomas del mosaico de la yuca no se desarrollan en las hojas que han crecido a 35°C pero dichos síntomas re-aparecen a 20-22°C; parece que la termoterapia sólo previene la invasión de las hojas nuevas por el patógeno. Tratamientos con temperaturas más altas y durante períodos más largos deben ser más efectivos, pero a la vez pueden resultar perjudiciales para el material vegetal. Por lo tanto, la erradicación de virus por medio de la termoterapia parece ser un proceso cuantitativo. De acuerdo a Walkey (1976), a temperatura alta los procesos degradativos exceden a la síntesis de virus, reduciéndose la concentración y el movimiento de los virus en la planta.

Debido a su simple manejo, la termoterapia tiene gran utilidad práctica en la producción de materiales relativamente limpios de patógenos para ser sembrados inmediatamente. Sin embargo, diferentes razas de un mismo virus varían en su tolerancia al calor y muchos virus de importancia económica no han podido ser totalmente eliminados mediante el tratamiento con calor de los materiales vegetativos, sobre todo cuando dichos tratamientos fueron de duración corta y a temperaturas de 35° hasta 40°C. Tratamientos con temperaturas muy elevadas resultan perjudiciales para la viabilidad del material vegetativo.

Por estos motivos, la termoterapia puede ser mejor utilizada para aumentar la efectividad del cultivo de meristemas.

### Cultivo de Meristemas

Desde que se demostró que la distribución de los virus en los tejidos de una planta infectada no es uniforme y que su concentración decrece progresivamente hacia el meristema apical del tallo, se han realizado numerosos trabajos para la erradicación de enfermedades causadas por virus por medio del cultivo in vitro de meristemas.

La técnica de cultivo de meristemas consiste en aislar asépticamente la región meristemática de la yema vegetativa apical o axilar, juntamente con 1-2 de los primordios foliares más jóvenes, y "sembrarla" en un medio de cultivo. El medio de cultivo debe proporcionar al tejido las sustancias químicas y los regímenes de luz, temperatura y humedad apropiados para la diferenciación de tallos, hojas y raíces. Los meristemas pueden obtenerse de las yemas de los materiales de propagación vegetativa tales como estacas, tubérculos, cormos, rizomas, etc. El trabajo de aislamiento y explantación de los meristemas debe realizarse en un ambiente limpio para evitar la contaminación microbiana de los cultivos.

El crecimiento de plantas a partir de meristemas cultivados in vitro depende en gran medida de la interacción entre la variedad y la composición del medio de cultivo. Trabajos realizados en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (1980) con un rango amplio de variedades de yuca han demostrado que hasta el 90% de las variedades formaron tallos y el 10% restante formaron tallos y raíces en un medio compuesto por las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (MS) (1962) y complementado con 2% de sucrosa, 0.05 mg/l de 6-benzylaminopurina (BAP), 0.05 mg/l de ácido giberélico (AG) y 0.02 mg/l de ácido naftaleno acético (ANA). Los tallos, una vez iniciados, se cortaron y "plantaron" en un medio de enraizamiento compuesto por las sales inorgánicas de MS y complementado con 2% de sucrosa y 0.01 mg/l de ANA; el 98% de las variedades formaron raíces y crecieron rápidamente.

La erradicación de patógenos por medio del cultivo de meristemas depende en gran medida del tamaño del tejido que se explanta; sin embargo, los tejidos muy pequeños (0.1 - 0.2 mm) crecen muy lentamente, disminuyéndose la eficiencia del proceso de limpieza. Como ya se ha discutido, los tratamientos de termoterapia de corta duración y de temperaturas moderadas, inactivan pero no erradican los virus<sup>2</sup>, pero cuando se utiliza

2. De acuerdo a Cooper y Walkey (1978), el término "erradicación" (igual a "eliminación") se refiere a la pérdida completa de los virus de los tejidos de la planta, y el término "inactivación" describe una falta temporal de detección de los virus.

en combinación con el cultivo de meristemas aumenta la eficiencia de la erradicación. La infectividad del virus X de la papa no sólo disminuyó al tratar las plantas infectadas con 35 - 37°C durante 4 semanas, sino que la termoterapia contribuyó a aumentar significativamente el porcentaje de erradicación del virus por medio del cultivo de meristemas (Cuadro 1).

Desde el punto de vista práctico, la termoterapia permite aumentar el tamaño del tejido que se corta para el cultivo in vitro lográndose así el crecimiento rápido de plantas libres de virus. En trabajos de erradicación de virus por medio del cultivo de meristemas de 47 variedades de papa se obtuvo un promedio de erradicación de 78%. Las plantas infectadas con uno y dos virus simultáneamente fueron expuestas a 35-37°C antes del corte de los meristemas (Cuadro 2).

En forma similar, los resultados de trabajos realizados en el CIAT (1980) para la erradicación de la enfermedad que afecta a la yuca llamada "cuero de sapo" demuestran que el porcentaje de erradicación de la enfermedad dependió no sólo del tratamiento previo con calor de las estacas infectadas sino del tamaño del meristema que se cultivó, lo cual se comprobó propagando vegetativamente las plantas derivadas de los cultivos de meristemas durante varios ciclos. Cuando se cultivaron ápices meristemáticos muy grandes, aún después del tratamiento con calor, los síntomas de la enfermedad reaparecieron en las plantas (Cuadro 3); por lo tanto la termoterapia y el cultivo de meristemas pequeños son dos pasos críticos para la producción de materiales limpios de la enfermedad.

#### Detección de Enfermedades

Aquí solo se tratará brevemente sobre los métodos más conocidos para la detección de enfermedades en los materiales de siembra y en las plantas derivadas; sin embargo, no está de más enfatizar en que la sensibilidad y seguridad de los métodos de detección van a determinar el mayor o menor grado de sanidad de los materiales de siembra. La colaboración de institutos y universidades en el desarrollo y aplicación de las técnicas de detección de patógenos es necesaria, ya que en la mayoría de los casos, el productor de semilla no podrá realizar este trabajo.

La mayoría de las enfermedades causadas por virus, con excepción de los virus "latentes", por hongos y por bacterias son diagnosticados sobre la base de síntomas visibles en el campo; Shepard y Claflin (1975) consideran que con dos a tres inspecciones en el campo se pueden eliminar las plantas infectadas. La identificación de las enfermedades requiere de personal con experiencia de campo. La detección y diagnosis de las enfermedades es facilitada por el uso de manuales descriptivos tales como los que han sido producidos por Lozano et al (1976) para la yuca en el CIAT y por el Centro Internacional de

CUADRO 1

Efecto de la termoterapia en la infectividad y en la erradicación de virus por cultivo de meristemas

Diluciones del jugo de hojas	Infectividad relativa <sup>1</sup> del virus X en plantas de papa mantenidas en dos regímenes de temperatura <sup>2</sup>			
	Clon 800244		Clon 720057	
	35° - 37°C	22°C	35° - 37°C	22°C
1/10	+	+++	+	+++
1/100	-	++	+	+++
1/1000	-	++	-	++
1/10,000	-	+	-	+
<sup>%</sup> erradicación	90	5	40	2

1. Número de lesiones locales por 1/2 hoja de G. globosa.

2. Duración de tratamiento: 4 semanas

(Trabajo realizado en el CIP, Lima-Perú, 1977)

CUADRO 2

Resumen de los resultados de la erradicación de virus por medio de la termoterapia y el cultivo de meristemas en papa

<u>Especies</u>	No. de variedades y % de erradicación (en paréntesis)				<u>Totales<sup>1</sup></u>
	<u>PVX</u>	<u>PVS</u>	<u>PVX+ PVS</u>	<u>PVX+ PVY</u>	
1. adg.	6(50)	2(60)	1(50)	3(90)	12(65)
2. tbr.	11(66)	2(62)	5(64)	5(55)	23(72)
3. juz.	2(100)	-	-	-	2(100)
4. tbr.x adg.	3(61)	-	2(90)	1(35)	6(62)
5. tbr.x phu.	2(90)	-	2(95)	-	4(92)
Totales <sup>2</sup>	24(73)	4(61)	10(75)	9(60)	

1. Promedio de erradicación = 78% para un total de 47 variedades de las 5 especies.

2. Promedio de erradicación = 67% para un total de 47 variedades con dos infecciones por un solo virus y otras dos infecciones por dos virus.

(Trabajo realizado en el CIP, Lima, Perú, 1978).

CUADRO 3

Erradicación de la enfermedad "cuero de sapo" por termoterapia y cultivo de meristemas en yuca

Variedad	Tratamiento de estacas <sup>2</sup>	Tamaño del meristema	% plantas libres de síntomas <sup>1</sup>		
			1 <sup>er</sup> ciclo	2 <sup>o</sup> ciclo	3 <sup>er</sup> ciclo
M. Col 33	Ninguno	Pequeño	92	85	-
		Grande	35	6	-
	Termoterapia	Pequeño	96	100	100
		Grande	60	15	-
M. Col 2	Ninguno	Pequeño	100	95	-
		Grande	86	22	-
	Termoterapia	Pequeño	100	100	100
		Grande	79	20	-
Quilcacé	Termoterapia	Pequeño	90	100	100
M. Col 329	Termoterapia	Pequeño	98	100	100
M. CR 3	Termoterapia	Pequeño	95	100	100
M. Col 33 <sup>3</sup>	NO	NO	0	0	-

1. Las plantas del 1<sup>er</sup> ciclo se derivan directamente de cultivos de meristemas de plantas infectadas; las del 2<sup>o</sup> ciclo se derivan de estacas de plantas sin síntomas del 1<sup>er</sup> ciclo; y así sucesivamente. Cada ciclo duró 4-5 meses en el campo.
2. Termoterapia de estacas a 40°C (día) y 35°C (noche) por 3 semanas.
3. Plantas derivadas de estacas sin termoterapia ni cultivo de meristemas.

la papa (CIP) (1977) para la papa. El problema es que, dependiendo de los patógenos, la variedad y el clima, la expresión de los síntomas puede variar. Las limitaciones de la detección visual son mayores en el caso de las enfermedades causadas por virus.

Las enfermedades causadas por virus son posiblemente las que presentan mayor dificultad para su detección. Las técnicas más conocidas se basan en la transmisión del patógeno de los materiales problema a plantas hospederas. La transmisión se puede realizar por medio de la inoculación mecánica del jugo celular, por medio de áfidos transmisores o por medio de injertos. La planta hospedera debe permitir la infección y posterior multiplicación del virus; la sintomatología puede ser sistémica y/o localizada. Técnicas más refinadas que las plantas hospederas, se basan en la reacción serológica antígeno-anticuerpo y ofrecen gran especificidad y rapidez en la prueba. El desarrollo de estas técnicas requiere de estudios virológicos para el aislamiento y purificación del virus así como para la preparación de los antisueros. Estas técnicas han alcanzado mayor desarrollo en cultivos como la papa lo cual ha permitido producir plantas libres de virus<sup>3</sup> de un gran número de variedades. Por otra parte, los trabajos en la virología de cultivos como la yuca han sido iniciados recientemente, especialmente en el estudio del mosaico africano de la yuca. Una alternativa en el caso de no existir técnicas sensitivas de detección de virus, podría consistir en exponer las plantas a condiciones controladas que estimulen el desarrollo de los síntomas de la enfermedad durante varios ciclos de propagación vegetativa o injertando yemas o esquejes de las plantas cuya limpieza se desea probar sobre patrones sensibles a desarrollar síntomas localizados o sistémicos de la enfermedad; si los síntomas no se desarrollan, los materiales se encontrarían probablemente libres de los patógenos.

#### MULTIPLICACION DE MATERIALES LIBRES DE ENFERMEDADES

Por lo general, el material inicial para la propagación está constituido por una o muy pocas plantas o partes de plantas que se encuentran libres de enfermedades. El objetivo es multiplicar dichos materiales tan rápido como sea posible, y bajo condiciones que minimizen la infección por patógenos que se transmiten por insectos o por el suelo. Una vez que se ha acumulado suficiente cantidad de propágulos, éstos pueden ser transplantados al campo para la producción de los materiales

---

3. El término "libre de virus" se debe usar siempre y cuando se especifique los virus que han sido eliminados y las pruebas de detección utilizadas.

de siembra para uso comercial. Por lo tanto, la primera etapa requiere cierta protección mínima que se puede proveer en casas de malla a prueba de insectos y utilizando suelos, o mejor substratos inertes, esterilizados; ambas etapas de multiplicación demandan el uso de labor humana intensa.

A continuación se presentan algunos métodos de multiplicación rápida para la yuca y la papa como ejemplos de producción de materiales para la siembra.

#### Métodos para la Propagación de la Yuca

Por el método tradicional, una planta de yuca puede producir 10-30 estacas de tamaño comercial al año; esta multiplicación es muy lenta para satisfacer la necesidad de materiales de siembra.

Propagación por medio de retoños. Esta técnica, desarrollada en el CIAT por Cock, *et al* (1976) puede producir aproximadamente 36,000 estacas comerciales al año, partiendo de una planta madre.

Método - La propagación por medio de retoños consiste de los siguientes pasos principales:

1. Cortar estacas de dos nudos de una planta, de por lo menos 8 meses de edad, y desinfestarlas.
2. Sembrar las estacas en forma horizontal en un substrato compuesto de arena y suelo colocado sobre grava para proporcionar buen drenaje. El substrato puede estar contenido en camas de 2.40 x 1.20 m las cuales deben llevar una cubierta de plástico transparente, a manera de techo en dos aguas, para mantener la humedad relativa alta en la cámara de propagación.
3. A las tres semanas, las estacas han dado origen a retoños que se cortan cuando alcanzan 8-10 cm de altura. Para el corte, usar cuchillas de afeitar desinfestadas en una solución de hipoclorito de sodio al 1%. Cada estaca de dos nudos puede proporcionar 8 retoños en un período de 4 meses desde la siembra de las estacas. La frecuencia del corte de los retoños depende en gran medida del vigor de las estacas y de la variedad.
4. Inmediatamente después del corte, transferir los retoños a frascos o vasos que contienen agua hervida fría donde ocurrirá el enraizamiento; se pueden enraizar un gran número de retoños en cada frasco. Los retoños deben colocarse en lugares protegidos de la lluvia y del exceso de calor.

5. Después de 2-3 semanas los retoños han enraizado y están listos para el transplante a potes y de aquí al campo. Al cabo de un año, cada planta proveniente de un retoño puede proporcionar 20-30 estacas de tamaño comercial para la siembra.

Propagación por medio de esquejes de una hoja. Esta técnica desarrollada por Pateña, et al (1979) en Filipinas, utiliza esquejes constituidos por una hoja (lámina y peciolo) acompañada por la yema axilar. El método, que ha sido probado por Roca, et al (1980), ofrece el potencial de producir 300,000 estacas comerciales al año, partiendo de una planta madre de 4-5 meses de edad.

Método - La propagación por medio de esquejes de una hoja consiste en los siguientes pasos principales:

1. Cada esqueje se obtiene al cortar la hoja a la altura de la inserción del peciolo en el tallo. Cortar todas las hojas que midan por lo menos 10 cm., dejando una porción del tallo de 10-15 cm. a partir del suelo. Una planta madre proveniente de una estaca puede proporcionar 100 esquejes de una hoja a los 4-5 meses de crecimiento. El número de hojas por planta madre puede ser aumentado mediante el despunte de la yema apical del tallo a los 2 meses de edad.
2. Cortar las láminas de las hojas a la mitad de su longitud, colocar los esquejes en agua o en una bolsa de plástico para su traslado al medio de enraizamiento. El medio de enraizamiento puede ser arena gruesa y debe estar parcialmente protegido de corrientes de aire y de los rayos directos del sol.
3. Plantar los esquejes superficialmente en el substrato y mantener las hojas en un ambiente de alta humedad relativa. Esto se consigue por medio de la aspersion foliar con agua; la aspersion debe ser continua durante 2-3 días luego debe operar sólo en el día y al cabo de 6-8 días se corta el agua totalmente. Cualquier riego posterior se puede realizar con regaderas de mano. Dependiendo de la presión de agua, se puede mantener la aspersion foliar sin necesidad de bombas de aspersion.
4. A los 8-10 días se inician las raíces y los tallos. Las plantas pueden ser transplantadas a bolsas de plástico o de papel para su adaptación durante 7-10 días antes de ser llevados al campo. También los esquejes pueden ser enraizados en bandejas, con capacidad para 50-100 esquejes cada una, conteniendo el substrato; después de iniciado el enraizamiento, las bandejas pueden ser transferidas a un ambiente de adaptación por 7-10 días antes de ser llevados para su transplante directo al campo.

5. A los 5-6 meses cada planta derivada de un esqueje puede tener 100 hojas las cuales pueden ser cortadas nuevamente para la propagación.
6. Al cabo de un año de crecimiento en el campo, cada planta proveniente de un esqueje puede proporcionar 30 estacas comerciales para la siembra.

Cuando se compara el potencial de varias técnicas para la multiplicación de la yuca, el método de esquejes de una sola hoja ofrece las tasas de multiplicación más altas (Cuadro 4) debido al tiempo ganado en utilizar la planta madre (4 meses de edad) y en propagar los esquejes (3 semanas).

#### Métodos para la Propagación de la Papa

A diferencia de la yuca, existe abundante experiencia sobre los métodos de propagación vegetativa de la papa, especialmente para el incremento rápido de clones en programas de mejoramiento y de certificación de semillas.

El método de propagación rápida más utilizado consiste en enraizar esquejes de 10-15 cm. de longitud, cada uno de los cuales incluye varios nudos con hojas expandidas y la yema terminal. Los esquejes se obtienen de tallos de plantas madres crecidas en potes. Normalmente, se puede obtener un promedio de 85 esquejes por planta madre durante un período de 3 meses. Trabajos realizados en el CIP (1976) han demostrado que existe una gran influencia del genotipo en el número de esquejes que se pueden obtener por planta madre; los materiales de la subsp. andigenum por lo general producen mayor número de esquejes que aquellos de la subsp. tuberosum. Se ha logrado aumentar significativamente las tasas de propagación (en promedio, 40 esquejes pueden ser "cosechados" cada 15 días) mediante los siguientes tratamientos a las plantas madres: alargamiento artificial de la duración del día (16-18 horas) lo cual puede ser acompañado por un aumento de la temperatura (28-30°C), y la aplicación de fertilizantes ricos en nitrógeno. Se han logrado incrementos del 20-60% en el número de esquejes obtenidos en cada "cosecha" mediante la remoción periódica de los estolones de las plantas madres (Cuadro 5). Todos estos tratamientos tienden a retardar o inhibir la tuberización pero promueven el crecimiento de tallos y ramas. Los esquejes se enraizan en un substrato que permita un buen drenaje; el uso de hormonas para el enraizamiento puede ser necesaria para las variedades de la subsp. tuberosum; las hormonas, a la vez que favorecen la formación de raíces, inhiben la tuberización prematura de los esquejes. Los esquejes se encuentran listos para el transplante a potes o al campo a los 15-20 días. Cada esqueje puede producir un promedio de 0.5 kg. de tubérculos. Los tubérculos cosechados pueden ser utilizados para la siembra de incremento final antes de ser distribuidos a los agricultores.

CUADRO 4

Potencial de multiplicación vegetativa de la yuca por medio de tres técnicas de propagación

<u>Parámetros</u>	<u>Sistema tradicional</u>	<u>Retoños de estacas</u>	<u>Esquejes de una hoja</u>
Edad de la planta madre <sup>1</sup>	1 año	1 año	4 meses
No. propágulos/planta madre	30	150	100
No. tallos formados/propágulo	1/año	8 cada 4 meses	1 cada 2 semanas
Formación de raíces	-	2-3 semanas	2 semanas
Transplante al campo	-	4-6 semanas	3 semanas
No. plantas maduras/planta madre	30/año	1200/año	10,000/año
No. estacas comerciales/planta madre	900/año	36,000/año	300,000/año

1. Cada método de propagación se inicia con una planta madre. Cálculos basados en los trabajos de Cock, et al (1976), Pateña, et al (1979), Roca, et al (1980).

CUADRO 5

Multiplicación de la papa por medio de esquejes: Efecto de remover los estolones

Cosechas <sup>1</sup>	No. esquejes/planta		Incremento <sup>2</sup>
	Plantas con estolones	Plantas con estolones cortados	
1 <sup>a</sup>	12	15	20%
2 <sup>a</sup>	14	21	33%
3 <sup>a</sup>	16	25	36%
4 <sup>a</sup>	27	45	40%
5 <sup>a</sup>	27	38	29%
6 <sup>a</sup>	25	41	39%
7 <sup>a</sup>	37	65	43%
8 <sup>a</sup>	40	93	57%

1. Intervalo entre cosechas = 15-20 días. El experimento finalizó a la 8<sup>a</sup> cosecha pero las plantas se encontraban al máximo de producción de esquejes.

2. Ganancia en producción de esquejes como consecuencia de remover los estolones.

Los datos representan el promedio de dos variedades; 10 plantas por variedad.

(Trabajo realizado en el CIP, Lima-Peru, 1976).

Otra técnica de propagación de la papa utiliza esquejes de un solo nudo y una hoja obtenidos de plantas madres en estado de tuberización. Los esquejes se plantan en vermiculita húmeda en un ambiente de alta humedad relativa y al cabo de 1-2 semanas, cada yema exilar se ha diferenciado en un tubérculo pequeño. De acuerdo a Lauer (1977), una planta madre puede proporcionar en promedio 114 esquejes de un nudo, cada uno de los cuales formará un tubérculo de 1.5 - 2.0 g., los que al ser sembrados en el campo dieron un rendimiento de 0.5 Kg/planta. En el CIP, Bryan (comunicación personal) encontró que los materiales de la subsp. tuberosum tuberizaron casi en un ciento por ciento; y que el método puede ser mejor utilizado cuando los esquejes de un nudo se obtienen al final del ciclo vegetativo de plantas madres que se han propagado por esquejes de tallos axilares.

#### Métodos de Propagación in vitro

Después que un cultivar ha sido liberado de virus, se debe esperar su re-infección hasta cierto grado durante los procesos de multiplicación. Este riesgo puede reducirse al mínimo transfiriendo parte de las actividades de producción de semilla del campo al laboratorio.

La técnica de cultivo de meristemas in vitro (más apropiadamente, cultivo de ápices caulinares) se ha convertido en una alternativa válida para la propagación asexual de numerosas especies de importancia económica. La ventaja principal del cultivo de meristemas sobre los métodos de esquejes reside en que los materiales de propagación se encuentran aislados de posibles infecciones por patógenos transmitidos por el suelo, por insectos y aún de aquellos que se movilizan por el aire.

El método más simple de propagación in vitro consiste en la obtención de una planta en miniatura a partir del cultivo de un meristema; seguidamente la plántula se divide en segmentos de un nudo, cada uno de los cuales va a dar origen a una planta cuando se "siembre" in vitro; esta operación puede repetirse indefinidamente. Por este sistema, es posible multiplicar el material por un factor de 3 en la yuca y de 5 en la papa cada dos a tres semanas. La obtención de la primera plántula a partir del meristema se logra en el medio de Murashige y Skoog (1962) el cual se complementa con 2% de sucrosa y con concentraciones bajas (0.02 - 0.05 mg/l) de BAP, AG, y ANA; el medio de cultivo para los segmentos de nudos contiene el mismo medio, pero diluido con agua en proporción de 1:3, y complementado con sólo 3% de sucrosa para la papa y con 2% de sucrosa más 0.01 mg/l de ANA para la yuca.

Otro método de propagación in vitro consiste en inducir el crecimiento de numerosas yemas axilares a partir de un meristema, de tal manera que se forman cultivos de tallos múltiples; cada tallo puede a su vez ser multiplicado por medio del

cultivo de nudos arriba descrito. Las tasas de multiplicación que se pueden obtener por medio del método de tallos múltiples son mucho mayores que con el método anterior. En el sistema de propagación in vitro de la papa diseñado por Roca, et al (1978) se producen 70-100 plantas al mes, a partir de un meristema. Trabajando con un sistema similar ha sido posible en el CIAT (1980) obtener 20 plantas de yuca al mes.

Los propágulos obtenidos por el cultivo de meristemas pueden ser utilizados para el intercambio in vitro de materiales vegetativos, reduciéndose los peligros de diseminación de plagas y enfermedades; estas aplicaciones han sido realizadas por Roca, et al (1979a) para la papa y (1979b) para la yuca.

LITERATURA CITADA

- Baker, K. F. 1962. Thermotherapy of planting materials. *Phytopath.* 52: 1244-1255.
- Canada Department of Agriculture. 1974. Diseases and Pests of Potatoes (Compiled by W. A. Hodgson, D. D. Pond and J. Munro). Publication 1492. Ottawa.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1980. Cassava Tissue Culture, In Cassava Program Annual Report 1979, pp. 82-88.
- Cock, J. H., D. Wholey, J. C. Lozano y J. C. Toro. 1976. Sistema rápido de propagación de yuca. CIAT Serie ES-20, Cali, Colombia.
- Cooper, V. C. and D. G. A. Walkey. 1978. Thermal inactivation of cherry leaf roll virus in tissue cultures of Nicotiana rustica raised from seeds and meristem tips. *Ann. Applied Biol.* 88: 273-278.
- Douglas, J. E. (ed.). 1980. Successful seed programs: A Planning and Management Guide. Westview Press/Boulder, Colorado.
- Hollings, M. 1965. Disease control through virus-free stock. *Ann. Rev. Phytopath.* 3: 367-396.
- International Potato Center. 1976. Seed production for developing countries, In CIP Annual Report 1976; Lima, Perú.
- International Potato Center. 1977. The potato: major diseases and nematodes. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú.
- Kaiser, W. J. 1980. Use of thermotherapy to free potato tubers of alfalfa mosaic, potato leaf roll and tomato black ring viruses. *Phytopath.* 70: 1119-1122.
- Lauer, F. I. 1977. Tubers from leaf-bud cuttings: A tool for potato seed certification and breeding programs. *Am. Potato J.* 54: 457-464.
- Lerch, B. 1977. Inhibition of the biosynthesis of potato virus X by ribavirin. *Phytopath.* 89: 44-49.
- Lozano, J. C., A. Bellotti, A. van Schoonhoven, R. Howeler, J. Doll, D. Howell and T. Bates. 1976. Field problems in cassava, CIAT Series GE-16, Cali, Colombia.

- Lozano, J. C., J. C. Toro, A. Castro y A. C. Bellotti. 1977. Producción de material de siembra de yuca. CIAT Serie GS-17, Cali, Colombia.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-496.
- Pateña, L. F., R. C. Barba and J. B. Estrella. 1979. New rapid methods of cassava propagation by leaf-bud and stem cuttings. IPB Circular, Inst. Of Plant Breeding, University of the Philippines at Los Baños.
- Quak, F. 1977. Meristem culture and virus-free plants; pp. 598-615, *In Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, J. Reinhart and Y. P. S. Bajaj (eds.). Springer-Verlag, New York.
- Roca, W. M., N. O. Espinoza, M. R. Roca and J. R. Bryan, 1978. A tissue culture method for the rapid propagation of potatoes. *Am. Potato J.* 55: 691-701.
- Roca, W. M. J. E. Bryan and M. R. Roca. 1979a. Tissue culture for the international transfer of potato genetic resources. *Am. Potato J.* 56: 1-10.
- Roca, W. M. 1979b. Tissue culture methods for the international exchange and conservation of cassava germplasm. *Cassava Newsletter*, No. Series OIEC-6, pp. 3-5.
- Roca, W. M., A. Rodríguez, L. F. Pateña, R. C. Barba and J. C. Toro. 1980. Improvement of a propagation technique for cassava using single leaf-bud cuttings: A preliminary report. *Cassava Newsletter* No. 8, CIAT Series OIE-8.
- Shepard, J. F. 1977. Regeneration of plants from protoplasts of potato virus X-infected tobacco leaves. *Virology* 78: 261-266.
- Shepard, J. F. and L. E. Claflin. 1975. Critical analyses of the principles of seed potato certification. *Ann. Rev. Plant Path.* 13: 271-293.
- Sing, R. P., R. E. Finnie and R. H. Bagnall. 1971. Losses due to the potato spindle tuber virus. *Am. Potato J.* 48: 262-267.
- Walkey, D. G. A. 1976. High temperature inactivation of cucumber and alfalfa mosaic viruses in *Nicotiana rustica* cultures. *Ann. Appl. Biol.* 84: 183-192.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece la ayuda de los colaboradores de investigación de la Sección de Fisiología, Unidad de Recursos Genéticos del CIAT. Igualmente se agradece a la Srta. H. Dierolf por su eficiente ayuda secretarial.