



Facultade de Ciencias
UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Saneamiento y tuberización
de variedades tradicionales
de patata”

“Sanitation and
tuberization of traditional
potato varieties”

“Saneamento e
tuberización de variedades
tradicionais de pataca”

Laura Pereira Morales
Máster en Biología Molecular, Celular y
Genética. 2018 – 2019

A Coruña, 13 de septiembre de 2019

Directora: Margarita Fraga Ares. Directora Técnica
de Cultivar. Fundación Paideia Galiza

Co-directora: Ángeles Bernal Pita da Veiga.
Profesora Titular del Departamento de Biología
Vegetal de la Universidad de A Coruña

Dña. Margarita Fraga Ares, Directora Técnica de Cultigar, Doctora en Química, informa:

Que el presente trabajo de Máster titulado “Saneamiento y tuberización de variedades tradicionales de patata”, presentado por Laura Pereira Morales ha sido realizado en el laboratorio de la empresa Cultigar bajo su dirección, y cumple con las condiciones exigidas para obtener el Máster de Biología Celular, Molecular y Genética, por lo que autoriza que pueda ser juzgado por el Tribunal Evaluador.

Brión, 28 de agosto de 2019.

Fdo.: Margarita Fraga Ares

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.Características e historia de la patata.....	1
1.2.Mecanismo de propagación de plantas de patata.....	2
1.3.Cultivo <i>in vitro</i>	3
1.4.Saneamiento vegetal.....	4
1.5.Principales virus que afectan a los cultivos de patata.....	5
1.6. Microtuberización.....	7
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
3.1.Material vegetal.....	11
3.2.Medio de cultivo.....	11
3.3.Micropropagación mediante cultivo <i>in vitro</i>	12
3.3.1 Establecimiento.....	12
3.3.2 Multiplicación.....	12
3.3.3 Aclimatación.....	13
3.3.4 Paso a Invernadero.....	14
3.4.Saneamiento de material vegetal.....	14
3.4.1 Tratamientos de termoterapia.....	14
3.4.2 Extracción de meristemos.....	15
3.5.Inmunoensayo enzimático de doble Anticuerpo (DAS-ELISA) para PVY, PVX, PLRV.....	15
3.6. Tuberización.....	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
4.1.Ensayo de saneamiento de las variedades tradicionales de patata.....	17
4.2.Ensayo para la mejora de la microtuberización <i>in vitro</i>	21
4.3.Comparación de la tuberización producida a partir de planta <i>in vitro</i> con la obtenida del cultivo de los microtubérculos producidos <i>in vitro</i>	24
4.4.Comparación del peso medio de los minitubérculos producidos en siembras sucesivas.....	26
5. CONCLUSIONES.....	29

6. BIBLIOGRAFÍA.....	31
----------------------	----

TABLAS

Tabla 1 – Reactivos, concentraciones y cantidades añadidas para el medio de multiplicación y enraizamiento de <i>Solanum tuberosum</i>	12
Tabla 2. Datos de extracción y supervivencia de meristemos de plantas sometidas a tratamientos de termoterapia.....	18
Tabla 3. Diseño de experimento de medios para microtuberización de <i>Solanum tuberosum</i> , señalando los componentes que varían y sus cantidades añadidas por litro.....	22
Tabla 4. Datos de producción de MNT a partir del cultivo de MCT y de plantas producidas por micropropagación.....	25
Tabla 5. Datos de producción de la segunda cosecha de MNT procedentes del re-cultivo de la primera cosecha de MNT. *Peso medio de MNT obtenidos en el ensayo anterior de tuberización, partiendo de MCT in vitro.....	27

GRÁFICOS

Gráfico 1. Porcentaje de plantas que han dado resultados negativos en las pruebas para cada virus.....	19
Gráfico 2. Porcentaje de MNT de 2ª cosecha obtenidos, clasificados según su peso. pequeños (< 0,5 g), medianos (0,5- 2 g) y grandes (> 2 g).....	27

ABREVIATURAS

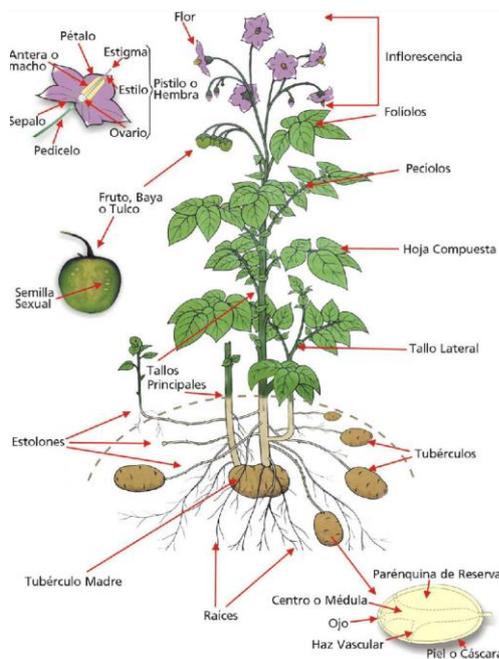
5- AZA	5- Azacitidina
3- DZD	3- Deazauridina
ABA	Ácido abscísico
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
BA	6- bencilaminopurina
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
GA	Ácido giberelínico
Ig	Inmunoglobulina
JA	Ácido jasmónico
MCT	Microtubérculo
MNT	Minitubérculo
MS	Murashige & Skoog
PVX	Virus X de la patata
PVY	Virus Y de la patata
PLRV	Virus del enrollamiento de la hoja de la patata
TMT	Termoterapia
Vits	Vitaminas

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características e historia de la patata

La patata (*Solanum tuberosum* L.) es una herbácea perteneciente al género *Solanum* de la familia de las solanáceas.

Se trata de una planta de tallo erecto que puede medir hasta 1.0 m de altura, con hojas ovaladas, flores blancas, amarillas, rosadas o violetas, y un sistema de raíces corto que produce tubérculos comestibles bajo tierra (Ver Imagen 1). Cada planta de patata sana puede producir de 3 a 25 tubérculos.



La patata es uno de los cultivos alimenticios más importantes tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo debido a su elevada capacidad de producción por unidad de superficie que permite abastecer de alimento a un gran número de personas, y por sus cualidades dietéticas (Coleman *et al.*, 2001). La producción mundial supera los 300 millones de toneladas, por lo que ocupa el cuarto lugar después del trigo, el arroz y el maíz (Moeinil *et al.*, 2011; Levy *et al.*, 2013).

Imagen1. Esquema de planta de patata (*Solanum tuberosum* L.)

La patata es un alimento sano y energético. Contiene almidón, azúcares, proteínas, y antioxidantes, así como una discreta cantidad de vitamina B, vitamina C y sustancias minerales que adquiere de la tierra.

Además de usarse como alimento directo, también se utilizan para la producción de almidón, harina de fécula, dextrina, alcohol, y diversos usos medicinales.

Tiene su origen en Chile y Perú, donde era cultivada por las poblaciones locales siendo el principal alimento de su dieta. Durante la conquista de América en el siglo XVI, fue descubierta por los españoles y decidieron importarla a Europa.

A finales del siglo XVIII se extendió la costumbre de usarla como alimento y, desde entonces, se ha cultivado de forma intensiva pasando a ser un alimento esencial e imprescindible en todo el mundo.

En Galicia no es hasta el siglo XIX cuando se da un cultivo generalizado. La expansión se inició durante la crisis de los cereales ya que el cultivo de la patata era más sencillo, tenía un

rendimiento mucho mayor y además se podían cultivar en suelos pedregosos y colinas empinadas. Prácticamente en todas las comarcas gallegas se cultiva patata, si bien las que dedican mayor superficie son las de Bergantiños (A Coruña), Lemos, A mariña y Terra Chá (Lugo) y A Limia y Allariz (Ourense). (Ver Imagen 2)



Imagen2. Mapa de las principales zonas de cultivo de patata en Galicia

Debido a las condiciones climatológicas y a las características de los suelos, el producto obtenido en Galicia tiene una calidad excepcional. La abundante lluvia y temperaturas hacen que el desarrollo vegetativo de los tubérculos sea óptimo, y se consigue un crecimiento continuo. Además, la existencia de un período seco entre agosto y septiembre hace que las patatas pierdan agua y maduren perfectamente antes de ser cosechadas.

Las variedades Kennebec y Agria son las más cultivadas en Galicia. De las variedades autóctonas, han llegado a nuestros días tres: Fina de Carballo (Bergantiños), Cazona (Terra Chá) y Ganade (A Limia).

El 3% de la superficie cultivada está acogida a la Indicación Geográfica Protegida (IGP) “Pataca de Galicia”. Las patatas amparadas por esta IGP deben de ser de la variedad Kennebec, aunque desde hace poco, está en marcha el expediente para que también se incluyan las variedades Agria y Fina de Carballo.

1.2. Mecanismo de propagación de plantas de patata

La forma de propagación usada en la producción de patata es vegetativa a través de tubérculos (Naik & Karihaloo, 2007; Barrell *et al.*, 2013) denominados “tubérculos semilla”, “semilla de siembra” o “patata de siembra”, que no deben presentar lesiones, ni síntomas de enfermedades. De estos se desarrolla un brote que crece y sobresale del terreno dando origen a

la planta y al mismo tiempo en la parte subterránea, el brote principal origina otros que producen un grupo de nuevos tubérculos.

Debido a esta forma de propagación la contaminación y transmisión de enfermedades causadas por virus, hongos, bacterias e insectos es muy alta (Sturz *et al.*, 2000; Nascimento *et al.*, 2003). Además, el empleo del mismo material vegetativo durante varios ciclos provoca la acumulación de estos agentes (en especial de virus) que pueden llevar a la degeneración del cultivo (Scherwinski & Luces, 2004). Por ello, la calidad del “tubérculo semilla” es un factor importante para la para la producción y cultivo de las variedades de patata y se requiere material certificado libre de virus (RD 27/2016, de 29 de enero).

1.3.Cultivo *in vitro*

La tecnología de cultivo *in vitro* permite multiplicar plantas de forma masiva a partir de cualquier parte de la planta o explanto (célula, tejido u órgano) en condiciones asépticas y controladas, basándose en la totipotencia o capacidad inherente de las células de las plantas para desarrollarse en un individuo completo. Se emplea para obtener semillas libres de patógenos (Rafique *et al.*, 2004; Naik & Karihaloo, 2007; Hoque, 2010), plantas con nuevas características, micropropagación a gran escala, rescate de embriones, etc.

Este tipo de cultivo tiene una serie de ventajas respecto al tradicional ya que se puede partir de un pequeño número de plantas y obtener una producción masiva y homogénea (plantas genéticamente idénticas o “clones”), en cualquier época del año, con ausencia de plagas y enfermedades, y controlando el desarrollo de las plantas al modificar las condiciones ambientales y nutritivas.

El cultivo *in vitro* de las plantas de patata consta de varias fases:

- Fase 0. Preparación de la planta madre.

El material vegetal de partida debe estar en condiciones nutricionales y de desarrollo adecuadas, para ello se tienen durante un tiempo en invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente la planta crece de forma vigorosa y libre de enfermedades.

- Fase 1. Establecimiento.

Se inicia el cultivo *in vitro* a partir de partes de la planta madre previa desinfección.

- Fase 2. Multiplicación.

Los brotes regenerados se individualizan y subcultivan en medio nuevo.

- Fase 3. Enraizamiento.

Se produce inducción de raíces, esta etapa puede darse *in vitro* o en invernadero. En el caso de la patata las fases de multiplicación y enraizamiento se dan simultáneamente y en un mismo medio.

- Fase 4. Aclimatación.

Las plantas se transfieren de un ambiente aséptico y cerrado a un invernadero o campo, y se van adaptando de forma gradual a las nuevas condiciones ambientales.

1.4.Saneamiento vegetal: termoterapia y cultivo de meristemos

Las infecciones virales provocan enfermedades que degeneran la planta y afectan al rendimiento de los cultivos provocando grandes pérdidas. Uno de los principales problemas que se encuentran los agricultores que cultivan patata es la falta de semillas certificadas que puedan utilizar para iniciar sus cultivos, debido a la presencia de determinadas virosis. Al reproducirse de forma vegetativa, en cada ciclo aumenta la infestación viral, por lo que es importante desarrollar técnicas que permitan obtener plantas sanas que produzcan tubérculos libres de virus que puedan ser utilizados como “semilla de siembra” y que garanticen la calidad fitosanitaria del material vegetal del cultivo (Wróbel, 2014; Tapia Figueroa *et al.*, 2017).

Para obtener plantas libres de virus a partir de otras infectadas se pueden utilizar distintas técnicas de saneamiento como el cultivo de tejidos, la termoterapia, quimioterapia y electroterapia.

La termoterapia es el método más común para la erradicación de los virus. Consiste en mantener las plantas, o una parte de ellas, a temperaturas entre 35°C y 54°C, durante un período de tiempo ajustado según la especie y variedad del cultivo. La temperatura seleccionada debe ser aquella que permita la inhibición del virus causando el mínimo daño a los tejidos de la planta.

Las principales alteraciones producidas en los virus por el tratamiento térmico son la desnaturalización de proteínas de la cápside y ruptura del ácido nucleico, por tanto, no se replican y se deteriora la infectividad viral.

En la bibliografía encontramos artículos en los que se describen diferentes tratamientos de termoterapia utilizados en el saneamiento de plantas de patata. Valenzuela-Herrera *et al.* (2003), Sakha *et al.* (2007) y Taj Khan *et al.* (2013) someten tubérculos de patata a periodos de termoterapia de 37°C durante 10 a 20 días, en cambio, Younes *et al.* (2014) utiliza un método en el que plantea cuatro tiempos de exposición de 1, 2 3 y 4 horas a 55°C.

En Cultigar, tienen experiencia en la realización de tratamientos de termoterapia para diferentes especies de plantas. Uno de los métodos que han desarrollado consiste en el

sometimiento de la planta al aumento de temperatura gradual desde 30°C a 40°C de la siguiente forma: 2 días a 30°C, 2 días a 35°C y otros 2 o 3 días a 40°C.

Este tratamiento ha sido empleado también para el saneamiento de frutales y otras variedades de patata con resultados satisfactorios.

También existen estudios que emplean la crioterapia (Wang *et al.*, 2009; Nukari *et al.*, 2009; Wang & Valkonen, 2009; Kushnarenko *et al.* 2017), como un método con alta eficiencia en la eliminación de virus con la ventaja de ser un tratamiento más corto.

Otra técnica utilizada a la hora de producir plantas libres de virus es el cultivo de meristemas (Ver Imagen 3). Se trata de un tejido formado por células indiferenciadas con capacidad de dividirse durante todo el ciclo de vida de la planta, que determinan su crecimiento y pueden dar lugar a cualquier tejido u órgano. Al no poseer tejido vascular se encuentran aislados del resto de la planta. Como la mayoría de los virus y otros patógenos se movilizan por los haces vasculares, este tejido tiene mayor probabilidad de estar libre de virus.

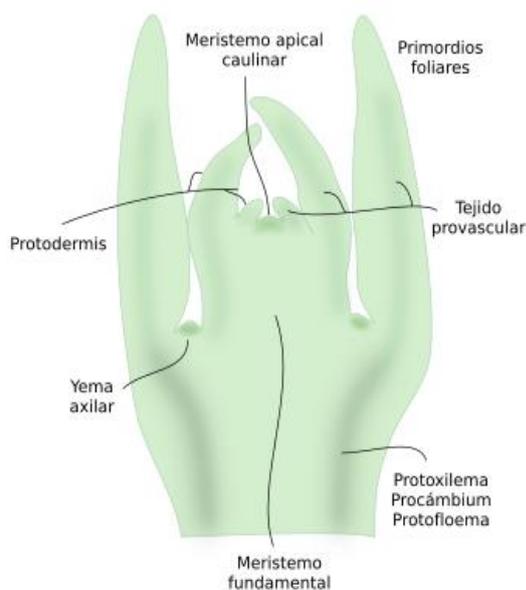


Imagen 3. Esquema donde se muestran las principales estructuras en las zonas de transición derivadas del meristemo apical caulinar (modificado de Beck, 2010)

El cultivo de meristemas combinado con la termoterapia es la metodología más utilizada para la eliminación de virus de plantas infectadas (Zaman *et al.*, 2001; Valenzuela-Herrera *et al.*, 2003; Sakha *et al.*, 2007; Taj Khan *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2014; Meneses & Morillo, 2017).

Algunos investigadores han utilizado otras técnicas como la quimioterapia en la que se añaden antivirales al medio de cultivo como Ribavirina, 5-AZA y 3-DZD (Nascimento *et al.*, 2003; Sabry *et al.* 2009; Singh 2015; Kushnarenko *et al.* 2017) o electroterapia que somete a las plantas a un choque eléctrico (Dhital *et al.*, 2008; Sabry *et al.*, 2009; Emami *et al.* 2011; Singh & Kaur, 2016) obteniendo resultados exitosos en la eliminación de diferentes virus que afectan a la patata pero sobre todo contra el PVY.

1.5.Principales virus que afectan a los cultivos de patata

Como ya mencionamos la producción de patata está amenazada por diferentes agentes bióticos como bacterias, hongos y virus, que producen degeneración del tubérculo y de la

planta. Para proceder a su cultivo es necesario que las semillas estén certificadas y para ello deben estar sanas libres de virus y otras enfermedades.

Los principales virus que afectan a la patata y en los que nos centraremos son:

- **PVX:** Virus X de la patata o Virus del mosaico rugoso, que pertenece a la familia Flexiviridae (Kitajima *et al.*, 1997). Se transmite por contacto de plantas infectadas con plantas sanas. La infección suele ser latente sin síntomas, en algunos casos se produce mosaico y necrosis.

- **PVY:** virus Y de la patata o Virus del mosaico severo de la patata, que pertenece a la familia Potyviridae (Kitajima *et al.*, 1997). Se transmite por áfidos, dispersión por tubérculos infectados o transmisión mecánica mediante maquinaria y herramientas.

Los síntomas varían desde un mosaico casi imperceptible hasta necrosis severas y muerte prematura de plantas, dependiendo de la variedad de patata y la cepa viral (Sturz *et al.*, 2000; Robert *et al.*, 2000).

- **PLRV:** pertenece a la familia Luteoviridae (Kitajima *et al.*, 1997) y es el causante de la enfermedad del enrollamiento de la hoja de la patata. Una de las virosis de la patata más importantes. Se transmite por vector áfido y dispersan mediante tubérculos infectados.

Se produce desde enrollamiento de las hojas hasta necrosis interna reticulada. (Ver Imagen 4)



Imagen 4. Síntomas de los principales virus que afectan a las plantas de patata. De Izq a Drcha: PVX, PVY y PLRV

Estos virus se extienden a nivel mundial en todas las regiones donde se cultiva patata. Debido a su alta virulencia, su introducción continua a través de semillas importadas y la

aparición recurrente de los vectores portadores es difícil controlar directamente estas infecciones virales (Ahmad & Ahmad, 1995).

Se ha observado que estos virus pueden disminuir el rendimiento de las plantaciones de patata desde un 10 a 30% por PVX y hasta un 80- 90 % por PVY y PRLV (Mellor *et al.*, 1987).

1.6. Microtuberización

La microtuberización es el proceso por el que las plantas cultivadas *in vitro* producen tubérculos y está regulada por diversos factores ambientales, fitohormonas, concentración de nutrientes del medio, etc. Controlando estos factores reguladores, se puede estimular la microtuberización y producir grandes cantidades de microtubérculos. Si estas plantas están libres de virus se producirán microtubérculos sanos certificados que podrán utilizarse como semillas a la hora de establecer el cultivo de patata en campo.

Existen numerosas referencias bibliográficas sobre la microtuberización de la patata en las que los autores estudian el uso de medios modificados a los que añaden diferentes concentraciones de sacarosa (Xu *et al.*, 1998; Hussain *et al.* 2006; Montoya *et al.* 2008; Elaleem *et al.* 2015; Koleva Gudeva *et al.* 2016) y reguladores del crecimiento como citoquininas (Palmer & Smith, 1969; Gopal *et al.*, 1998; Montoya *et al.*, 2008; Koleva Gudeva *et al.* 2016), ABA (Xu *et al.*, 1998) y auxinas para su estudio como inductores de la tuberización. Por otro lado, hay estudios que confirman que el uso de otros reguladores como GA inhiben la formación de microtubérculos (Xu *et al.*, 1998; Sarkar, 2008) y que la disminución de los niveles exógenos y endógenos de estas promueven la tuberización (Smith & Rappaport 1969, Krauss & Marschner, 1982).

También se han empleado otras técnicas de cultivo como la inmersión temporal en medios suplementados que han dado resultados muy favorables de microtuberización (Montoya *et al.*, 2008; Kämäräinen-Karppinen *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2015) o la modificación de las condiciones ambientales como la temperatura (Cutter, 1978; Oraby *et al.* 2015) y la intensidad de la luz (Wang & Hu, 1982; Hussey & Stacey, 1984; Garner & Blake 1989; Gopal *et al.*, 1998) llegando a resultados en los que la baja intensidad lumínica y bajas temperaturas favorecen la tuberización de las plantas de patata.

La microtuberización como vemos es objeto de diferentes estudios ya que, variando las concentraciones de los componentes del medio, añadiendo reguladores del crecimiento y/o modificando las condiciones ambientales se puede conseguir un rendimiento mucho mayor, una gran cantidad de microtubérculos para la siembra que tienen ventajas respecto a las plantas debido a su pequeño tamaño, fácil manipulación y transporte, posibilidad de empleo para la

producción de minitubérculos, y además, permiten la conservación de germoplasma y estudios de mejora genética (Dobránszki *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2012, Fufa & Diro, 2014).

2. OBJETIVOS

El principal problema que se encuentran los agricultores gallegos a la hora de cultivar patatas es que muchas de las variedades tradicionales no están certificadas al no cumplir las disposiciones de la legislación específica de *Control y Certificación de Patata de Siembra* recogidas en el Real Decreto 27/2016, de 29 de enero, debido a que están infestadas de virus y, por tanto, no se pueden cultivar.

Por ello es necesario producir semillas obtenidas de plantas libres de virus que puedan ser empleadas en las plantaciones.

Los objetivos de este estudio son:

- Análisis de la efectividad de distintos tratamientos utilizados para el saneamiento de las plantas de patata como son la termoterapia y cultivo de meristemos.
- Estudio de factores que pueden favorecer la microtuberización de las plantas de patata *in vitro*.
- Análisis de la tuberización *ex vitro*:
 - o Comparación de la tuberización producida a partir de planta *in vitro* con la obtenida del cultivo de los microtubérculos producidos *in vitro*.
 - o Comparación del peso medio de los microtubérculos producidos en siembras sucesivas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Las plantas de patata *Solanum tuberosum* utilizadas en el presente estudio pertenecen a las variedades Ganade, Fina de Carballo y Cazona, autóctonas de Galicia y la variedad Kennebec, que es la más empleada en nuestra comunidad. Proviene de tubérculos de cada variedad que fueron cultivados en las instalaciones de Cultigar y se mantuvieron en la cámara de germinación o Fitotrón para evitar su contaminación, a una temperatura de 24-26°C, fotoperiodo 16h luz/8h oscuridad con una intensidad lumínica de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y aporte de humedad por riego cada 2-3 días.

La variedad Kennebec fue utilizada como control en los ensayos de tuberización mientras que la Fina de Carballo se empleó como control en los ensayos de saneamiento por ser planta certificada libre virus.

3.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para la multiplicación y enraizamiento de las plantas de patata fue MS ½ Ø CA1 desarrollado por Cultigar. Se trata del medio descrito por Murashige & Skoog (1962) con la concentración de sales y vitaminas a la mitad (1/2), sin reguladores de crecimiento (Ø) y con Carbón activado (CA) a una concentración de 1 g/L. La mezcla se prepara a partir de disoluciones stock de los diferentes componentes del medio. (Ver Tabla 1).

Una vez preparado el medio de cultivo se ajustó el pH a 5,7 – 5,8 (pHmetro Hanna) y se dispensó de 15 en 15 mL en tubos de ensayo. Posteriormente, estos tubos se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1 atm durante 20 min, y se mantuvieron en frío hasta su uso.

Las plantas de patata crecen y enraízan directamente en este medio de cultivo por lo que no hubo que realizar modificaciones para conseguir el enraizamiento previo a su aclimatación.

MS ½		pH 5,6-5,8
MACROS MS (cada uno independiente)	Stock [x100] g/L	
CaCl₂ · 2H₂O	44 g/L	5 ml/L
KH₂PO₄	17 g/L	5 ml/L
MgSO₄ · 7H₂O	37 g/L	5 ml/L
NH₄NO₃	165 g/L	5 ml/L
KNO₃		0,95 g/L
MICROS MS (todos en la misma disolución)	Stock [x1000] mg/L	

CoCl₂ . 6H₂O	25 mg/L	0,5 mL
CuSO₄ . 5H₂O	25 mg/L	
H₃BO₃	6200 mg/L	
KI	830 mg/L	
MnSO₄ . H₂O	16900 mg/L	
Na₂MoO₄ . 2H₂O	250 mg/L	
ZnSO₄ . 7 H₂O	8600 mg/L	
FeNaEDTA	367 mg/L	2,5 mL/L
VITS MS (todas en la misma disolución)	[x100] mg / 500 mL	
Glicina	100 mg/500mL	5 mL/L
Ác. Nicotínico	25 mg/500mL	
Piridoxina	25 mg/500mL	
Tiamina	5 mg/500mL	
Myo-inositol		50 mg/L
AGAR	6 g/L	
SACAROSA	30 g/L	
CA1	1 g/L	

Tabla 1 – Reactivos, concentraciones y cantidades añadidas para el medio de multiplicación y enraizamiento de *Solanum tuberosum*

3.3 Micropropagación mediante cultivo *in vitro*

3.3.1 Establecimiento

El material vegetal procedente del Fitotrón, fue desinfectado, previa eliminación de las hojas, mediante agitación en una solución comercial de hipoclorito sódico al 15% y el tensioactivo Tween20 al 0,1%, durante 20 minutos. A continuación, se realizaron tres lavados sucesivos de un minuto cada uno con agua destilada estéril en condiciones de asepsia.

Una vez desinfectados, se cortan los brotes en trozos aproximadamente de 2 cm obteniendo segmentos nodales con yemas axilares que se utilizan como explantes y se introducen en los tubos con el medio de multiplicación.

Los tubos permanecieron en la cámara de cultivo para su crecimiento durante 15- 20 días a una temperatura de 24-26°C, fotoperiodo de 16h luz/8 h oscuridad con intensidad lumínica de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.3.2 Multiplicación

Las plántulas se transfirieron a medio de cultivo fresco cada 30 días aproximadamente en condiciones de asepsia en la cabina de flujo laminar horizontal, cortando desde el ápice por

debajo de cada brote y consiguiendo explantes de un solo nudo y 1-2 cm de longitud (Ver Imagen 5). El medio utilizado para la multiplicación fue el mismo que para su establecimiento (MS ½ Ø CA1).



Imagen 5. Explantes de un nudo obtenidos tras el corte de una plántula

3.3.3 Aclimatación

El sustrato utilizado fue una mezcla de turba y perlita de la marca Gramoflor® en proporción 3:1. Este sustrato asegura el enraizamiento, proporciona un soporte sólido a la planta y garantiza un cierto grado de humedad y aireación para formar un sistema radicular perfecto.

A mayores se añadió clorpirifos como insecticida en forma de granulado (CHAS®) para evitar la proliferación de la mosca de la turba.

La mezcla se preparó, se esterilizó en el autoclave (1 atm, 121°C, 20 min) y se distribuyó en bandejas hortícolas de 40 alveolos.

Las plantas se extrajeron del tubo, se lavaron con agua para eliminar restos del medio cultivo que pudieron quedar en las raíces y se plantaron una por alveolo. A continuación, se cerraron las cajas con tapas de metacrilato transparentes para mantener la humedad y se colocaron en la cámara de aclimatación a una temperatura de 24-26°C, fotoperiodo de 16h luz/8 h oscuridad con intensidad lumínica de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con aporte extra de humedad por riego cada 2 días (Ver imagen 6).

En el caso de los microtubérculos obtenidos de las plantas *in vitro*, se plantaron directamente sin necesidad de lavado, intentando dejar los pequeños brotes que empezaban a crecer en ellos hacia la superficie.



Imagen 6. Cámara de aclimatación

3.3.4 Paso a Invernadero

Transcurrido un mes, las bandejas que estaban en aclimatación se pasaron a los túneles del invernadero cerrados con plásticos que cuentan con un sistema “fog system” para mantener una humedad mayor del 90%. Se fue bajando gradualmente la humedad ambiental al mismo tiempo que se iba abriendo gradualmente el plástico del túnel. Este proceso duró aproximadamente un mes.

3.4 Saneamiento de material vegetal

3.4.1 Tratamientos de Termoterapia

Se compararon dos tratamientos térmicos. Para ello se escogieron 12 plantas de cada variedad (Fina, Cazona y Ganade) con buen crecimiento y vigorosas y se introdujeron directamente dentro de los tubos de ensayo en la cámara de termoterapia (JP Selecta).

El primer tratamiento al que se sometieron las plantas fue el desarrollado por la empresa Cultigar, que consiste en aumentar la temperatura 5°C cada dos días durante un total de 6 o 7 días, comenzando con 30°C los dos primeros días, 35°C los dos siguientes, y 40°C los 2 o 3 últimos según el estado físico de las plantas.

El otro método utilizado fue el utilizado por Younes *et al.* (2014). Se trata de un método más corto que utiliza una temperatura continua muy alta de 55°C y se realizan cuatro tiempos de exposición (1, 2, 3 y 4 horas). Se extrajeron los meristemos de 3 plantas para cada tiempo de exposición.

3.4.2 Extracción de meristemos

A las plantas procedentes de la cámara de termoterapia se les extrajeron los meristemos en el momento en que concluyó cada tratamiento con ayuda de una lupa binocular (Nikon®) y se transfirieron a placas Petri con medio MS ½ Ø CA1.

Se dejaron crecer 15 días en placa en la cámara de cultivo y, a continuación, se pasaron a tubos los meristemos supervivientes. Una vez desarrollada la planta se sometió a un proceso de multiplicación hasta conseguir la cantidad de plantas necesarias para poder realizar el test DAS-ELISA, y que al mismo tiempo quedase planta suficiente *in vitro* para poder continuar con su micropropagación.

3.5 Inmunoensayo enzimático de doble Anticuerpo (DAS-ELISA) para PVY, PVX, PLRV

La técnica DAS-ELISA se ha convertido en una técnica estándar para la detección de virus en plantas y especialmente para virus de la patata (Jeong *et al.* 2014; Anjum *et al.* 2017). Se basa en el uso de dos anticuerpos (Ac específico y Ac conjugado con enzima) para detectar la presencia o no de los virus de patata en las muestras ensayadas, mediante la unión del Ac al Ag.

Se ha utilizado el kit DAS-ELISA (Bioreba®) para PVY, PVX y PRLV. El procedimiento fue el siguiente:

Las muestras de plantas de patata se pesaron (200 mg) y maceraron con buffer de extracción. El líquido extraído fue la muestra utilizada para el ensayo.

Se utilizaron placas de microtitulación con pocillos recubiertos con el Ac monoclonal específico de virus (IgG- anti PVY, Ig-anti PVX e IgG-anti PRLV) y se incubaron durante 4 h con la muestra de la planta. A continuación, se añadió el Ac conjugado con enzima (IgG-fosfatasa alcalina) y se incubó 5 horas. Por último, se añadió el sustrato del enzima (p-nitrofenil fosfato). Al cabo de una hora se procede a la lectura de las placas (BIO-RAD Model 680XR) y se analizan los datos en el ordenador. A simple vista se puede observar el desarrollo de la reacción por un cambio a color amarillo en los pocillos que significa que el Ag del virus está presente en la muestra.

3.6 Tuberización

A la vista de la bibliografía recopilada, se diseña un ensayo para comparar el efecto de la sacarosa, de las sales del medio de cultivo y de diferentes reguladores del crecimiento en la inducción de la tuberización.

Para ello, se prepararon diferentes medios de cultivo utilizando como base el $MS(NO_3)_{1/2}$, es decir, con nitratos a la mitad, ya que una presencia elevada de nitrógeno retrasa el inicio de la tuberización, disminuye la producción de microtubérculos (Suárez *et al.*, 2006) y el % de materia seca de estos (Giletto, 2002; Love *et al.*, 2005). Este medio fue suplementando con diferentes concentraciones de sacarosa (3%, 6% y 8%), citoquinina BA (6-bencilaminopurina) a concentraciones de 0,5, 1 y 4 mg/L, ácido jasmónico (JA) a 0,5, 1 y 1,5 mg/L y las sales de Ca^{+2} , K^+ , PO_4^{-3} a una concentración 1,5x con respecto a las concentraciones normales. A todos los medios se les añadió 1 g/L de CA.

Se dispensaron los medios en tubos (40 tubos por medio) y autoclavaron (121°C, 1 atm, 15 min). Se introdujeron 8 plantas de cada variedad (Kennebec, Ganade y Cazona) en cada uno de los medios y se mantuvieron en la cámara de cultivo hasta el estudio de los resultados (aparición de los primeros tubérculos).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ensayo de saneamiento de las variedades tradicionales de patata

En este estudio se han ensayado dos tratamientos de termoterapia diferentes como posibles métodos para la eliminación de los virus que afectan a las variedades de patata Cazona y Ganade. La variedad Fina de Carballo se utiliza como control al presentar ausencia de virus.

En el primer método (Younes *et al.*, 2014) se seleccionaron 12 plantas de cada variedad (Fina de Carballo, Cazona y Ganade) y se sometieron a una temperatura de 55°C en la cámara de termoterapia durante un total de 4 horas. A cada hora se sacaron 3 plantas de la cámara, se procedió a extraer los meristemos con ayuda de una lupa binocular y se transfirieron a placas Petri con medio MS ½ Ø CA1.

Después de 15 días, se observa que todas las placas con los meristemos extraídos tras el método de Younes *et al.* (2014) estaban contaminados, por lo que se realiza una repetición con otras 12 plantas de cada variedad siguiendo los pasos anteriores. Una vez transcurridos los 15 días se vuelve a observar contaminación en las placas por lo que se descartan (Ver Imagen 7).

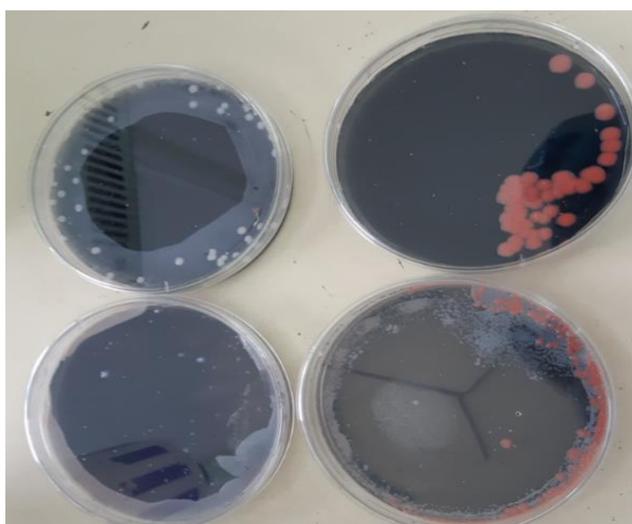


Imagen 7. Placas contaminadas con meristemos extraídos tras termoterapia

Para poner en práctica el método desarrollado en Cultigar, también se seleccionaron 12 plantas de cada variedad (Fina de Carballo, Cazona y Ganade) y se sometieron al aumento gradual de temperatura desde 30 a 40°C un total de 7 días (5°C cada 2 días). Se observa que, al terminar el ciclo de termoterapia, muchos meristemos apicales se encuentran quemados. Este efecto fue menos pronunciado en el primer método empleado (Younes *et al.* 2014).

Se extraen los meristemos viables y a los 15 días, se toman datos de supervivencia antes de transferirlos a los tubos de ensayo con medio de cultivo fresco (Ver Imagen 8). Se realizan

2 repeticiones de este proceso en el caso de la variedad Cazona, 1 tratamiento en el caso de Fina de Carballo y otro para la variedad Ganade.

Los datos de número de meristemos extraídos y el porcentaje de supervivencia de los mismos se recogen en la Tabla 2.



Imagen 8. Meristemos extraídos tras 15 días de crecimiento

		Nº meristemos Extraídos	Nº meristemos sobreviven	%supervivencia de meristemos
FINA	1ª TMT	31	3	9,67%
CAZONA	1ª TMT	52	35	67,31%
	2ª TMT	23	21	91,30%
GANADE	1ª TMT	6	4	66,67%

Tabla 2. Datos de extracción y supervivencia de meristemos de plantas sometidas a tratamientos de termoterapia

Se obtienen tasas de supervivencia bastante altas para las variedades Cazona y Ganade, similares a los obtenidos por Taj Khan *et al.* 2013, que consigue una supervivencia de entre 85.7% y 71.40%. En el caso de la variedad Fina, la mayor parte de los meristemos no crecen en las placas y los que han crecido son pequeños en comparación con los de las otras variedades, puede que el medio de cultivo no sea el adecuado para el desarrollo de los meristemos de este genotipo.

Con el fin de obtener los resultados de la presencia de los 3 virus estudiados en cada una de las variedades (PVX, PVY y PLRV), se multiplican durante un tiempo cada uno de los meristemos extraídos y se seleccionan 2 plantas de cada uno para someterlas al test ELISA.

También se incluyen en el test 2 plantas de cada variedad que no han sido sometidas a termoterapia.

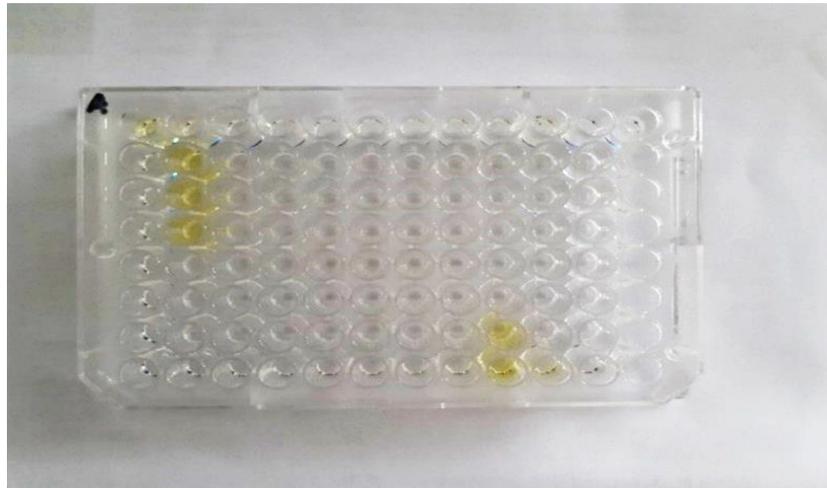


Imagen 9. Ejemplo de una Placa de ELISA mostrando los pocillos positivos (amarillo)

En la Imagen 9 se puede observar la coloración obtenida en las muestras que han dado positivas. El porcentaje de eliminación de cada virus se recoge en el Gráfico 1.

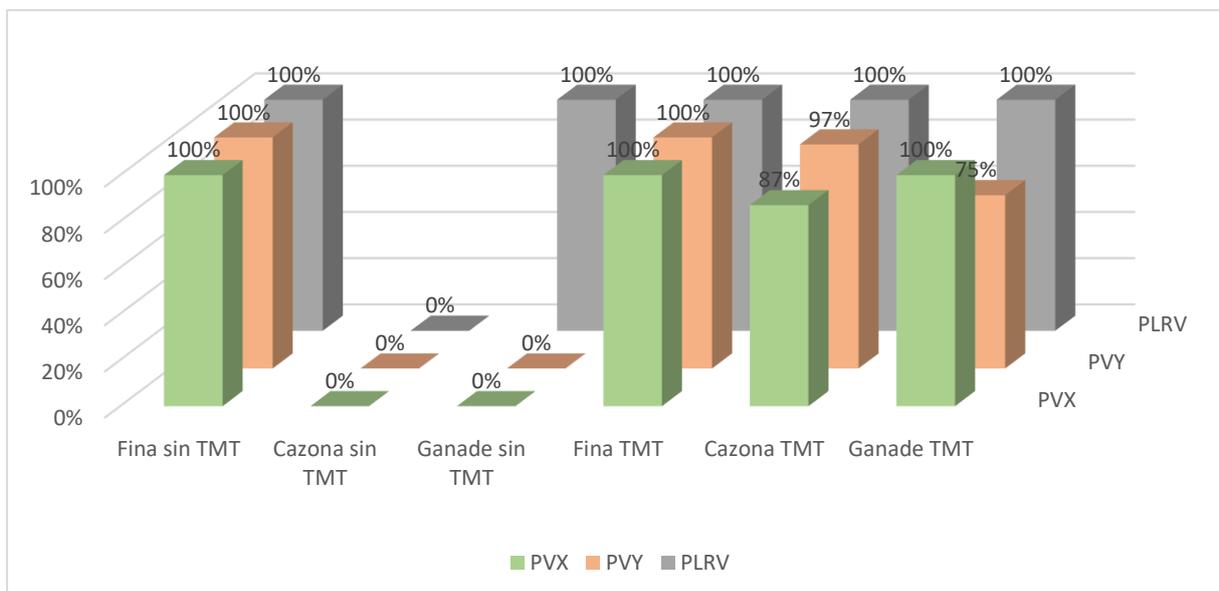


Gráfico 1. Porcentaje de plantas que han dado resultados negativos en las pruebas para cada virus

Observamos que PLRV resultó negativo para las muestras de las variedades Fina y Ganade antes de los tratamientos por termoterapia, pero la variedad Cazona sí dio positivo a la presencia de este virus. Tras el tratamiento observamos un 100% de negativos en las tres variedades, por tanto, el virus PLRV fue eliminado con éxito por este método.

Los datos de PVY muestran que el virus estaba presente en las variedades Ganade y Cazona. Tras el tratamiento se obtienen un 100% de muestras de Fina sin virus, un 97% en la variedad Cazona y un 75% en las muestras de Ganade.

Por último, el virus PVX también muestra resultados positivos en plantas de las variedades Cazona y Ganade que no pasaron por TMT. Después de la TMT, sin embargo, se obtienen unos porcentajes de plantas sanas de un 100% en el caso de Ganade y Fina y un 87% para Cazona, por lo que este método podemos decir que es eficiente para eliminar el virus PVX de las plantas.

Para corroborar estos resultados, se realizó un segundo test ELISA con planta aclimatada y endurecida en invernadero después de 5 meses de cultivo. Los resultados de esta prueba fueron idénticos a los obtenidos con planta *in vitro*.

En resumen, se obtienen suficientes plantas de las variedades Cazona y Ganade libres de los 3 virus estudiados (PVY, PVX y PLRV) después de ser sometidas al tratamiento de termoterapia desarrollado por Cultigar.

Algunos autores utilizaron métodos de termoterapia diferentes obteniendo resultados similares como Valenzuela-Herrera *et al.* (2003) que consigue eliminar PVX, PVRL y PVY mediante un tratamiento de dos ciclos de calor a 37°C /10 y 20 días, aunque en este caso el PVY no se eliminó por completo ya que fue detectado en algunas plantas. Sakha *et al.* (2007) y Taj Khan *et al.* (2013) cultivaron meristemos obtenidos tras un tratamiento de 37 ° C durante 2 a 3 semanas y consiguieron eliminar PVY, PVX y PRLV en algunas variedades de patata.

El método desarrollado en Cultigar, presenta algunas ventajas como la disminución del tiempo de duración del tratamiento, ahorrando costes del mantenimiento de altas temperaturas y mejorando la supervivencia de la planta tras el proceso. Además, la eficiencia del método para las variedades de patata ensayadas es superior a la descrita por otros autores.

Nascimento *et al.* (2003) y Sabry *et al.* (2009) estudiaron la eliminación de PVY mediante una termoterapia que consistía en dos ciclos (37 ± 2 ° C/ 40d y 37 ± 2 ° C/30d), logrando entre un 14,2 y 33,3% de eficiencia, unos datos mucho más bajos que los obtenidos en nuestro estudio, e indican que este método no es eficaz. Nascimento *et al.* (2003) además utilizó otro método combinado con quimioterapia consiguiendo unos resultados más altos, entre 83.3 y 50.0% según la variedad, concluyendo que el porcentaje de eliminación de virus puede aumentarse combinando técnicas.

Sería interesante probar otros métodos de termoterapia y combinaciones de métodos para comparar los resultados y además ver que tratamiento es más efectivo según el virus y la variedad de patata.

Actualmente, se están multiplicando las plantas libres de virus *in vitro* de las variedades Cazona y Ganade para conseguir un número de planta suficiente, que permita obtener una cantidad razonable de microtubérculos (MCT) libres de virus que puedan ser utilizados para producción *ex vitro* de tubérculos semilla sanos.

4.2. Ensayo para la mejora de la microtuberización *in vitro*

Las plantas *in vitro* producen (MCT) de 2 a 10 mm de diámetro cuando se incuban en condiciones adecuadas (Wang & Hu, 1982), y se pueden originar como estructuras aéreas o en el interior del medio (Hussey & Stacey, 1984).

Para poner a punto una metodología de obtención de MCT *in vitro* se realizan diferentes ensayos en los que se introdujeron 8 plantas de cada variedad (Kennebec, Ganade y Cazona) en medios de cultivo preparados con distintas concentraciones de sacarosa, JA, BA y sales. Al cabo de 40 días de iniciado el ensayo, se observa la aparición de los primeros MCT (Ver Imagen 10).

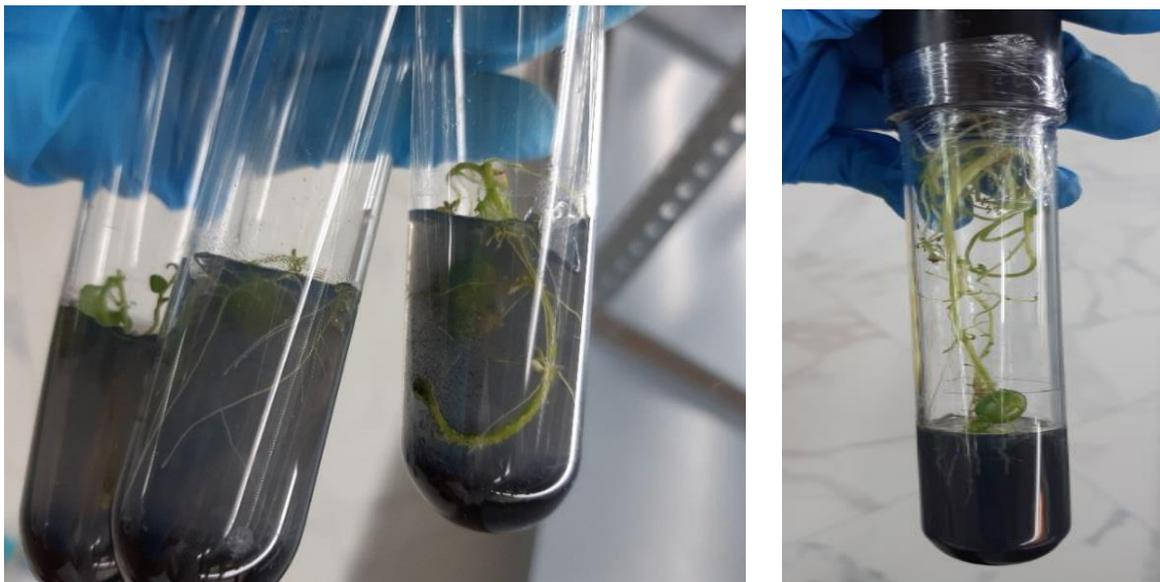


Imagen 10. Izq. MCT crecidos en el medio de cultivo. Drcha. MCT aéreo

Se analizaron las plantas introducidas en los diferentes medios de cultivo observando la presencia o no de MCT tanto aéreos como subterráneos (en el medio), obteniendo los datos recogidos en la Tabla3.

Medio base MS(NO ₃) _{1/2}		var. CAZONA		var. GANADE		var. KENNEBEC	
		% de plantas con MCT	Nº medio de MCT por planta	% de plantas con MCT	Nº medio de MCT por planta	% de plantas con MCT	Nº medio de MCT por planta
[sacarosa]	3%	28,57%	3	0%	0	37,5%	1,67
	6%	71,43%	1	25%	1	100%	1
	8%	100%	1,14	75%	1,3	62,5%	1
[BA] (mg/L)	BA 0'5	37,5%	1	0%	0	20%	1
	BA1	25%	1,5	71,43%	1	16,67%	1
	BA4	0%	0	0%	0	0%	0
[JA] (mg/L)	JA 0'5	0%	0	0%	0	12,5%	1
	JA1 mg/L	37,5%	1,33	14,28%	1	62,5%	1
	JA 1'5	28,57%	1	0%	0	83,33%	1,4
Aumento en 1,5x las [sales]	KNO ₃	0%	0	0%	0	66,67%	1,75
	KH ₂ PO ₄	0%	0	0%	0	40%	1
	CaCl ₂	25%	1	0%	0	83,33%	1,2

Tabla 3. Diseño de experimento de medios para microtuberización de *Solanum tuberosum*, señalando los componentes que varían y sus cantidades añadidas por litro

Analizando los resultados, vemos que no se produce tuberización en todos los medios de cultivo, ni todas las variedades responden igual ante el mismo tratamiento, por lo que puede ser que la tuberización se vea influenciada por el genotipo además de por los componentes del medio de cultivo como también confirman en sus estudios Gopal *et al.* (1998), Ozkaynak y Samanci (2005) y Sharma *et al.* (2011).

Observamos que con 6 y 8 % de sacarosa se obtiene un aumento en el % de plantas que producen MCT, siendo mayor con una concentración de 8% y, además, se produce inducción en todas las variedades. Estos datos concuerdan con los aportados en los estudios de Xu *et al.* (1998), Hussain *et al.* (2006) y Elaleem *et al.* (2015) que también obtienen los mejores datos de inducción de tubérculos *in vitro* en medios suplementados con 8% de sacarosa.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que para las variedades Cazona y Kennebec, a pesar de que el número de plantas que tuberizan a una concentración del 3% de sacarosa es bajo, el número medio de MCT por planta es el más elevado de todos los tratamientos realizados, por lo que no se debe descartar el uso de este medio para estas variedades.

Algunos autores recomiendan el uso de sacarosa sola en alta concentración como un componente barato y buen inductor de la microtuberización (Hussain *et al.* 2006), y por su

doble papel en el desarrollo de los MCT, ya que además de ser una fuente de carbono adecuada y fácilmente asimilable que se convierte en almidón, proporciona una osmolaridad favorable para el desarrollo del MCT (Khuri & Moorby, 1995).

También se obtiene mayor rendimiento en la microtuberización de plantas crecidas con una concentración baja de citoquinina (BA entre 0,5 y 1mg/L). A una concentración de 0,5 mg/L de BA se obtienen bajos porcentajes de tuberización en Cazona y Kennebec, en cambio, la variedad Ganade que no tuberiza con BA0´5 consigue el % más alto de todas con BA1 (71,43%).

Estos resultados se corresponden con los de Montoya *et al.* (2008) que analiza el efecto de la sacarosa y BA obteniendo mejores datos de microtuberización en medios con 8% de sacarosa y 1 mg/L de BA. Por otro lado, Koleva Gudeva *et al.* (2016) utilizó un medio MS suplementado con sacarosa, citoquininas y auxinas consiguiendo resultados positivos con 6% de sacarosa y 4 mg/L de BA, aunque en nuestro caso, a estas concentraciones elevadas de citoquinina no se consiguió la tuberización en ninguna de las variedades. Palmer & Smith (1969) y Gopal *et al.* (1998) observaron también que al suplementar MS con BA se producía un aumento en el número de MCT, y además Gopal *et al.* (1998) concuerda con otros autores en que este aumento era más pronunciado si se aumentaban las horas de oscuridad (Wang & Hu, 1982; Hussey & Stacey, 1984; Gopal *et al.*, 1998) y disminuía la temperatura (Cutter, 1978; Oraby *et al.*, 2015). En futuros ensayos sería interesante comprobar la influencia del fotoperiodo y la temperatura, así como el efecto combinado del aumento del porcentaje de sacarosa unido a la presencia de citoquinina.

En los ensayos con JA0´5 no se consigue inducir la microtuberización en ninguna de las variedades excepto en la usada como control (Kennebec), aunque en un porcentaje muy bajo (12,5 %). Sin embargo, a concentraciones más elevadas de JA se consiguen plantas con MCT en porcentajes bajos en las variedades Ganade y Cazona y muy altos en el caso de la variedad Kennebec, en la que se observa una clara tendencia del % a aumentar a medida que aumenta la concentración de JA. Es posible que el resto de variedades necesiten más tiempo para la tuberización en presencia de JA, por lo que se deberían tomar de nuevo los datos más adelante.

Por último, a pesar de que el aumento de las concentraciones de KNO₃ y CaCl₂ han dado lugar a un porcentaje de plantas con MCT elevado en caso de la variedad control Kennebec, no han dado lugar a la aparición de MCT en las variedades Cazona y Ganade. Sin embargo, se ha observado que la mayoría de las plantas presentan mayor crecimiento, tallos más gruesos y raíces muy ramificadas (Ver Imagen 11), lo que mejora el fenotipo de las plantas mantenidas en el medio de multiplicación, que suelen ser ahiladas y de aspecto débil. Estos resultados

podrían relacionarse con los estudios sobre el crecimiento de las plantas de patata realizados por George & Sherrington (1984) y El-Shobaki & Ibrahim (1997), donde la adición de pantotenato de calcio mejoró el crecimiento y estimuló la proliferación tisular de las plántulas de patata, por lo que el calcio podría ser un factor que influye en el crecimiento y desarrollo de las plantas.



Imagen 11. Plantas de *Solanum tuberosum* en medio $MS(NO_3)_{1/2} KNO_3 1.5X$ con tallo engrosado

4.3 Comparación de la tuberización producida a partir de planta *in vitro* con la obtenida del cultivo de los microtubérculos producidos *in vitro*

Los MCT obtenidos *in vitro* son demasiado pequeños para su transferencia como “semilla de siembra”. Para obtener tubérculos más grandes (minitubérculos, MNT), se realiza un ensayo en el que se compara la producción en invernadero de tubérculos tomando como material partida los MCT obtenidos *in vitro* y la planta obtenida en la micropropagación (Ver Imagen 12).



Imagen 12. Plantas procedentes de micropropagación cultivadas directamente.

En este caso se emplea la variedad Fina de Carballo, por ser plantas control que están libres de virus, ya que partimos de la base de que la presencia de virosis en las plantas de patata reduce la tuberización (Sabry *et al.*, 2009).



Imagen 13. Izq. MCT extraídos de planta *in vitro*. Drch. Planta obtenida del cultivo de MCT tras 5 meses de crecimiento

Los MCT se cultivaron y brotaron dando lugar a plantas verdes, vigorosas y sanas (Imagen 13) que se mantuvieron en invernadero durante 5 meses, al cabo de los cuales se levantaron las plantas para tomar datos sobre la tuberización recogidos en la tabla 4.

	Producción de MNT a partir de MCT	Producción de MNT a partir de plantas <i>in vitro</i>
Nº inicial material vegetal	114	114
% de supervivencia	72,52%	84,25%
Nº medio de MNT	1,37	1,63
Peso medio de MNT(g)	1,03	1,11

Tabla 4. Datos de producción de MNT a partir del cultivo de MCT y de plantas producidas por micropropagación

Observamos que en general el % de supervivencia es alto en ambos casos obteniendo datos similares, aunque ligeramente mayores en las plantas obtenidas del cultivo *in vitro*. Sin embargo, aunque se acercan no son tan altos como el 90% de supervivencia obtenido por Castro *et al.* (2012) en su estudio. Por otro lado, observamos que tampoco concuerdan con los datos aportados por Pérez Alonso (2001), que obtiene un 77,30% de supervivencia de las plantas crecidas de MCT frente a un 57,75% de las plantas de micropropagación cultivadas directamente.

Estos % de supervivencia de los MCT pueden ser debidos a su pequeño tamaño y a la pérdida de masa fresca durante las fases de almacenamiento y aclimatación que afecta a su brotación (Castro *et al.*, 2012).

En el caso de las plantas *in vitro*, normalmente en la etapa de aclimatación se produce una pérdida del 20 -30% de las plantas, ya que muchas no resisten el trasplante y se quedan pequeñas o mueren (Pérez, 1998).

También se observa que los MNT obtenidos a partir de planta son ligeramente más grandes (peso medio de 1,11 g/planta) que los MNT obtenidos de MCT (1,03 g por MCT).

En cuanto al número de MNT producidos, se obtiene una media de 1,37 MNT por MCT frente a 1,63 MNT por planta. Por tanto, aunque la rentabilidad en general es baja, se observa un incremento de MNT obtenidos a partir de plantas *in vitro* frente a los obtenidos a partir de MCT, que junto con una mayor supervivencia hacen de la planta *in vitro* el mejor material de partida para la obtención de MNT. En cualquier caso, en ensayos posteriores, será necesario mejorar tanto el tamaño como el número de MNT obtenidos mediante un manejo adecuado de los abonados.

Estos datos, aunque no son concluyentes, concuerdan con los aportados por Agramonte (1999), que obtiene unos resultados donde las plantas producidas *in vitro* producen mayores cantidades de MNT que los MCT *in vitro*. Por otro lado, Pérez Alonso (2001) no encuentra diferencias significativas en la producción de los MNT por plantas o por MCT y, por último, encontramos estudios en donde los MCT *in vitro* produjeron mayor cantidad de MNT que las plantas *in vitro*, aunque más pequeños Montoya *et al.* (2008).

Quedaría por comprobar si la tuberización de la planta libre de virus es mayor, como cabría esperar, que la de planta infectada. En la bibliografía encontramos el estudio de Sabry *et al.* (2009) que observa que los MCT saneados dan mejores plantas, nº de minitubérculos (MNT), mayor peso medio y rendimiento total que tubérculos infectados por virus en los que las pérdidas son mucho mayores, sobre todo aquellos con PVY. De momento no podemos confirmar los datos aportados por este estudio.

4.4 Comparación del peso medio de los minitubérculos producidos en siembras sucesivas

Los MNT producidos a partir de MCT o planta obtenida *in vitro* siguen siendo demasiado pequeños para su transferencia como “semilla de siembra”, por lo que se procede a su re-cultivo para comprobar si adquieren un tamaño mayor en una segunda cosecha. Al no disponer de MNT de todas las variedades procedentes de los ensayos realizados en este trabajo,

se parte de MNT obtenidos en Cultigar en ensayos anteriores de las variedades Fina, Cazona y Kennebec.

Se emplean 12 MNT de cada una de las 3 variedades de las que tenemos material de partida. Después de 5 meses se recogen datos del % de MNT que producen tubérculos de nuevo, nº medio y peso medio de MNT en cada variedad (ver Tabla 5), y el porcentaje de tubérculos de cada tamaño, clasificados según su peso en pequeños, más parecidos a los MCT (< 0,5 g), medianos (0,5- 2 g) y grandes (> 2 g). (Ver gráfico 2).

	FINA	CAZONA	KENNEBEC
% de MNT (1ª cosecha) que producen MNT (2ª cosecha)	83,33%	100%	100%
Nº medio de MNT (2ª cosecha) por MNT (1ª cosecha)	1,9	2,83	2
Peso medio (g) MNT 1ª cosecha	1,03*	0,92	1,26
Peso medio (g) MNT 2ª cosecha	1,46	1,16	1,29

Tabla 5. Datos de producción de la segunda cosecha de MNT procedentes del re-cultivo de la primera cosecha de MNT. *Peso medio de MNT obtenidos en el ensayo anterior de tuberización, partiendo de MCT *in vitro*

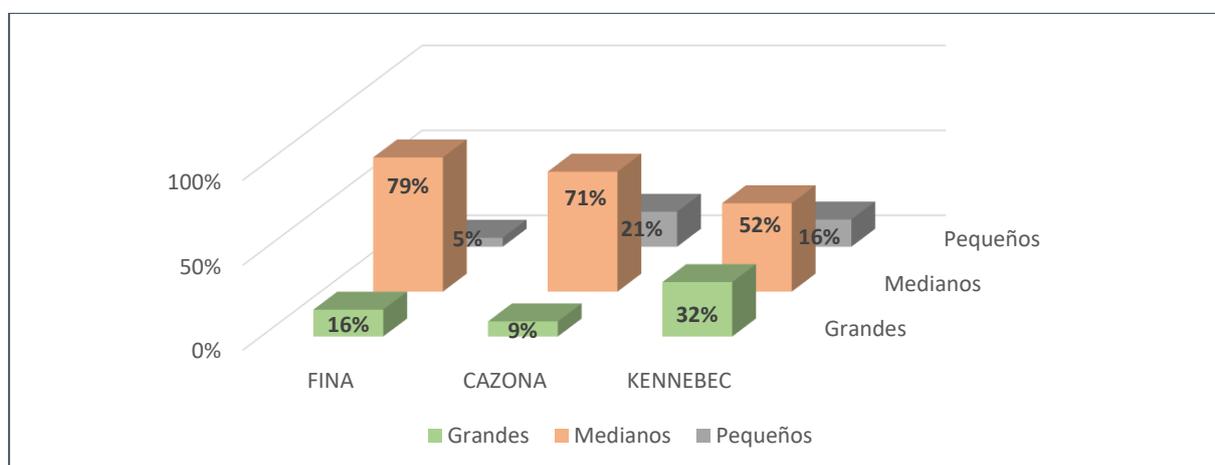


Gráfico 2. Porcentaje de MNT de 2ª cosecha obtenidos, clasificados según su peso. pequeños (< 0,5 g), medianos (0,5- 2 g) y grandes (> 2 g)

Se observa que en las variedades Cazona y Kennebec el 100% de los MNT plantados dan lugar a plantas con alta tasa de supervivencia que producen de nuevo MNT. Por tanto, la aclimatación y las condiciones extrínsecas e intrínsecas de germinación, crecimiento de la planta y tuberización fueron favorables. En cambio, la variedad Fina casi un 17% de los MNT

se secaron sin producir nada, aunque probablemente pudo ser debido a algún problema en las condiciones ambientales, en su manipulación o que seguían siendo demasiado pequeños.

El número medio de MNT de la variedad Cazona es mayor que en las otras 2 variedades, sin embargo, es la que mayor % tiene de MNT de pequeños. Muchos autores concuerdan en que uno de los factores que más influencia el proceso de tuberización es el genotipo (Gopal *et al.*, 1998; Ozkaynak y Samanci, 2005; Sharma *et al.*, 2011).

En general, los MNT de 2ª cosecha tienen un peso mayor que los obtenidos en la 1ª cosecha. Szutkowska (1996) y Mancebo M. A (1999) obtienen en sus estudios unos resultados similares concretando que a medida que se siembran MNT más grandes y pesados aumenta el tamaño y peso de los MNT de 2ª cosecha.

En la Imagen 14 observamos MNT producidos en la 2ª cosecha que tienen un tamaño mayor, lo que los hace más manejables para su distribución y plantación, acortando el ciclo de campo necesario para obtener un tamaño y número adecuado de semilla (Wróbel, 2014; Tapia Figueroa *et al.*, 2017) y, por tanto, son una buena opción para su uso como material pre-base o “semilla de siembra”.



Imagen 14. MNT de gran tamaño que podrían ser utilizados directamente como semilla de siembra

5. CONCLUSIONES

- El medio de multiplicación empleado (MS ½ Ø CA1) para todas las variedades permite su micropropagación *in vitro*, sin embargo, es necesario seguir realizando ensayos para su optimización ya que la respuesta de los diferentes genotipos es diferente empleando el mismo medio de cultivo.
- Se ha conseguido el saneamiento *in vitro* de las variedades Cazona y Ganade aplicando el método de Termoterapia desarrollado en Cultigar en combinación con el cultivo de meristemas. Este método ha sido eficiente en la eliminación de los virus PVX, PVY y PLRV en todas las variedades estudiadas.
- Un aumento de la concentración de sacarosa de entre el 6 y el 8% así como la presencia en el medio de una concentración 1mg/L de citoquinina BA aumenta la capacidad de tuberización de las plantas *in vitro*.
- La variación de las sales CaCl₂ y KNO₃ del medio de cultivo no aumenta la microtuberización, aunque sí que se consigue un engrosamiento del tallo lo que mejora la micropropagación de la planta.
- Aunque no se observan grandes diferencias en el número y peso medio de los minitubérculos producidos por la siembra directa de plantas obtenidas *in vitro* y procedentes del cultivo de microtubérculos, los resultados son ligeramente superiores en el caso de las plantas obtenidas *in vitro*, favoreciendo el uso de estas como material de partida para futuros ensayos de tuberización.
- Se han conseguido minitubérculos en invernadero sin utilizar una fertilización específica para la inducción de la tuberización. Se prevé que, con un manejo adecuado de los nutrientes, el tamaño y el número de los minitubérculos se podrá incrementar.
- Se ha observado una mayor rentabilidad en la producción de tubérculos *ex vitro* al comparar con la tuberización *in vitro*. Se obtienen mayor número de tubérculos por planta y mayor cantidad de plantas que tuberizan. Aunque en ninguno de los casos se puede decir que la producción ha sido eficiente ya que el número de tubérculos producido es bajo.
- La re-siembra de minitubérculos en las mismas condiciones que las de la 1ª siembra, permite incrementar el tamaño y peso de los minitubérculos en invernadero.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, M. & Ahmad, W. (1995). Detection of major potato viruses from different potato growing localities of Punjab. *Natl Sem. On Research and Development in Potato Production in Pakistan PSPDP/APC*.
- Agramonte, D. (1999) Métodos biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Tesis para aspirar al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba*.
- Ali, M., Nasiruddin, M., Haque M. & Faisal, S. (2014). Virus elimination in potato through meristem culture followed by thermotherapy. *SAARC Journal of Agriculture*. 11 (1): 71–80.
- Anjum, R., Khan, M., Olawale, K. & Baber, R. (2017). Field evaluation and enzyme-linked immunosorbent assay detection of potato leaf roll virus, potato virus X and potato virus Y in potato germplasm. *Journal of Agricultural Science* 9 (7): 229.
- Barrell, J. P., Meiyalaghan, S., Jacobs, J. M. E. & Conner, A. J. (2013). Applications of biotechnology and genomics in potato improvement. *Plant Biotech J*. 11:907-920.
- Beck, C. B. (2010). An introduction to plant structure and development. *Cambridge University Press. ISBN-13 978-0-511-77022-7*
- Castro, J., Agramonte, D., Alvarado-Capó, Y., de Fera, M. & Pugh, T. (2012) Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. *Biotecnología Vegetal* 12(1): 3-24.
- Coleman, K.W., Danielle, J.D. & Coleman, S.E. (2001). Potato microtuber as research tools: A Review. *Am J Potato Res.* (78): 47-55.
- Cutter, E. G. (1978) Structure and development of the potato plant. *En: JD Ivins, FL Milthorpe (Eds.). The Growth of the Potato, pp. 99–113*.
- Dhital, S.P., Lim, H.T. & Sharma, B.P. (2008). Electrotherapy and chemotherapy for eliminating double-infected potato virus (PLRV and PVY) from *in vitro* plantlets of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Hortic. Environ. Biotechnol.*, (49): 52-27.
- Dobránszki, J., Katali, M-T. & Ildikó, H. (2008) *In vitro* tuberization in hormone-free systems on solidified medium and dormancy of potato microtubers. *En: Benkeblia N, Tennant P (Eds) Potato I. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology, pp. 82-94*.
- El-Shobaky, S.A. & Ibrahim, I.A. (1997). Effect of silver thiosulphate and indole butyric acid on potato growth through tissue culture techniques. *Zagazig J. Agric. Res.*, 24: 661-673.

- Emami, M., Mozafari, J., Babaeiyan, N. & Rahimian, H. (2011). Application of electrotherapy for the elimination of potato potyviruses. *Journal of Agricultural Science and Technology* (13): 921–927.
- España. Real Decreto 27/2016, por el que se aprueba el Reglamento técnico de control y certificación de patata de siembra. *Boletín Oficial del Estado*, 30 de enero de 2016, núm.26, pp 8081-8094.
- Fufa, M. & Diro, M. (2014). Microtuber induction of two potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. *Adv Crop Sci Tech* 2: 122.
- Garner, N. & Blake, J. (1989). The induction and development of potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. *Ann. Bot.* 63: 663-674.
- George, E.F. & Sherrington, P.D. (1984). Plant propagation by tissue culture. *Exigeties Ltd, England*.
- Giletto, C. M. (2002). Comparación de métodos para evaluar la nutrición nitrogenada en papa. *Tesis presentada como requisito para optar por el grado de Magister Scientiae en el programa de Postgrado en Producción Vegetal. Fac. Ciencias Agrarias. UNMP. Pp 74*.
- Gopal, J. L., Minocha, H.S. & Dhaliwa, L. (1998). Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Reports* 17: 794–798.
- Hoque, M. E. (2010) *In vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Omics Journal* 3(1): 7-11.
- Hussain, I., Chaudhry, Z., Muhammad, A., Asghar, R., Naqvi, S. M. S. & Rashid, H. (2006). Effect of chlorocholine chloride, sucrose and BAP on *In vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L. cv. *Cardinal*). *Pak. J. Bot.*, 38(2), 275-282.
- Hussey, G. & Stacey, N.J. (1984): Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany* 53:565-572.
- Jeong, J., Ju, H. & Noh, J. (2014). A review of detection methods for the plant viruses. *Research in Plant Disease* 20 (3): 173–181.
- Kämäräinen-Karppinen T, Virtanen E, Rokka VM, Pirttilä A (2010) Novel bioreactor technology for mass propagation of potato microtubers. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 101(2):245–249
- Khuri, S. & Moorby, J. (1995). Investigations into the roles of sucrose in potato cv. Estima microtuber production *in vitro*. *Annals of Botany* 75: 295-303.
- Kitajima, E.W., de Ávila, A.C. & Resende, R.O. (1997). Taxonomia de vírus de plantas. *Fitopatologia Brasileira*, v.22, p.5-24.

- Koleva Gudeva, L., Trajkova, F. & Stojkova, I. (2016). The effect of plant growth regulators and sucrose on microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Romanian agricultural research*, No.33.
- Krauss, A. & Marschner, H. (1982). Influence of nitrogen: day length and temperature on contents of gibberellic and abscisic acid and on tuberization in potato plants. *Potato Res.* 25, 13–21.
- Kushnarenko, S., Romadanova, N. & Aralbayeva, M. (2017). Combined ribavirin treatment and cryotherapy for efficient Potato virus M and Potato virus S eradication in potato (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* shoots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant* 53: 425–432.
- Levy, D., Coleman, W. & Veilleux, R. (2013). Adaptation of Potato to Water Shortage: Irrigation Management and Enhancement of Tolerance to Drought and Salinity. *Amer. J. Potato. Res.*, 90: 186-206.
- Love, S. L., Stark, J. C. & Saliz, T. (2005). Response of four potato cultivars to rate and timing of nitrogen fertilizer. *Am J of Potato Research. Vol. 82 (1): 21–30.*
- Mancebo, M. A (1999). Efecto del tamaño del minitubérculo de papa (*Solanum tuberosum* L.) de segunda generación, Var. Atlantic, en el rendimiento de minitubérculo de tercera generación bajo microtúneles. *Tesis Universidad Autónoma Nuevo León. 106 pp*
- Mellor, F. (1987). Virus-free potatoes through meristem culture. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 3: 1–2.
- Meneses, L., & Morillo, E. (2017). Estado actual de la indexación por medios biotecnológicos de variedades comerciales y nativas de papa en el INIAP. *VII Congreso Ecuatoriano de la Papa: Memorias. 63-65 pp.*
- Moeinil, M. J., Armin, M., Asgharipour, M. R. & Yazdi, S. K. (2011). Effects of different plant growth regulators and potting mixes on micro-propagation and minituberization of potato plantlets. *Adv. Environ. Bio.*, 5 (4): 631-638.
- Montoya, N., Castro, D., Díaz, J. & Ríos, D. (2008) Tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.), variedad Diacol Capiro, en Biorreactores de Inmersión Temporal y evaluación de su comportamiento en campo. *CIENCIA* 16(3): 288 – 295.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* (15):473-497.
- Naik, P.S. & Karihaloo, J.L. (2007). Micropropagation for Production of Quality Potato Seed in Asia-Pacific. *Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology, NewDelhi, India. 54 P.*

- Nascimento, L. C. G., Pio-Riberio, L., Willadino, G. P. & Andrade, (2003). Stock indexing and Potato Virus Y elimination from potato plants cultivated *in vitro*. *Scientia Agricola* 60: 525-530.
- Nukari, A., Uosukainen, M. & Rokka, V. M. (2009). Cryopreservation techniques and their application in vegetatively propagated crop plants in Finland. *Agricultural and Food Science* 18: 117-128.
- Oraby, H., Lachance, A. & Desjardins, Y. (2015): A low nutrient solution temperature and the application of stress treatments increase potato mini-tubers production in an aeroponic system. *American Journal of Potato Research*, 92: 387–397.
- Palmer, C. E. & Smith, O. E. (1969). Cytokinins and tuber initiation in the potato *Solanum tuberosum* L. *Nature* 221: 279–280.
- Pérez Alonso, N. V. (2001). Empleo de los sistemas de inmersión temporal para la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Tesis Universidad de las Villas, Santa Clara*. 66 pp.
- Pérez, J. (1998). Propagación y mejora de plantas por biotecnología. *Informe IBP, UCLV. Santa Clara. Cuba*.
- Rafique, T., Jafar, M. I., Hasnain, J. & Abbas, M. (2004) *In vitro* studies on microtuber Induction in potato. *Int. J. Agri. Biol.* 6 (2): 6.
- Rahman, M. Z., Shahinul Islam, S. M., Chowdhury, A. N. & Subramaniam, S. (2015). Efficient microtuber production in modified nutrient spray bioreactor system. *Scientia Horticulturae* 192: 369-374.
- Robert, Y., Woodford, J.A.T. & Ducray-Bourdin, D.G. (2000). Some epidemiological approaches to the control of aphid-borne virus diseases in seed potato crops in Northern Europe. *J. Virus Res.*, 71: 33-47.
- Sabry, Y.M., Mahmoud, Hossey, M. H. & Abdel-Ghaffar, M. H. (2009). Evaluation of Some Therapies to Eliminate Potato Y Potyvirus from Potato Plants. *International Journal of Virology. Vol. 5 (2): 64-76*
- Sakha, B. M., Rai, G. P., Dhital, S. P. & Ram, B. (2007). Disease-free Pre-Basic Seed Potato Production through Tissue Culture in Nepal. *Nepal Agric. Res. J. Vol 8*.
- Sarkar, D. (2008) The signal transduction pathways controlling in planta tuberization in potato: an emerging synthesis. *Plant Cell Rep* 27: 1-8.
- Scherwinski, P. & Luces, G. R. (2004) Organogênese de ápices meristemáticos de batata em meios de isolamento e multiplicação *in vitro*. *Horticultura Brasileira* 22(2): 197-201.

- Sharma, S., Venkatasalam, E. P., Patial, R., Latawa, J. & Singh, S. (2011) Influence of gelling agents and nodes on the growth of potato microplant. *Potato J.* 38(1): 41-46.
- Singh, B. (2015). Effect of antiviral chemicals on *in vitro* regeneration response and production of PLRV-free plants of potato. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 18 (5): 341–348.
- Singh, B. & Kaur, A. (2016). *In vitro* production of PLRV and PSTVd-free plants of potato using electrotherapy. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 19 (4): 285–294.
- Smith, O. E. & Rappaport, L. (1969). Gibberellins, inhibitors, and tuber formation in the potato (*Solanum tuberosum* L.). *Am Potato J* 46: 185–191.
- Sturz, A.V., Stewart, J.G., McRae, K.B., Diamond, J.F., Lu, X. & Singh, R.P. (2000). Assessment of the importance of seed cutting, in-season cultivation and the passage of row equipment in the spread of PVY^o in potatoes. *Can. J. Plant Pathol.*, 22: 166-173.
- Suárez, L., Giletto, C. M., Rattín, J., Echeverría, H. & Caldiz, D. (2006). Efecto del nitrógeno sobre el rendimiento y la calidad de tubérculos en papa para industria. *Unidad Integrada INTA-FCA Balcarce. UNMdP.*
- Szutkowska, M. (1996). Response of Plants Grown from Various Size Minitubers and From Traditional Seed Tubers to Density of Planting. *Biuletyn Instytutu Ziemiaka. No. 47, 65-76.*
- Taj Khan, R., Murtaza, G., Abbas, S. R., Hussain, I., Abbas, M. R. & Batool, A. (2013). Virus Elimination, *in vitro* response and colonel multiplication Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Natural Sciences. JNS* 1(1): 1-13 (2013)
- Tapia Figueroa, M. L., Lorenzo, J. C., Mosqueda, O. & Escalona, M. (2017). Obtención de microtubérculos y minitubérculos como semilla pre-básica en tres cultivares peruanos de papa. *Bioteconología Vegetal. Vol. 17, No. 3: 161 – 169.*
- Valenzuela- Herrera, V., Redondo Juárez, E. & Bujanos Muñiz, R. (2003). Detección de Virus por Serología y Plantas Indicadoras en el Tubérculo-Semilla y Plantas de Cultivo de Meristemas en Papa (*Solanum tuberosum* L.) var. Alfa. *Revista Mexicana de Fitopatología, vol. 21 (2), pp. 176-180*
- Wang, P. & Hu, C. (1982). *In vitro* mass tuberization and virus free seed potato production in Taiwan. *Am Potato J* 59:33–37.
- Wang, Q., Panis, B., Engelmann, F., Lambardi, M. & Valkonen, J. P. T. (2009). Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen elimination to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. *Annals of Applied Biology* 154: 351363.

- Wang, Q. & Valkonen, J. P. T. (2009). Improved recovery of cryotherapy- treated shoot tips following thermotherapy of *in vitro*- grown stock shoots of raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Cryoletters* 30: 171-182.
- Wróbel, S. (2014). Assessment of possibilities of microtuber and *in vitro* plantlet seed multiplication in field conditions. Part 1: PVY, PVM and PLRV Spreading. *American Journal of Potato Research*, 91: 554–565.
- Xu, X., Van Lammeren, A. A. M., Vermeer, E. & Vreugdenhil, D. (1998) The Role of Gibberellin, Abscisic Acid, and Sucrose in the Regulation of Potato Tuber Formation in Vitro. *Plant Physiol. Vol. 117*.
- Younes, N. A., El-Sheikh Aly, M. M. & Aboul-Nasr, M. H. (2014). Heat and freezing pre-thermal treatments as a means of freeing potatoes from mosaic virus and its effects on potato plants quality characters. *Journal of Phytopathology and Pest Management* 1 (2): 44-52.
- Zaman, M.S., Quershi, A., Hassan, G., Din, R.U., Ali, S., Khabir, A. & Gul, N. (2001). Meristem Culture of Potato (*Solanum tubersum* L.) for Production of Virus Free Plantlets. *Online J. Bio. Sci.*, 1: 898-899.