

Curso 2006/07
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/10
I.S.B.N.: 978-84-7756-746-2

MARGARITA RAVELO ARMAS

**Saneamiento y multiplicación
de las variedades canarias de papa borralla,
mora y terrenta**

Directores

**FRANCISCO VALDÉS GONZÁLEZ
BLANCA RODRÍGUEZ MÉNDEZ
PABLO LUNELLO**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

A mis padres,

A Omar,

A mi hijo/a

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que por su inestimable colaboración me han permitido realizar este trabajo.

A todos los componentes del Departamento de Biología Vegetal (U.D.I. Fisiología Vegetal), con mención especial hacia mis directores Dr. Francisco Valdés y Dra. Blanca Rodríguez y a mis compañeros de laboratorio, en especial a Emma, Anselmo y Magüi por la ayuda prestada a lo largo de este trabajo y el gran apoyo moral.

A todos los componentes del Instituto Biotecnológico de la Universidad Agraria La Molina (Lima, Perú) en especial a Mg. Lourdes Tapia y a los compañeros de laboratorio que contribuyeron a mi formación en el campo de la Biotecnología, en especial a Alejandro, Beto, Melisa y Eliana.

A los miembros de los Departamentos de Virología y Cultivo de Tejidos del Centro Internacional de la Papa (CIP, Perú) a quienes debo agradecer en gran medida la formación adquirida en lo que a la Conservación de los Recursos Filogenéticos Agrícolas se refiere, en especial al Dr. Luis Salazar, Dr. William Roca y Lcda. Ana Panta y a todos los compañeros que me brindaron su ayuda y apoyo durante mi estancia en este centro.

Al Departamento de Virología del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Madrid), que me brindaron la oportunidad de poder realizar parte de este trabajo, en especial a mi director Dr. Pablo Lunello, al director del grupo de trabajo Dr. Fernando Ponz y a los compañeros del laboratorio que hicieron que mi estancia fuera tan agradable.

Finalmente quiero expresar mi agradecimiento a mi amigo Gustavo sin cuya inestimable ayuda mi paso por la bioestadística seguro hubiera sido más

amargo y a mi amiga Carmela que con sus risas y alegrías en este departamento ha hecho que realizar este trabajo sea tan gratificante.

A todos ¡Muchas Gracias!

INDICE

INDICE

CAPÍTULO I	
I Antecedentes y Objetivos	1
CAPÍTULO II	
II Introducción	11
II.1 Antecedentes Histórico	11
II.1.1 Origen del cultivo de la papa y su llegada al continente Europeo	11
II.1.2 Estado actual del cultivo	16
II.1.3 Llegada de la papa a Canarias y su evolución en las islas	19
II.1.4 Distribución actual del cultivo en la isla de Tenerife	24
II.1.5 Variedades cultivadas en Canarias	26
II.2 Taxonomía y descripción morfológica	29
II.2.1 Taxonomía	29
II.2.2 Descripción morfológica general de la planta de la papa	32
II.2.3 Descripción de las variedades en estudio	37
II.2.3.1 Variedad Mora	37
II.2.3.2 Variedad Borralla	38
II.2.3.3 Variedad Tormenta	40
CAPÍTULO III	
III Establecimiento y multiplicación <i>in vitro</i>	42
III.1 Fase de Establecimiento	42
III.1.1 Material	42
III.1.2 Metodología	42
III.1.2.1 Esterilización del material vegetal	43
III.1.2.2 Esterilización de útiles y materiales	46
III.1.2.3 El Medio de cultivo	47
III.1.2.3.1 Composición del medio de cultivo	47
III.1.2.3.2 El pH del medio de cultivo	51
III.1.2.3.3 Preparación del medio de cultivo	51
III.1.2.4 Siembra	54
III.1.2.5 Condiciones de incubación de los cultivos	55
III.1.3 Resultados de la fase de establecimiento	56
III.1.3.1 Análisis y discusión de los resultados de los protocolos de esterilización	56
III.1.3.2 Análisis y discusión de los resultados de la inducción del cultivo	60
III.2 Fase de Multiplicación	67
III.2.1 Material	67
III.2.2 Metodología	67
III.2.2.1 Multiplicación en medio sólido	68
III.2.2.2 Multiplicación en medio líquido	68
III.2.3 Resultados de la fase de multiplicación	69
III.2.3.1 Análisis y discusión de los resultados de la fase de multiplicación en medio sólido	69

III.2.3.2 Análisis y discusión de los resultados de la fase de multiplicación en medio líquido	72
--	----

CAPÍTULO IV

IV Evaluación de la carga vírica	79
IV.1 Introducción	79
IV 1.1 Naturaleza y características de los virus de plantas	80
IV 1.2 Transmisión, infección, replicación y manifestación de síntomas	81
IV.1.2.1. Formas de transmisión de los virus en papa	82
IV.1.2.2. Tipos de transmisión de virus	84
IV 1.3 Nomenclatura y Clasificación	85
IV.2 Virus que afectan al cultivo de la papa	86
IV 2.1. Descripción de los virus objeto de evaluación	89
IV.2.1.1. Potato leafroll virus (PLRV). Grupo Luteovirus	89
IV 2.1.2. Potato virus Y (PVY). Grupo Potyvirus	93
IV 2.1.3. Potato virus X (PVX). Grupo Potexvirus	102
IV 2.1.4. Potato virus A (PVA). Grupo Potyvirus	106
IV 2.1.5. Potato virus M (PVM) . Grupo Carlavirus	109
IV 2.1.6. Potato virus S (PVS). Grupo Carlavirus	113
IV.3 Técnicas de diagnóstico	116
IV.3.1 Ensayos inmunológicos (DAS-ELISA)	116
IV.3.1.1 Material	117
IV.3.1.2 Metodología	117
IV.3.1.2 Resultados análisis DAS-ELISA	121
IV.3.2 Técnicas de RT-PCR	127
IV.3.2.1 Introducción	127
IV.3.2.2. Material	128
IV.3.2.3 Metodología	128
IV.3.2.4. Resultados y discusión	132

CAPÍTULO V

V Caracterización molecular	151
V.1 Introducción	151
V.2 Material	152
V.3 Metodología	153
V.4 Resultados y discusión	156

CAPÍTULO VI

VI Termoterapia y Cultivo de Meristemos	
VI.1 La Termoterapia. Generalidades	165
VI.2 El cultivo de Meristemos. Generalidades	167
VI.3 Material	168
VI.4 Metodología	169
VI.5 Resultados y discusión	171
V.5.1 Resultados y discusión del tratamiento de Termoterapia	171
V.5.2 Resultados y discusión del cultivo de meristemos y análisis DAS-ELISA	173

CAPÍTULO VII	
VII Conclusiones	184
ANEXOS	187
ANEXO 0	187
ANEXO I	189
ANEXO II	190
ANEXO III	192
ANEXO IV	194
ANEXO V	196
ANEXO VI	197
ANEXO VII	198
ANEXO VIII	199
ANEXO IX	205
ANEXO TABLAS	206
ANEXO FIGURAS	207
BIBIOGRAFIA	

CAPÍTULO I
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

I. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

I.1 ANTECEDENTES

Desde la aparición de la vida en la Tierra hace unos 3.000 millones de años, el proceso evolutivo ha originado una enorme diversidad de especies e individuos que mediante los procesos de selección permanente se han adaptado a las diferentes condiciones del globo. Esta variabilidad genética acumulada resulta esencial para el equilibrio del sistema y constituye lo que se denomina germoplasma del planeta. Dentro de este conjunto, los "recursos fitogenéticos" comprenden la diversidad genética correspondiente al mundo vegetal que se considera poseedora de un valor para el presente o el futuro.

Bajo esta definición se incluyen normalmente las categorías siguientes: variedades de especies cultivadas, tanto tradicionales como comerciales; especies silvestres o asilvestradas afines a las cultivadas o con un valor actual o potencial, y materiales obtenidos en trabajos de mejora genética. Los recursos fitogenéticos constituyen un patrimonio de la humanidad de valor incalculable y su pérdida es un proceso irreversible que supone una grave amenaza para la estabilidad de los ecosistemas, el desarrollo agrícola y la seguridad alimentaria del mundo.

Con la aparición de la agricultura hace unos 10.000 años el hombre empieza a intervenir de forma decisiva la evolución natural de las plantas que cultiva, dando lugar al proceso conocido como "domesticación". Las poblaciones de plantas cultivadas empiezan a sufrir fuertes presiones selectivas debidas a las prácticas agrícolas, siendo el resultado la aparición de características morfológicas y fisiológicas peculiares como pueden ser el gigantismo en los frutos, el aumento de la producción, la reducción de la dehiscencia de las semillas, la germinación rápida y uniforme o la pérdida de capacidad de competir con la vegetación natural. Los cultivos primitivos se fueron extendiendo desde sus lugares de origen, transportados por migraciones primero y rutas comerciales después, encontrándose condiciones diversas de clima, suelo, vegetación y otros factores ambientales.

De esta forma, las poblaciones de plantas cultivadas evolucionaron de forma diferente según las características de las nuevas zonas y las distintas prácticas agrícolas utilizadas y, en numerosos casos, se produjeron intercambios de genes o formación de híbridos con las especies silvestres de las nuevas localidades. El resultado de la acción del hombre y la selección natural a lo largo de miles de años sobre las miles de especies utilizadas a lo largo de la historia de la humanidad, ha sido el establecimiento de una diversidad vegetal constituida por un enorme número de variedades y genotipos locales, caracterizados por su adaptación a las necesidades humanas y al medio ambiente.

Hasta fechas relativamente recientes la diversidad de las plantas cultivadas se ha mantenido y ha ido incrementado de forma eficaz en los ecosistemas agrarios. Sin embargo, desde hace 200 años, como consecuencia del desarrollo agrícola e industrial y la progresiva unificación de hábitos culturales y alimenticios, el número de cultivos y la heterogeneidad dentro de los mismos han ido descendiendo progresivamente y, en la actualidad, el 90% de la alimentación mundial está basada en sólo unas 30 especies vegetales y unas docenas de variedades. La pérdida de diversidad se acentuó entre los años 1940-50 cuando el desarrollo de la mejora genética dio lugar a la introducción de variedades comerciales, uniformes y mucho más adaptadas a las técnicas modernas de cultivo y a los nuevos sistemas de comercialización, siendo incuestionable el beneficio obtenido de ello por una población mundial creciente y subalimentada.

Sin embargo, como contrapartida, las variedades modernas, con una base genética muy reducida, han ido desplazando a innumerables variedades tradicionales, heterogéneas y menos productivas, pero altamente adaptadas a su ambiente local y poseedoras de una gran diversidad genética. La consecuencia paradójica es que la aplicación masiva de los logros de la mejora vegetal ha puesto en marcha un proceso que destruye los materiales esenciales de abastecimiento de los propios fitomejoradores. El problema de la erosión genética de las variedades locales se ve agravado, además, por la desaparición de especies y formas silvestres de las plantas cultivadas debida a procesos como la deforestación masiva o la degradación y contaminación de

los habitats naturales que, en definitiva, no son sino resultados de la explotación abusiva de los recursos del planeta.

La pérdida de variabilidad genética supone una limitación de la capacidad de responder a nuevas necesidades y un incremento de la vulnerabilidad de nuestros cultivos frente a cambios ambientales o aparición de nuevas plagas o enfermedades. El reconocimiento de la erosión genética como un problema grave tiene lugar en los años 50, cuando el desarrollo agrícola empieza a alcanzar a las regiones del planeta con mayor diversidad genética, siendo en este momento cuando se empiezan a poner en marcha medidas globales para preservar los recursos fitogenéticos.

Si hubiera que poner algún evento significativo en el que enmarcar este punto de inflexión, esta es sin duda la Conferencia Mundial de la FAO de 1983 que acordó establecer el llamado **Sistema Mundial para la Conservación y Uso Sostenible de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura**. Las conclusiones de esta Conferencia Internacional no solo deparó el **Compromiso Internacional de Recursos Fitogenéticos**, también significó el relanzamiento de la **Comisión de Recurso Genéticos para la Alimentación y la Agricultura**, y el diseño del aún incipiente **Fondo Internacional para Recursos Genéticos**.

La FAO llega por este camino a la consagración de esta línea de trabajo con la 4ª Conferencia Técnica sobre Recursos Fitogenéticos, celebrada en Alemania en 1996. En esta ocasión, 150 países aprobaron el Plan de Acción Mundial de la FAO, que establece las bases para una actuación racional, coordinada y eficaz en el ámbito de la conservación y empleo de los recursos fitogenéticos. Dentro del esquema auspiciado por la FAO se mueve el IPGRI; este organismo toma el relevo del *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR) como grupo integrante del *Consultative Group on International Agricultural Research* (CGIAR), encargándose de organizar y financiar expediciones de recolección, propiciar reuniones de expertos y editar publicaciones sobre los recursos fitogenéticos, asesorar, e incluso ayudar económicamente al establecimiento de programas de almacenamiento *ex situ*. Este organismo está constituido por una docena de Centros Internacionales dedicados a la investigación y al mantenimiento de

colecciones de recursos fitogenéticos y conforman un entramado conocido como Red Internacional de Colecciones ex situ (CIMMYT, IRRI, CIAT, INTA, ICARDA, CIP, ICRISAT, etc.). El IPGRI se ha estructurado en cinco grupos zonales, interesándole al presente proyecto una especial colaboración con el Grupo Europeo, dado que es el encargado de coordinar el Programa Cooperativo Europeo para Recursos Genéticos (ECP/GR) y de cuya experiencia (está operativo de 1980) se espera obtener ayuda. Este Programa tiene establecido diferentes grupos de trabajo y redes temáticas (red específica de documentación y cooperación técnica sobre conservación *in situ*, redes específicas de cultivos: cereales, forrajeras, hortícolas, leguminosas, frutales, etc.).

En lo que respecta a nuestro país, las primeras expediciones de recolección se dan en los setenta y la iniciativa corre a cargo del Instituto Nacional de Investigación Agrarias (INIA), si bien ya anteriormente se habían realizado expediciones y por tanto antes de esa fecha existían importantes colecciones de germoplasma, la mayoría en manos de científicos o de mejoradores (estas últimas más dinámicas y por tanto con menor énfasis en la protección). Hay que esperar la entrada de la década de los noventa (concretamente 1992) para que la conservación de germoplasma en España adquiera la importancia que se merece. Así, a partir de esa fecha estas actividades sufren un impulso importante gracias a la creación del Programa de Conservación y Utilización de Recursos Fitogenéticos, diseñado por el Ministerio de Agricultura (BOE 7 de mayo de 1992, Orden Ministerial de 23 de abril). Este programa se estructura en Planes Cuatrienales y sus objetivos definidos serían: *impulsar y mejorar las actividades de conservación, caracterización, documentación y utilización de los recursos genéticos vegetales potencialmente útiles para el sector español.*

Este programa se hace tangible mediante la ayuda a actividades permanentes y a proyectos de actividades I + D en conservación y utilización de recursos fitogenéticos. Las colecciones de germoplasma de este programa configuran la Red Estatal de Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación, y son mantenidas, de acuerdo a las normas FAO, principalmente en instituciones como son: INIA (Centro de Recursos Fitogenéticos, CRF),

Servicio de Investigaciones Agrarias de Extremadura, Servicio de Investigaciones Agrarias de Zaragoza, Universidad Politécnica de Valencia, o de la Universidad Politécnica de Madrid, entre otros.

En lo que a Canarias se refiere de acuerdo con los especialistas en etnobotánica del Archipiélago, nuestros recursos fitogenéticos se encuentran en su gran mayoría sin estudiar (Dr. Rodríguez, comunicación personal) y lo poco que hay está muy disperso y muchas veces mal catalogado, sin sanear y sin caracterizar.

Habría que indagar en las colecciones existentes, el material que se reseña como recogido en las Islas. Sin embargo no todo está por hacer; como ya hemos señalado, en el CRFN posee material canario conservado, procediendo éste de las campañas que el INIA ha venido realizando a nivel Nacional. Así, ya por los años treinta, hay constancia de recolección de cereales, en los años setenta hubo campañas de recolección por parte del Ministerio de Agricultura, también se tiene constancia de campañas llevadas a cabo por equipos de la Politécnica de Valencia (años ochenta), o las recolecciones de plantas Hortícolas realizadas por equipos como el del Dr. de la Nuez (Universidad Politécnica de Valencia).

En cuanto a la labor en este campo realizado por instituciones o grupo de investigación canarios, vemos que existe un número en nada despreciable de estudios que abordan la biodiversidad agrícola de la Región. Sin embargo, la mayoría se circunscribe al campo de la etnobotánica, y en los pocos casos en que ha existido un impulso conservador este ha sido más inherente a un espíritu voluntarista, carente en todo caso de los criterios científicos de uso obligado por los organismos especializados. Bate como ejemplo la ausencia de programas de saneamiento, caracterización genética o de valoración agronómica o nutricional. Por lo que en muchos casos nos encontramos con almacenes caóticos y deficientes de colecciones plagadas de entradas cuya principal diferencia estriba en la diferente denominación que nuestros agricultores dan a un germoplasma que ha perdido buena parte del bagaje cultural que se generó junto a él.

Cómo estamos ante este panorama, aterrador para los especialistas en el mundo agrícola, es difícil de entender. Ya que, no solo la alarma desatada

por la pérdida de biodiversidad ha permitido a nuestros gestores sociales poner freno a este declive, los propios estudios de las Instituciones implicadas apuntan a este fenómeno como alarmante, es más, los análisis por ellos realizados así lo demuestran (Análisis DAFO presentado en el PIC INTERREG-III B Canarias, Azores-Madeira; Anexo 0).

La biotecnología moderna nos ofrece herramientas y enfoques poderosos para el estudio y análisis de nuestra riqueza fitogenética con implicaciones trascendentales en la conservación y la utilización de estos recursos. Los marcadores moleculares primero, y luego las tecnologías genómicas ofrecen mecanismos para racionalizar las colecciones de germoplasma y para desarrollar nuevas estrategias de conservación y rescate. Desde la identificación de accesiones duplicadas en colecciones clonales, pasando por estudios de diversidad genética, hasta planear mecanismos para interrelacionar la conservación de diversidad por agricultores y campesinos con las colecciones bien ensambladas en bancos de germoplasma; y recientemente la aplicación de tecnologías genómicas, facilitan el análisis masivo de germoplasma para relacionar la expresión génica con la estructura, fisiología y ecología de poblaciones de materiales silvestres y cultivados.

Así, gracias a las técnicas de cultivo in vitro de tejidos vegetales, muchos países en vías de desarrollo están abordando programas de conservación de germoplasma tanto de especies silvestres como agrícolas, en aras de proteger y conservar su biodiversidad. Estas técnicas son imprescindibles hoy en día para garantizar la conservación de germoplasma de aquellos cultivos que bien por problemas de infertilidad o por una excesiva heterogeneidad genética precisan de su conservación en estadios vegetativos, entre estos cultivos se encuentran numerosas variedades de *S. tuberosum* (Withers, 1985; Kuo, 1991; Iriondo y Pita, 1991; Dodds, 1991; Ashmore, 1997).

Actualmente el cultivo de tejidos vegetales in vitro permite, la propagación clonal de un gran número de plantas en un periodo de tiempo breve, la aplicación rápida y eficaz de protocolos de saneamiento, y la conservación de germoplasma de especies vegetales; todo ello bajo condiciones controladas, en espacios pequeños y con poca mano de obra. Así,

en la actualidad, en los países productores de papa de semilla, la obtienen mediante el empleo de estas técnicas.

En los últimos años, los países en vías de desarrollo han encontrado en el empleo de esta tecnología, una poderosa herramienta para mejorar sus sistemas agrarios, como queda reflejado en el informe *Biotechnologies in developing countries: present and future*, realizado por el microbiólogo francés Dr. Albert Sasson (Sasson, 1993) para las Naciones Unidas. Esta iniciativa está permitiendo a sus sistemas agrarios incorporar cultivos constituidos por individuos de *elite* o nuevos cultivares seleccionados previamente por sus características de producción, estacionalidad, calidad, resistencia a patógenos, inclemencias o enfermedades (Sasson, 1993; Izquierdo *et al.*, 1995).

A modo de ejemplo, en el área de países en vías de desarrollo de América Latina y el caribe, bajo el paraguas de la *Red de Cooperación Técnica en Biotecnología Vegetal* (conocida como REDBIO) red impulsada por la *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación* (FAO), se están produciendo abundante material seleccionado y libre de enfermedades mediante su multiplicación y saneamiento por micropropagación dentro de programas de producción de semillas, plantas o bien en acciones dirigidas a la selección y mejoramiento de los cultivares. Tanto es así, que en todo el área se ha generado el término de *Biotecnología Apropiable* para designar la adaptación de las citadas técnicas al agricultor (Sasson, 1993; Izquierdo *et al.*, 1995).

En lo que a la conservación de Recursos Fitogenéticos Agrícolas en las Islas se refiere, como ya señalamos, nos encontramos ante una realidad alarmante. Como consecuencia de la escasa atención prestada a este campo por instituciones gubernamentales y comunidad científica, sin menos preciar los trabajos más reciente que han contribuido, principalmente, a poner en conocimiento la decadencia existente (Rodríguez, 1986 y 1992; Bello, 1991; Marrero, 1992; Hawkes y Ortega, 1992 y 1993; Gil, 1997; Gil *et al.*; 2000; entre otros).

Respecto de la papa, únicamente se ha llevado a cabo trabajos de etnobotánica y de recolección de germoplasma sin criterio científico y cuya

diferencia principal entre las distintas entradas estriba en la denominación dada por los propios agricultores.

Por otro lado, los trabajos de caracterización realizados sobre este material se han basado únicamente en caracteres morfológicos, sin llevar a cabo un estudio inicial de las plagas y enfermedades que pueden afectar al cultivo. Aspecto indispensable, en especial en el caso de los virus que afectan a este cultivo, cuya enfermedad se manifiesta por la modificación de caracteres morfológicos (coloración de las hojas, flores y tubérculos, forma y tamaño de tubérculos, crecimiento vegetativo, etc.).

I.2 OBJETIVOS

Bajo este marco nos planteamos este trabajo de investigación que pretendía como objetivo principal:

Aplicar las Técnicas de Biotecnología Vegetal, en concreto las técnicas de *Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales* como herramienta para la conservación del germoplasma de tres variedades canarias de papa: Mora, Borralla y Torrenta.

Este objetivo implica una serie de objetivos secundarios, no menos importantes que el principal:

1.- Diseño de un protocolo de micropropagación para la conservación *in vitro* de las variedades Borralla, Mora y Torrenta:

- Evaluación de los medios de cultivo más adecuados para el establecimiento del cultivo *in vitro* de las variedades en estudio.

- Evaluación de las estrategias y medios de cultivo más adecuados para la multiplicación *in vitro* de las variedades en estudio.

2.- Desarrollo y ajuste de Metodologías de diagnósticos de las especies virales:

- Establecimiento del diagnóstico mediante la técnica inmunológica DAS-ELISA.
- Establecimiento de técnicas de diagnóstico mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (IC-RT-PCR y RT-PCR).

3.- Diseño de un protocolo para el saneamiento de las variedades en estudio:

- Establecimiento de los tratamientos adecuados para la aplicación de termoterapia.
- Evaluación de la técnica combinada de termoterapia y cultivo de meristemas como herramienta para el saneamiento de estas variedades.

Por otro lado, dado que este germoplasma de papa se instaló en las islas tras la conquista y desde entonces ha sufrido un proceso de adaptación a nuestro entorno, hemos de considerar que durante este proceso se ha podido producir una selección de las progenies virales al tiempo que se han ido generando nuevas características en el hospedante.

Se nos plantea, por tanto, la necesidad de abordar un segundo frente, que implica la caracterización molecular de las especies virales presentes en las tres variedades, como herramienta para desarrollar y establecer las

técnicas de diagnóstico adecuadas para el éxito del objetivo principal, y cuyos resultados esperamos contribuyan al conocimiento sobre la relación patógeno-hospedante, así como a la filogenia de lo virus.

Esto, implica que abordemos también en esta memoria los siguientes objetivos:

- Identificación de las especies virales que infectan a las variedades en estudio.
- Clonado y secuenciación de las especies virales existentes.
- Ubicación taxonómica y grado de homología con variantes virales previamente secuenciadas.

CAPÍTULO II

ORIGEN E HISTORIA DE LA PAPA

II INTRODUCCIÓN

II.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

II.1.1 ORIGEN DEL CULTIVO DE LA PAPA Y LLEGADA AL CONTINENTE EUROPEO

La Humanidad, a lo largo de su historia, ha domesticado numerosas especies vegetales de una forma sencilla. El paso de una planta silvestre a cultivada se produce cuando las semillas silvestres se cultivan en un entorno modificado por el ser humano. La presión selectiva aplicada a una especie en su paso de silvestre a cultivada, es lo que denominamos *Selección Automática*, y es, en definitiva, la manifestación de la selección natural sobre la estructura genética de las poblaciones cuando se altera la dirección e intensidad de la selección. A este proceso de domesticación se sometieron varias especies tuberosas de la familia de las *Solanáceas* por indígenas americanos de la región de los Andes Centrales.

De acuerdo con la distribución de las primeras papas cultivadas que se conoce y de las especies silvestres más afines, parece probable que el cultivo de este tubérculo se iniciara en la región del Lago Titicaca, entre 3.500 y 4.500 metros sobre el nivel del mar. Es además, en esta región, donde se encuentra una mayor variación en sus formas cultivadas y especies silvestres correspondientes (Tapia, 1993).

Los documentos arqueológicos disponibles indican que las poblaciones andinas del sur del Perú y del norte de Bolivia comían papas silvestres desde 3.000-4.000 a.C. (Alonso, 1996). La *domesticación* se pone de manifiesto en los restos arqueológicos pertenecientes a las distintas culturas de esta región, *Mochica*, *Nazca*, *Chimu*, *Chimu-Inca*. Las representaciones encontradas son de carácter simbólico y dan a entender que la papa había sido un artículo familiar y considerada en extraordinaria importancia como alimento, tal y como se constata tras la presencia del denominado *Chuño*¹ en restos funerarios (Rousselle *et al.*, 1999).

(1) El *chuño* es un método de conservación por desecación después de congelación que se practicaba en el pasado y que aún persiste en nuestros días.

Por otro lado, las cerámicas correspondientes a los periodos de estas culturas también ponen de manifiesto esa estrecha relación entre el hombre y la papa. Dada la apariencia de la mayoría de las especies cultivadas de esta región que tienen la piel de color rojo-sangre o morado, formas irregulares, con ojos profundos rodeados por una protuberancia de los que emergen los brotes; no es descabellado pensar que los indígenas compararan esas características comunes de los tubérculos con un ser humano. Un tubérculo redondo es la cabeza, uno alargado, el cuerpo, y las protuberancias irregulares corresponderían a los miembros (Fig. 1).



Fig 1. Vasija periodo Chimú- Inca. (Hawkes, 1990)

Después del descubrimiento del Nuevo Mundo por los españoles, éstos se establecen en el Caribe y la América Central desde donde emprendieron sus expediciones a América del Sur hacia 1530, siendo probable que a partir de esas exploraciones los conquistadores españoles descubrieran la papa, sugiriéndolo así los relatos de la época, a pesar de que éstos se enmarcan más en la conquista en sí.

Francisco Pizarro conquista el imperio Inca (lo que actualmente son Perú y Ecuador) entre 1531 y 1536. En la misma época, una expedición mandada por Jiménez de Quesada, descubre los altiplanos de Colombia habitados por los indios Chichas. Quizás fue allí donde se descubren en 1537

las primeras papas, en la actual provincia de Velez. De acuerdo con un sacerdote español, Castellanos, quién llegó de joven a las Antillas y conocía algunos miembros de dicha expedición, cita posteriormente (1561) la existencia de tubérculos de los que da una descripción que se corresponde con la papa (Rousselle *et al.*, 1999).

Antes incluso de que tuviera lugar la introducción de esta planta en Europa, aparecen referencias a la misma en diversos escritos. La primera se debe al cronista Gonzalo Fernández de Oviedo y Valdez en su *Historia Natural y General de los Indios*, escrita en Sevilla en 1535, en la que se cita la papa como producto alimentario utilizado por los indígenas.

Fray Vicente Valverde (1539), primer Obispo de Cuzco, en una carta dirigida a Carlos I, rey de España, proponía se aplicase a las cosechas de papas los “diezmos y primicias” como renta del obispado, siendo tal vez el primero de los españoles que enumera minuciosamente los alimentos que existían en el territorio conquistado.

Algo más conocidas y detalladas son las descripciones de la papa de:

- Francisco Gómez de Gomara (1552), quien en su *Historia General de las Indias*, describe las regiones montañosas de *Calla* en Perú y hace referencia a sus habitantes-“*Los hombres viven en este valle desde hace cientos de años y comen maíz y raíces parecidas a las turmas de tierra a las que llaman papas*”.
- Pedro Cieza de León (1553), joven soldado a las órdenes de Sebastián de Belalcazar, participa en la conquista de Ecuador y de la región de Quito en 1538. Narra, en sus *Crónicas de Perú*, la marcha de Colombia a Bolivia, a través de los Andes, y relata las costumbres de las poblaciones del altiplano y del Lago Titicaca, describiendo la alimentación basada en la papa.
- El jesuita José de Acosta, fue Segundo Provincial del Perú donde desembarcó en 1571, publica a su regreso a España en 1591, su *Historia natural y moral de las Indias*. En ella describe la papa y

otros productos agrícolas de las regiones del Lago Titicaca:
 "...Estas papas cogen y dejanlas secar bien al sol, y quebrándolas
 hacen lo que se llama chuño, que se conserva así muchos días, y
 les sirve de pan..."

Existen además una serie de ilustraciones realizadas entre 1583 y 1613 cuyo autor, medio quechua/medio español, Felipe Guamán Poma de Ayala, refleja la siembra, cuidados y cosecha de la papa en el Perú durante los primeros años que siguieron a la conquista; y a través de las cuales el autor demuestra las costumbres de los indios quechuas de los Andes (Fig. 2).



Fig. 2. La papa en Perú hacia finales del siglo XVI tal y como recoge F.G. Poma de Ayala en "Nueva Crónica y Buen Gobierno" (Rousselle et al., 1999).

Los europeos, que no conocían el aprovechamiento agrícola de tubérculos, quedan fascinados por estos productos subterráneos. Ello da lugar a que existan numerosas crónicas y anécdotas que acompañan la llegada de la papa a Europa. No pasando en las primeras décadas de una mera curiosidad botánica, cultivada como planta de huerta o hierba medicinal (Pardo y López, 1993).

Sin embargo, no se conocen documentos sobre la fecha exacta de la llegada de la papa al continente europeo, aunque es probable que en dicho momento nadie se imaginara la importancia que podría alcanzar este

producto agrícola. No obstante, se cree que la papa entra en Europa durante los últimos años del s. XVI, probablemente en varias oleadas, a través de España hacia 1565-70, (Hawkes y Ortega, 1992) y por las islas Británicas entre 1588 y 1593. Lo que si se puede afirmar es que tuvo que llegar el siglo XVIII para que su cultivo se generalizara.

La entrada al continente Europeo vía España tiene lugar a través del puerto de Sevilla, para después extenderse a otros países como Italia e Inglaterra (Alonso, 1996). El botánico Charles de l'Ecluse, conocido por *Clusius* es considerado un personaje clave en la difusión de la papa a través de los jardines botánicos europeos. Recibe del Papa una muestra de esta planta, la cuál cultivó en 1568 en Viena y Frankfurt, dándola a conocer luego en toda Centroeuropa. Su labor en la difusión de esta planta se recoge en la obra anónima *The American Potatoes and Their Breeding Value* publicada en 1936.

Sin embargo, se debe a G. Bauhin la primera descripción botánica de la planta en 1596. Un siglo antes que Linneo, le asigna el nombre de *Solanum tuberosum* añadiéndole el vocablo *esculentum*, lo que disminuye el valor taxonómico de su denominación, pero demuestra que se había comprobado ya el carácter gustativo de la planta.

Por otro lado, las primeras ilustraciones impresas de la papa podrían deberse al inglés John Gerard (1597) en su obra *Herball* que fueron seguidas por las de Bauhin (1598) y Clusius (1601). Estos datos demuestran que entre 1587 y 1601 la papa había alcanzado un lugar en los jardines y herbarios europeos. Así, a finales del siglo XVI la papa comienza a cultivarse en Italia, Francia, Suiza, Países Bajos, Inglaterra y Alemania.

Hoy día se admite que las primeras papas que llegaron a España y, por tanto, a Europa, pertenecían a la subespecie *andígena*. La confirmación de ello corresponde a Salaman (1949) y Hawkes (1967) quienes a partir del estudio de muestras pertenecientes a 18 antiguos herbarios, concluyeron que las papas que inicialmente llegaron a Europa pertenecían a la subespecie *andígena*. Esta subespecie está adaptada a días cortos, no es capaz de tuberizar eficazmente más que con un fotoperiodo de doce horas de luz. Debido a ello, las primeras papas europeas formaban sus tubérculos hacia

octubre-noviembre, y las primeras zonas de cultivo se situaron en el sur de Europa (Italia, España, Sur de Francia) en climas marítimos templados donde los riesgos de heladas eran pequeños.

Serán necesarios dos siglos para que se generen en Europa variedades adaptadas a la tuberización en días largos, gracias a la variabilidad conseguida por siembras en semillero y a la selección de las variedades más precoces. Así, ya en 1799 encontramos la siguiente recomendación -“*De todos los medios propuestos para multiplicar las buenas cualidades de la patata e impedir que degeneren no hay nada más eficaz que los semilleros. Es necesario de vez en cuando renovar las especies por esta vía, recogiendo antes de la cosecha las raíces, los frutos de la especie que se desee propagar, conservándolos durante el invierno en arena, o colgados mediante cuerdas, mezclándolos en primavera con la tierra y distribuyéndolos sobre camas o sobre mantillo*” (Rousselle et al., 1999).

Simultáneamente, gracias a los avances y desarrollo de la navegación marítima y a un mayor conocimiento de los métodos de conservación, nuevos genotipos obtenidos en regiones donde la papa tuberiza en condiciones de días largos (Chile, isla de Chiloé) llegan a Europa y van reemplazando a lo largo del siglo XIX a las iniciales variedades peruanas.

II.1.2 ESTADO ACTUAL DEL CULTIVO

La papa, confinada en Sudamérica hasta finales del siglo XVI, se ha convertido, tras cuatrocientos años, en un cultivo extendido por todo el planeta, ocupando el cuarto lugar a nivel mundial. Sin embargo, su expansión por el viejo continente no fue fácil, debido, sobretodo, a la mala reputación que la acompañaba, pues no solo se obtenía de debajo de la tierra, sino que además servía tanto para la alimentación humana como para la de los animales domésticos. Precisamente, cuando fue sustituida por las harinas de cereales en la alimentación del ganado, el cultivo de la papa sufrió una importante regresión

Hoy en día, incluso para la alimentación humana, la papa ha perdido el lugar preponderante que ocupaba hace 30 años. La superficie dedicada a

su cultivo a nivel mundial ha descendido de los casi 20 millones de hectáreas en la década de los 70 hasta los poco más de 17 millones de hectáreas a finales de la década de los noventa. A pesar de la disminución de la superficie cultivada, la productividad ha ido creciendo poco a poco, situándose así la producción mundial en los 279 millones de toneladas al final de la década de los noventa (Alonso, 1996).

En los últimos cinco años la reducción en superficie cultivada no ha sido tan dramática, si bien la producción total se mantiene sin grandes variaciones, situándose por encima de los 327 millones de toneladas para este último año, mientras que el rendimiento por hectárea se ha visto incrementado al orden de 175.857 Hg/Ha (Tabla. 1), siendo en gran medida consecuencia de la mejora vegetal en busca de variedades más productivas y de mejor calidad, mejoras en fertilización, avances en la mecanización, etc.

<i>SUPERFICIE CULTIVADA (Ha)</i>	<i>AÑO</i>	<i>PRODUCCIÓN (Mt)</i>	<i>RENDIMIENTO (Hg/Ha)</i>
20.028.891	2000	328.554.584	164.040
19.628.282	2001	312.277.654	159.096
19.071.787	2002	316.671.373	166.042
18.956.796	2003	315.478.323	166.420
18.630.196	2004	327.624.417	175.857

Tabla 1. Variación a nivel mundial en los últimos cinco años del cultivo de la papa (Fuente: <http://faostat.fao.org>).

En España se ha pasado de las más de 350.000 hectáreas dedicadas a este cultivo en la década de los 70 con una producción de alrededor de 5,6 millones de toneladas, a las poco más de 210.000 hectáreas y que producían alrededor de 4,2 millones de toneladas durante de la década de los noventa (Alonso, 1996). Sin embargo la superficie dedicada a su cultivo ha ido en disminución durante estos últimos años, situándose en unas 95.800 hectáreas para el año 2004, con una producción de 2,7 millones de toneladas, quedando muy por debajo de otros países europeos como Polonia y Alemania en cuanto a superficie cultivada (Tabla 2). Respecto al rendimiento, España ocupa el puesto 21 en el ranking mundial, estando en primer lugar Bélgica

seguida por los Países Bajos y Francia. Sin embargo, sorprende el bajo rendimiento peruano, ubicado en el puesto 106 del ranking mundial en lo que a rendimiento se refiere (Tabla 3).

<i>PAÍS</i>	<i>SUPERFICIE CULTIVADA (Ha)</i>	<i>PRODUCCIÓN (Mt)</i>	<i>RENDIMIENTO (Hg/Ha)</i>
ALEMANIA	295.000	13.044.000	442.170
BELGICA	66.734	3.229.622	483.955
ESPAÑA	95.800	2.750.400	287.098
FRANCIA	159.638	7.254.221	454.417
PAÍSES BAJOS	161.280	7.488.000	464.286
POLONIA	713.000	13.746.000	192.791
PORTUGAL	80.000	1.250.000	156.250
REINO UNIDO	140.000	6.000.000	428.571

Tabla 2. Superficie cultivada en los principales países europeos, junto a los rendimientos y producción para el año 2004. (Fuente: <http://faostat.fao.org>).

<i>Nº</i>	<i>PAÍS</i>	<i>RENDIMIENTO (Kg/Ha)</i>
1	BELGICA	483.955
2	PAISES BAJOS	464.286
3	FRANCIA	454.417
4	NUEVA ZELANDA	442.478
5	ALEMANIA	442.170
6	ESTADOS UNIDOS	437.707
7	REINO UNIDO	428.571
8	DINAMARCA	397.415
9	IRLANDA	378.788
10	SUIZA	359.124
21	ESPAÑA	287.098
106	PERU	121.390

Tabla 3. Ranking: de rendimiento de la papa para el año 2004. (Fuente: <http://faostat.fao.org>).

Por otro lado cabe destacar que pese a que la papa es un producto originario de América, la principal zona de producción no está en el continente americano, pues está conformada por países asiáticos y europeos. Casi el 60% de la producción mundial de papa se concentra en China, Federación Rusia, India, Ucrania, Estados Unidos y Polonia. Destaca China, la cuál ha duplicado la producción de papas desde 1989 hasta nuestros días. En

la actualidad, este país representa el 23% de la superficie total cultivada, ocupando este cultivo las zonas templadas y montañosas del norte del país, y desplazando a otros cultivos importantes como puede ser el del arroz. Actualmente, China, la Federación Rusia, Ucrania e India, representan el 55% de la superficie total mundial (Tabla 4).

<i>PAÍS</i>	<i>SUPERFICIE CULTIVADA (Ha)</i>	<i>PRODUCCIÓN (Mt)</i>	<i>RENDIMIENTO (Hg/Ha)</i>
ESPAÑA	95.800	2.750.400	287.098
POLONIA	713.000	13.746.000	192.791
BRASIL	138.364	2.891.530	208.980
CANADÁ	170.530	5.170.790	303.219
CHINA	4.301.850	70.048.000	162.832
E.E.U.U.	472.480	20.680.770	437.407
FEDERACIÓN DE RUSIA	3.134.380	35.914.240	114.584
INDIA	1.400.000	25.000.000	178.571
JAPÓN	90.000	2.839.000	315.444
NIGERIA	177.000	657.000	37.923
UCRANIA	1.556.000		
PERÚ	246.815	2.996.090	121.390

Tabla 4. Superficie cultivada en diversos países, junto a la producción y el rendimiento para el año 2004 (Fuente: <http://faostat.fao.org>).

II.1.3 LLEGADA DE LA PAPA A CANARIAS Y SU EVOLUCIÓN EN LAS ISLAS.

No se conocen datos concretos sobre la fecha exacta de llegada de las primeras papas a las Islas Canarias. Sin embargo, su directa procedencia americana es indudable (Zubeldía *et al.*, 1955; Hawkes y Francisco-Ortega, 1993; Marrero, 1992). Fueron introducidas en épocas tempranas tras la conquista (Lobo-Cabrera, 1988), hecho éste favorecido por la situación geográfica del Archipiélago, pues constituía lugar de encuentro para hombres, animales y plantas que cruzaban el Atlántico. Es esta ubicación lo que favorecerá con posterioridad el aporte de nuevas variedades también desde Europa una vez establecido el cultivo en el continente (Álvarez y Gil, 1996; Marrero, 1992).

Al parecer, Walter Raleigh (1552-1618), navegante y cortesano inglés que tomó parte en varias expediciones contra las posesiones españolas en América, frecuentó los mares isleños. Pero, frente a la leyenda forjada en torno a su intervención en la introducción de la papa en el continente europeo vía Irlanda, durante la década de 1580, seguramente el tubérculo llegó a Canarias antes que sus barcos corsarios. De hecho, durante el reinado de Felipe II el comercio Canario en Europa, América y África era muy intenso. Según Lobo Cabrera (1988) la papa se importó directamente a Canarias como semilla, extendiéndose desde aquí al continente europeo; en torno a 1560 ya debía estar implantada en Gran Canaria, y en 1567 se exporta a Flandes (según Macías Hernández (1989), el navío holandés *El Galgo* cargo en Enero de 1567, en el puerto Gran Canario de las Isletas, papas con destino a Amberes) y en 1574 se envían a Francia. Sin embargo, a pesar de lo hasta aquí expuesto, los primeros datos certeros que se poseen acerca de la presencia de la papa en nuestras islas corresponden al año 1622, y son recogidos por Viera y Clavijo en su "Diccionario de Historia Natural de las Islas Canarias" en el cual dice:

"Parece que ya no hay duda en que las papas son originarias de la América, y uno de los más bellos presentes que el Nuevo Mundo ha hecho al Antiguo: sin embargo, se ignora si fueron traídas a Europa por la primera vez del Perú o de la Virginia, si bien por lo que respecta a nosotros tenemos en Tenerife la tradición constante depositada en la familia de los señores Bethencourt y Castro, de que las primeras papas nos la trajo del Perú Don Juan Bautista de Castro, por el año 1622. Este señor las hizo sembrar en sus tierras de Icod el Alto, en donde tan felizmente se ha difundido por todas las Canarias..."

A principios del siglo XVII, el cultivo de la papa se encuentra ya aclimatado a las Islas, habiéndose instalado en primera instancia en los terrenos localizados por toda la medianía norte de la isla de Tenerife, en zonas altas del sur y en cotas elevadas de las montañas de Anaga y Teno, pues las características propias del material vegetal primitivo no admitía una

distribución más amplia (Álvarez y Gil, 1996). Estas zonas, a pesar de no encontrarse libres de sequía más o menos prolongadas, permitieron el cultivo de la papa en condiciones de secano, debido sobretodo a las lluvias ocasionales que se presentaban en otoño y primavera, y a las neblinas que aportaban una humedad considerable. La superficie de cultivo aumenta a lo largo de este siglo tal y como refleja López Linaje (1991): *“de tal modo que estimaciones indirectas indican que los cereales y el policultivo intensivo ocupan a fines del siglo XVII algo más del 90% de la superficie cultivada.”*

Las papas se intercalan entre largas hileras de cepas productoras de vinos (“Vidueños”), ubicados en las medianías de barlovento de Tenerife y La Palma, y se integran en el régimen de alternancia de cultivos. Así, millo, trigo, papas y lino rotan en los terrenos de cultivo, incrementando el nivel de productividad agraria de las medianías húmedas de barlovento y de las huertas irrigadas de Gran Canaria, La Gomera y El Hierro (Macías, 1989).

Una vez asentada en el archipiélago, rápidamente pasa a ser uno de los cultivos más importantes de las islas, constituyendo junto con el gofio y el pescado la dieta básica de la población. Don Lope Antonio de la Guerra y Peña refleja la importancia de este cultivo en sus memorias recogidas en la obra “Museo Canario” (1951 a 1959) en la que se hace resumen anual de las cosechas. Referente a 1778 escribe:

“Las papas es otra de las cosechas que abundan y que se han aumentado mucho de unos años a esta parte. Hay dos cosechas: la una invernera, que por lo común se recoge en los meses de Enero y Febrero; y la otra veranera en los de Mayo y Junio.... La gente pobre se alimenta mucho con este fruto.”

Este hecho da constancia de la llegada de papas desde el continente Europeo, ya adaptadas a producir tubérculos bajo condiciones de días largos y propiciando el progreso de este cultivo a zonas más bajas de la vertiente norte y en zonas de medianía de la vertiente sur. Así a principios del s. XIX, el cultivo de papas en medianías arroja un rendimiento de 6.000 Kg por hectárea, sin abonos químicos. El carácter de cultivo de subsistencia que

hasta entonces tenía la papa va a variar de manera significativa al terminar el siglo; a partir de ese momento y hasta hace pocos años, la papa constituye el triángulo agrario básico de las Islas junto con el tomate y el plátano (Macías, 1989). A la cabeza de los países compradores de estos productos se encuentra Inglaterra, EEUU, Cuba y en menor medida Venezuela (Rodríguez, 1986). Entre 1900 y 1930, la superficie cultivada de papas se incrementó en torno a un 25 % y se duplicaron sus exportaciones a Inglaterra, los rendimientos, gracias a los abonos químicos superaron los 12.000Kg por hectárea.

En los inicios de la década de 1940, marcada por la miseria y el hambre, hubo grandes problemas con respecto al mantenimiento del nivel de producción y, por consiguiente, en el campo de la exportación se produce un descenso con respecto a las décadas anteriores.

Después de la Segunda Guerra Mundial la situación se va normalizando con una producción en torno a las 80.000 ó 90.000 Tms anuales, de la cual alrededor del 78 % es acaparado por el consumo interno, mientras el resto se destina a la exportación, principalmente hacia la Península (Rodríguez, 1986).

Con el aumento de la demanda interna y la implantación de nuevas políticas agro económicas, de apertura al exterior, se produce un incremento de la superficie cultivada, alcanzando las 21.170 Has en 1957-1961, de las que aproximadamente un 60 % corresponden a las Canarias occidentales y el resto a las orientales, aumentando además los rendimientos y duplicándose las exportaciones, con la recuperación del mercado británico.

A este periodo de crecimiento le sigue a partir de 1977 una nueva disminución, estimándose una reducción del 50 % con respecto a los niveles máximos alcanzados en la etapa anterior, reduciéndose en algo más de 12.000 hectáreas la superficie cultivada. De la cuál, aproximadamente un 25 %, se dedica a la producción de papa extratemprana, susceptible de ser exportada, y casi exclusivamente asentada en la isla de Tenerife. Esta tendencia finalmente se acentúa a partir de 1980, con la pérdida del mercado británico por la competencia de otros productores (Macías, 1989) y según reflejan los siguientes datos:

- En 1986, en la provincia de Santa Cruz de Tenerife la superficie destinada al cultivo de la papa era de 10.477 hectáreas, correspondiendo 8.400 a la isla de Tenerife, 1.054 a la isla de La Palma, 693 a La Gomera y 290 al Hierro.
- En 1988 la superficie disminuyó a 9.076 hectáreas, siendo Tenerife la isla de la provincia donde más se acusó esta tendencia.
- En 1991 las tierras destinadas al cultivo de papa para consumo humano en la provincia de Santa Cruz de Tenerife ocupaban un total de 6.280 hectáreas repartidas en 1.996 hectáreas en secano y 4.284 en regadío.
- En la actualidad, la producción del tubérculo corre el riesgo de convertirse en marginal. La superficie en cultivo se ha reducido en pocos ejercicios (5.500 hectáreas). Las cifras de toneladas cosechadas cifradas en el pasado en torno a las 150.000, no llegan en la actualidad a las 90.000 toneladas (Tabla 5). De ésta producción más de la mitad corresponde a la isla de Tenerife quien acapara dos terceras partes de las hectáreas en cultivo (Tabla 5).

<i>LA IMPORTANCIA DE LA PAPA EN CANARIAS</i>	
Superficie total cultivada	5.500 hectáreas
Superficie media por explotación	0,7 hectáreas
Producción anual (media)	83.000 hectáreas
Valor económico	35,4 millones de euros
Rendimiento medio por Has.	15.000 Kilos
Consumo por habitante y año	100 Kilos
Consumo local al año	145.000 toneladas

Tabla 5. Importancia de la papa en Canarias. Datos referidos hasta el 2004. Servicio de estadística de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias.

II.1.4. DISTRIBUCIÓN ACTUAL DEL CULTIVO EN LA ISLA DE TENERIFE

El mapa de cultivo por islas muestra a Tenerife como la isla con mayor superficie destinada a este cultivo (Tabla 6). El cultivo se distribuye en la isla casi a partes iguales entre hectáreas de secano (algo más numerosas y radicadas mayoritariamente en el norte) y de regadío (con mayor presencia en el sur). Sin embargo, la isla de Fuerteventura es la que cuenta con una menor superficie destinada a este cultivo, especialmente en regadío (Tabla 6).

La producción de papas en Tenerife se distribuye en las medianías de las dos vertientes insulares, con especial protagonismo en ciertas zonas de las comarcas de La Orotava (altos de Realejos o Benijos), Icod (La Guancha y altos de san Juan de la Rambla), Isla Baja (El palmar o El tanque), Anaga y El Rosario (La Esperanza), Abona (San Miguel o Vilaflor) y el Sureste (Fasnia o El Escobnal). En su mayoría se trata de pequeñas explotaciones (rara vez superan la hectárea), de difícil mecanización y con la población envejecida (Tabla 7).

<i>MAPA DE CULTIVO POR ISLAS (hectáreas)</i>			
ISLAS	SECANO	REGADÍO	TOTAL
TENRIFE	1.923	1.252	3.175
LA PALMA	113	348	461
LA GOMERA	1	190	191
EL HIERRO	-	76	76
GRAN CANRIA	105	1.182	1.287
LANZAROTE	208	97	305
FUERTEVENTURA	7	43	50

Tabla 6. Mapa de Cultivo por Islas en Hectáreas. Datos referidos hasta el 2004. Servicio de estadística de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias.

La mayor parte de la producción, entre el 60 y el 70 %, se obtiene en fincas como único cultivo (factor que ha empobrecido los suelos), y las restantes se divide por igual en combinación con viñas o con hortalizas (por encima de las mil hectáreas en cada caso) y bastante menos con frutales (Tabla 7).

Durante los últimos años el cultivo de la papa se ha sumido en una fuerte crisis. Los factores responsables de la misma son varios: el abandono del campo y el envejecimiento de la mano de obra agrícola como consecuencia de la presión de otras actividades económicas sobre los terrenos de cultivo; la menor productividad y escasa rentabilidad económica de los cultivos, la deficiente comercialización; el crecimiento de las importaciones por la supresión de las restricciones temporales, cambios en las pautas dietéticas (precongelados y consumo de papas de importación) y por último, y no por ello menos importante, las plagas como la polilla Guatemalteca (*Tecia solanivora*), la marchites bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), el hongo *Synchytrium endobioticum* que provoca la sarna negra y los virus, que han llevado a una considerable disminución en el rendimiento del cultivo principalmente en las zonas donde estos patógenos se encuentran instalados.

Estas infecciones se propagan en campo y en almacén, contaminan los suelos y obligan (en el caso de la podredumbre) a dejar en barbecho los terrenos afectados largos periodos de tiempo. Estas plagas son de gran incidencia en comarcas del norte de la isla (Icod el Alto, Cruz Santa y Benijos). Las repuestas propuestas por los especialistas para los productores afectados contemplan la sustitución del cultivo por cereales, leguminosas o frutales, y la realización de alternancia de cultivos permitiendo así la fertilización de los suelos y limitar el alcance de las plagas.

SUPERFICIE DE CULTIVO EN TENERIFE (Hectáreas)					
COMARCAS	PAPAS	PAPAS + FRUTALES	PAPAS+ VIÑAS	PAPAS + HORTALIZAS	TOTAL
SURESTE (Candelaria, Arafo, Güimar, Arico y Fasnia)	379,7	5,3	125	73,1	1.240,1
ANAGA- METROPOLITANA (Santa Cruz, La Laguna, Tegueste y El Rosario)	1.272	69,7	276,2	10	1.627,9
ACENTEJO (Tacoronte, El Sauzal, La Matanza, La Victoria, Santa Úrsula)	440,3	41,2	217,8	6,3	705,6
VALLE DE LA OROTAVA (Puerto de la Cruz, La Orotava y Los Realejos)	1.423,7	18,5	239,3	0,1	1.681,6
ABONA (Granadilla, San Miguel y Vilafior)	400,1	0,4	0,5	526,5	927,5
ICOD (Icod de las Vinos, La Guancha y san Juan de la Rambla)	816,4	9,7	216,3	21,4	1.063,8
ISLA BAJA (Garachico, Los Silos, Buenavista y El Tanque)	288,5	3,5	52,3	11,5	355,8
SUROESTE (Arona, Adeje, Guía de Isora y Santiago del Teide)	15,1	1,3	0,3	65	81,7
TOTAL	5.035,8	149,6	1.127,7	1.370,9	7.684

Tabla 7. Superficie de Cultivo en la Isla de Tenerife por Hectáreas. Datos referidos hasta el 2004. Servicio de estadística de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias.

II.1.5 VARIEDADES CULTIVADAS EN CANARIAS

Parece claro que a las Islas Canarias la papa llegada directamente del Perú fue de la forma *S. Tuberosum* sp. andígena, caracterizada por tubérculos con ojos de profundidad media y numerosos, con un ciclo de

cultivo y periodo de latencia largos, que solo ofrecía una cosecha anual, la cuál se instaló en toda la medianía norte, y en cotas elevadas de las montañas de Anaga y Teno. Posteriormente “nuevas” variedades procedentes de Europa se van a unir a aquellas cuya entrada en las islas se produjo en época temprana. Estas nuevas papas ya eran capaces de producir dos cosechas por campaña (una invernera y otra estival), un ciclo de cultivo más corto que aquellas de origen americano y un escaso periodo de latencia de los tubérculos haciendo posible cosechas en zonas más bajas, cálidas y luminosas de la isla.

Si atendemos a la obra de Doyle publicada en 1977 en la Imprenta Real de Madrid con título “Tratado sobre el Cultivo de las Patatas o Papas” advertiremos la coexistencia de ciclos de cultivo diferentes en cuanto a su duración, aspecto que resalta la distinta naturaleza de las variedades cultivadas por ese entonces.

Diversos trabajos se han dedicado al estudio de la diversidad de variedades de papas presentes en la isla. Por su parte, el profesor J. Hawkes, tras estudiar las disecciones florales de nuestras variedades antiguas, asemeja algunas de nuestras papas a aquellas de la variedad *imilla*, una de las variedades importantes del sur del Perú y Bolivia. Sin embargo añade un punto más de discusión cuando advierte la coexistencia de otras variedades de claro origen europeo y de presencia también tradicional en las islas, exponiendo la posibilidad de que el material hoy presente, y cuyas características muestran una gran afinidad con las papas nativas que aún hoy son cultivadas en los Andes, pudieran no sólo provenir del material vegetal andino que en un principio se introdujo, sino de los cruces que pudieron tener lugar entre este material primitivo (o sus segregantes) y el material de origen europeo perteneciente a *Solanum tuberosum* sp *tuberosum*.

Por otro lado, Zubeldía y colaboradores (1955) certifican la existencia en las islas de variedades de papas pertenecientes a la subespecie *S. Tuberosum* sp. andígena y descendientes probablemente de aquellas introducidas directamente desde el continente americano. Junto a ellas también constata la presencia de variedades, también primitivas de la subespecie *S. Tuberosum* sp. *tuberosum* y de variedades comerciales de esta

misma subespecie, que ocupaban la mayor parte de los terrenos dedicados a este cultivo por ese entonces. Chico (1986), confirma 31 años después esta situación, y señala la presencia en las islas de nuevos cultivares procedentes de América, ahora traídos por los emigrantes retornados, y plantea la necesidad de localizar todas las variedades presentes, a fin de investigar su taxonomía y obtener un patrimonio bien sistematizado de papas Canarias.

En este sentido, Álvarez y Gil (1996), realizan un trabajo de etnobotánica agrícola en el que recogen las características morfológicas y agronómicas que los agricultores emplean para diferenciar unas variedades de papas de otras, y que les lleva a proponer una agrupación de las variedades actualmente presentes en la isla:

- *Papas correspondientes a variedades locales cuya antigüedad en la isla se desconoce y tradicionalmente han sido cultivadas entre nosotros.* En este apartado se incluyen aquellos tubérculos cuya llegada a la isla se cree tuvo lugar en época temprana y se han venido cultivando de generación tras generación. Incluye: Torrenta, Azucenas, Bonitas, Colorada, Borralla, Mora, Negras, Palmeras, Pelucas.
- *Papas correspondientes a variedades importadas durante este siglo y que, habiendo cesado la importación su cultivo ha persistido en la isla.* Incluye: Papa Lila, papa Rafaela, Matancera, Rosita.
- *Papas traídas a la isla por los emigrantes retornados:* Papas venezolanas; bajo esta denominación encontramos las diferentes papas traídas a puñaditos en el curso de estas últimas décadas por los emigrantes retornados del continente americano.
- *Papas de importación reciente o continuada en los últimos años.* Ocupan la mayor parte de los terrenos dedicados a este cultivo. Su calidad organoléptica en general es inferior a la de las papas comprendidas en los grupos anteriores, pero debido a su mayor

productividad y adaptabilidad a las formas actuales de consumo se hayan presentes casi a diario en todos los hogares de la isla. Las de mayor consumo son: Up to Date (autodates o Utodates), La Kerr's Pink (Rosadas), la King Edward (Quineguas o Chineguas) y la Arran Banner (Blanca redonda, Zarcera o Rambane/a).

II.2 TAXONOMÍA Y DESCRIPCIÓN

II.2.1 TAXONOMÍA

La papa (*Solanum tuberosum* L.) descrita por Linneo en 1753, pertenece a la familia de las Solanáceas que comprende géneros tan diversos como *Nicotiana*, *Lycopersicon*, *Petuni*, *Datura*, *Mandrágora*, *Capsicum* y *Physalis*.

El género *Solanum* agrupa alrededor de 1000 sp de las cuales más de 200 son tuberosas (Hawkes, 1990). Las especies tuberosas se agrupan en el subgénero Potato, sección Petota, subsección Potatoe.

Si bien el número de especies de tuberosas no es definitivo ya que aún se describen nuevas especies, al tiempo que los sinónimos son eliminados. Todas constituyen un grupo que contienen el número cromosómico básico 12 y que discurre del nivel diploide al hexaploide: el 2,5 % de las especies presentan varios niveles de ploidía, el 74 % son diploides, el 4,5 % triploides, el 11,5 % tetraploides, el 2,5 % pentaploides y el 5 % hexaploides (Hawkes, 1978).

En lo que a las especies cultivadas se refiere nos encontramos con 4 diploides, 2 triploides, 1 tetraploide y 1 pentaploide. De entre ellas, *S. stenotomun* fue la primera especie cultivada, domesticada alrededor del Lago Titicaca, sobre el altiplano andino, en la frontera entre Perú y Bolivia. Es una especie diploide, adaptada a las altas latitudes, entre los 3000 msnm. De la hibridación natural de ella con la especie silvestre resistente al frío, *S. megistacrolobum*, resultó la especie también diploide *Solanum ajanhuiri*,

que se desarrolla entre los 3.000 y 4.000 metros, resistente también a las heladas y a los días cortos de estas latitudes.

Otra de las especies diploides es *S. phureja* y *S. gonioclix*. La primera de ellas surge como consecuencia de la selección, por sus características de precocidad y la ausencia de letargo que permite hacer de dos a tres cosechas por año. Crece en los valles montañosos de Bolivia y Colombia, a una altitud mucho menor que las anteriores, entre los 700 y 900 msnm. La otra es también susceptible a las heladas, muy productiva y muy estimada como alimento, se cultiva en los altos valles del Centro del Perú.

Por otro lado, la hibridación entre las especies con la fórmula cromosómica $2n=24$ y $2n=48$ ha dado lugar a varias nuevas especies del tipo $2n=36$. La mayoría de ellas se encuentran en la región central de los Andes. La planta $2n=24$ que intervino en el cruzamiento pudo haber sido la *S. stenotomun* o una especie afín, pero la $2n=48$ no siempre ha sido una variedad de *S. andigenum*. Una especie relacionada con ella de forma muy lejana y que no forma parte de las tuberosas, llamada *S. Acaule*, ha actuado como la planta $2n=48$. Esta especie silvestre se caracteriza por su forma arrosetada. Aparece en las mayores alturas donde pueden crecer las papas, es decir los 4.600 metros, y es muy resistente a las heladas, soportando algunas temperaturas inferiores a los 8° o 10° C bajo cero. Aunque esta especie no es útil desde el punto de vista económico, algunos de sus híbridos con la especie $2n=24$, que han surgido de forma natural, son de gran importancia.

De entre estos híbridos la especie más conocida es la *S. juzepczukii* ($2n=36$), de la que existen distintas variedades. Este híbrido procede del cruce de *S. acaule* y *S. stenotomun*, es muy resistente a las heladas y por esta razón los nativos que habitan en las zonas más altas de los Andes, incluso en la región de las "nieves perpetuas", la han cultivado como una de sus principales fuentes de alimentación.

Estas especies que crecen a estas elevadas latitudes se caracterizan por producir tubérculos que son insípidos o amargos, y se emplean normalmente para la elaboración del chuño.

Es posible que *S. acaule* haya participado en otro cruzamiento que ha tenido como resultado la creación de una especie de gran valor económico, la *S. curtilobum*, especie pentaploide que se cultiva en los altiplanos de Perú y Bolivia, es un tipo especialmente duro que muestra un grado de resistencia a las heladas considerable, también empleados sus tubérculos en la elaboración de chuños.

Respecto a las especies tetraploides, Hawkes señala que la duplicación de una o más de una de las especies originarias $2n=24$ de la región del lago Titicaca daría lugar a las especies tetraploides con 48 cromosomas, entre ellas la *S. tuberosum* subsp. andígena que agrupa a aquellas papas introducidas en Europa en el siglo XVI procedentes de las montañas andinas y que se caracteriza por que forma tubérculos en un periodo de días cortos. Se considera que a partir de esta subespecie evolucionó la subespecie *tuberosum* que abarca a aquellos tubérculos que se cultivan en la actualidad de manera mayoritaria en Europa y que proceden de un proceso de selección de aquellos primeros tubérculos llegados al continente y que se caracterizan por su adaptación durante el proceso de tuberización a días largos.

Por último destacar la especie triploide *S. chaucha* originada también por un proceso de hibridación entre las especies *S. andigenum* y *S. stenotomun*.

División: Spermatohyta

Subdivisión: Magnoliophytina

Clase: Magnoliatae

Subclase: Asteridae

Orden: Scrophulariales

Familia: Solanaceae

Género: Solanum

Especie: *S. Tuberosum*

Subespecie: *S. Tuberosum* subsp. andígena.

II.2.2 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA GENERAL DE LA PLANTA DE LA PAPA

La planta de la papa es de consistencia herbácea, y aunque su hábito de crecimiento ofrece variaciones en función de la variedad que consideremos (erectas, rastreras, etc.) todas presentan unos caracteres morfológicos similares que pasamos a describir (Fig.3):

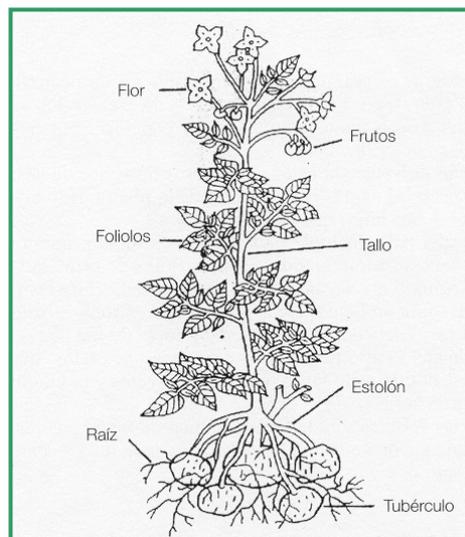


Fig. 3 Partes de una planta tipo de papa (Alonso, 1996).

Hojas.- Compuestas, alternas, dispuestas sobre el tallo siguiendo una filotaxia espiralizada, con una espiral generatriz que gira frecuentemente en sentido siniestro. En la base de cada pecíolo se encuentran dos ojuelos laterales denominados "*seudostípulas*". Su forma y tamaño, así como el ángulo de inserción del pecíolo en el tallo, son caracteres distintivos muy útiles en la caracterización varietal. Desde el punto de inserción del pecíolo pueden extenderse hacia abajo las alas o costillas del tallo (López-Linaje, 1991).

Las hojas poseen abundantes y variados pelos epidérmicos o tricomas. Estos no sólo tapizan la superficie foliar sino que se extienden por toda la superficie de la parte aérea de la planta. La variabilidad en la forma de las

hojas entre las muchas especies y variedades de papa es otro de los caracteres utilizados en la caracterización varietal (Rousselle *et al.*, 1999).

Las hojas presentan una nerviación de tipo reticulado, con una mayor densidad de nervios hacia el borde del limbo. Están formadas por grandes folíolos laterales insertos por pares a lo largo del raquis y terminando en un folíolo único. Son pues, como señalamos, compuestas imparimpinnadas. Sin embargo, las hojas primarias de plántulas, así como, las primeras hojas provenientes del tubérculo pueden ser simples (Hooker, 1980). Además de estos folíolos primarios, las hojas pueden presentar también folíolos secundarios, intercalares (entre cada par de folíolos primarios) y folíolulos que se insertan sobre la base de los folíolos primarios. Respecto a la distribución de los estomas en la superficie de las hojas, son más numerosos en el haz de la hoja que en el envés (Hooker, 1980).

Tallos.- Los aéreos son de porte herbáceo, de color verde, ramificados y pigmentados en mayor o menor medida. El corte de la sección transversal del tallo es hueco y triangular. A menudo en los márgenes laterales se forman alas o *costillas*, que pueden ser rectas, onduladas o dentadas siendo éstos caracteres varietales. Las yemas que se forman en el tallo pueden dar lugar a tallos laterales, inflorescencias o estolones, éstos últimos se tratan de tallos que crecen horizontalmente por debajo del suelo. Su longitud es variable de acuerdo a las especies. A partir de los estolones se forman los tubérculos por un engrosamiento de extremo terminal. Cuando los estolones no se encuentran cubiertos de tierra, en vez de tubérculos se desarrolla un tallo vertical con follaje normal.

Inflorescencias.- Las flores están agrupadas en una inflorescencia cimosa, situada en la extremidad del tallo. De las ramas de la inflorescencia salen los "pedicelos", en cuyas puntas superiores se encuentran los cálices. Cada pedicelo tiene una articulación por la cual se desprenden del tallo las flores o los frutos. Esta articulación es pigmentada en algunas variedades. La posición de la articulación es uno de los caracteres taxonómicos más útiles.

La flor, muy característica de la familia de las Solanáceas, es actinomorfa y pentámera y presenta: 5 sépalos soldados en la base de un cáliz gamosépalo; 5 pétalos igualmente soldados en una corola gamopétala con coloración diversa, 5 estambres en un solo ciclo, alternando con los pétalos y fijados sobre el tubo de la corola. Las anteras están unidas entre sí, formando un manguito en cuyo centro se destaca un estilo único. Su dehiscencia es poricida (cada una de ellas tiene 2 poros en su extremidad), lo que es característica particular del género *Solanum*. Un ovario súpero formado por dos carpelos soldados orientados oblicuamente en relación con el plano medio de la flor.

Frutos y semillas.- El fruto es una baya esférica u ovoidal de 1-3 cm. de diámetro, de color verde o pardo violáceo que se torna amarillenta en la madurez. Contiene generalmente varias decenas de pequeñas semillas, aplastadas, reniformes, bañadas en una pulpa mucilaginosa que proviene de la transformación del endocarpio del fruto. La semilla es albuminada, con un embrión enrollado (característico de la subfamilia de las solanoidea). Las variedades se diferencian por su aptitud para formar frutos y su pigmentación son igualmente variables (Rousselle *et al.*, 1999).

Tubérculos.- Los tubérculos son tallos modificados que constituyen los principales órganos de almacenamiento de la planta. Se forman en el extremo del estolón, como consecuencia de la acumulación de reservas que se produce al tiempo que el rápido desarrollo y división celular, conduciendo este desarrollo a un aumento de hasta 64 veces el volumen celular (Alonso, 1996).

Un corte longitudinal de un tubérculo muestra los siguientes elementos de fuera a dentro:

- La epidermis que protege al tubérculo contra daños mecánicos. Regula el intercambio de agua y gases y permite o excluye la posibilidad de penetración de patógenos. Tiene capacidad de regeneración por medio de la cicatrización. En cuanto a su

aparición, su color puede variar entre blanco-crema, amarillo, rojo o morado, de acuerdo con la especie y la variedad. Sobre su superficie se disponen de manera dispersa los estomas y debajo de ellos se forman las lenticelas responsables del intercambio gaseoso. En condiciones de humedad estas lenticelas se distinguen como puntos blancos prominentes.

- Inmediatamente debajo de la epidermis se sitúa la corteza. Es una banda delgada de tejido de reserva, rica en proteínas y almidón.
- Un sistema vascular que conecta los ojos del tubérculo entre sí y al tubérculo con otras partes de la planta. Dentro del anillo vascular, se encuentra el parénquima de reserva, que es el tejido principal de almacenamiento y ocupa la mayor parte del tubérculo. La médula ocupa la parte central.

En la superficie de la epidermis se encuentran los "ojos", de donde surgen los brotes que darán lugar a la nueva planta. Se distribuyen sobre la superficie del tubérculo en espiral, concentrándose hacia el extremo apical. Estos "ojos" se encuentran rodeados por unas protuberancias denominadas "cejas". El número de ojos por tubérculo varía mucho dependiendo de distintos factores como pueda ser: variedad, calibre del tubérculo, condiciones de crecimiento del cultivo, etc. Los ojos del tubérculo se corresponden morfológicamente a los nudos de los tallos, las cejas a las hojas y las yemas de los ojos, a las yemas axilares. Las yemas de los ojos pueden llegar a desarrollarse para formar un nuevo sistema de tallos principales, tallos laterales y estolones. Por lo general, cuando el tubérculo madura las yemas de los ojos entran en estado de reposo deteniendo su desarrollo. Al cabo de un tiempo, que depende de la variedad (unos tres meses promedio), las yemas de los ojos salen del estado de reposo y desarrollan los brotes o "grelos" del tubérculo (Fig. 4).

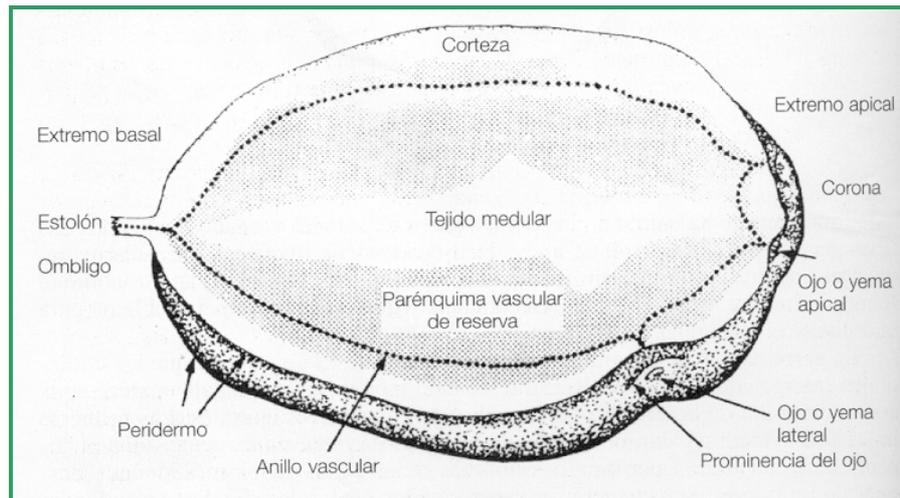


Fig 4. Partes de un tubérculo de papa. (W.J. Hooker, 1980).

En lo que al proceso de tuberización se refiere, éste se ve afectado por factores ambientales como la temperatura y el número de horas de luz diarias. La tuberización se adelanta con temperaturas bajas y por el contrario se retrasa con temperaturas altas. En cuanto al fotoperiodo, podemos decir que las papas cultivadas en zonas con días largos tuberizan más tarde que las cultivadas en zonas con días cortos. En el caso de *Solanum andigenum*, fotoperiodo cortos (12 horas de luz diarios) son un requisito indispensable para que se produzca la tuberización. Con respecto a los factores químicos que influyen en el proceso, las giberelinas estimulan el desarrollo de estolones, que es el lugar donde normalmente se forman los tubérculos, pero inhiben la formación de tubérculos propiamente dichos. Se considera así que la formación de tubérculos parece estar asociada con un bajo nivel de giberelinas endógenas (Alonso, 1996).

II.2.3 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIEDADES EN ESTUDIO

III.2.3.1 Variedad Mora

De acuerdo con Gil (1997) esta variedad se localiza únicamente en caseríos de las montañas de Anaga donde su cultivo es tradicional, aunque actualmente meramente testimonial. Recibe los nombres de papa de Cho Venancio o Moruna, papa de Juan Álvarez, Brasileña o Grasienseña. Es una papa que soporta muy bien los períodos de sequía y son muy productivas, en cambio despiertan una especial atracción entre los roedores. Dada su gran consistencia, una vez se enfrían son prácticamente incomibles, lo que ha hecho que este cultivo esté a punto de desaparecer. Sin embargo, es esta característica culinaria lo que justifica en parte su conservación en la actualidad. Su alta cantidad de materia seca la hace un candidato para los programas de mejora.

Como características del cultivo habría que resaltar que se aguanta mucho en la tierra (más de cinco meses); y que los tubérculos tienen un periodo de latencia bastante largo, de unos 97 días, aspecto éste que permitía su consumo mucho tiempo después de su cosecha (Gil, 1997).

Es una planta de hábito decumbente, con tallos verdes densamente punteados de rojo, provistos de alas onduladas. La pigmentación antociánica de los tallos se torna más intensa en el lugar más elevado de su evaluación. Hojas débilmente diseccionadas con 4-5 pares de foliolos laterales y generalmente 2-3 (en ocasiones 4 o más) de interhojuelas dispuestas sobre el raquis. La floración es escasa, emitiendo flores con pedicelo pigmentado debajo de la articulación y cáliz verde, densamente pigmentado. Corola pentagonal de color violeta pálido con acúmenes blancos en el haz y bandas blancas en el envés. Fruto raramente presente, de color verde con manchas pigmentadas y forma globosa.

Los tubérculos son de carne blanca, con ojos de profundidad media, y formas normalmente ovales y oblongas (Fig. 5). Los grelos o brotes se muestran de color violeta con el ápice blanco-verdoso. La piel coloreada con un salpicado no uniforme blanco-crema oscuro y rojo-morado, este último

color se oscurece y concentra sobre los ojos y a su alrededor. Tanto los ojos como las cejas se encuentran teñidos de morado pálido. Su número cromosómico es de $2n=4x=48$ (Gil *et al.*, 2000).



Fig. 5. Tubérculos de la variedad Mora.

II.2.3.2 Variedad Borralla

Si bien el nombre de Borralla parece ser el más tradicional, también es conocida con los nombres de Melonera o Montañera (Álvarez y Gil; 1996). La variedad Borralla es quizás una de las que mayor versatilidad presenta a la hora de acomodarse a diferentes zonas de cultivo, pues hasta en la medianía sureña de Tenerife hay reminiscencias de este cultivo. Papa muy común en las montañas de Anaga (Gil, 1997). Aunque su presencia ha quedado en la actualidad reducida a los Macizos de Anaga y Teno y sus áreas respectivas de influencia, con anterioridad su distribución hubo de comprender toda la medianía norte de Tenerife.

Son papas de mucha resistencia a la sequía y muy apreciadas tanto por su calidad como por su productividad. Los tubérculos de esta variedad

presentan un periodo de latencia de 119 días, por encima de los tubérculos de la variedad Mora.

Es una planta de hábito decumbente, con tallos verdes escasamente punteados de rojo y provistos de alas onduladas. Sus hojas son débilmente diseccionadas con 5-6 (raramente 4) pares de foliolos laterales y 4 o más pares de interhojuelas dispuestas sobre el raquis. La floración es escasa o inexistente. Flores con pedicelo ligeramente pigmentado en toda su longitud y en la articulación, y cáliz suavemente pigmentado (en ocasiones verde con algunas manchas). Corola pentagonal de color lila pálido con acúmenes blancos en el haz y bandas blancas en el envés. Frutos de color verde con manchas pigmentadas y ocasionalmente puntos blancos, y de forma globosa.

Tubérculos redondos, comprimidos u oblongos, casi siempre irregulares, con ojos de profundidad media, carne amarilla y grelos o brotes de color rosado con el ápice blanco-verdoso (Fig.6). Peridermo amarillo (en todos sus tonos) e incluso naranja, con ojos coloreados de rosado; esta misma coloración suele presentarse alrededor de los ojos apicales del tubérculo. Su dotación cromosómica es $4x=48$ (Gil *et al.*, 2000).



Fig.6. Tubérculos de la variedad Borralla.

III.2.3.3 Variedad Torrenta

Asociada su siembra tradicionalmente al día de Reyes, es también conocida como Terrenta o Turrenta. Según Gil (1997), apenas se haya en cultivo hoy en día y sólo es relativamente abundante en la Esperanza y alrededores. Es apreciada tanto por su gusto como por su largo periodo de reposo (156 días), que posibilita su consumo muchos meses después de la cosecha. Los tubérculos en cuanto a textura, aroma y sabor muestran una calidad excelente. Sin embargo, presenta ciertas características agronómicas como el ser "añeras" y producir los tubérculos muy próximos a la rama, que han llevado a disminuir su presencia en los campos, por lo que dificulta su cosecha, viéndose sustituida por variedades venidas recientemente desde Venezuela, de similares características pero más productivas y constantes (Gil, 1997).

Es una planta de tallos semierectos, teñidos de color morado salvo algunos nudos y las alas, siendo estas últimas rectilíneas. Hojas débilmente diseccionadas, portadoras de 4 o 5 pares de folíolos laterales primarios, 4 o más pares de interhojuelas sobre el raquis. Floración profusa, pedicelos pigmentados a lo largo de su articulación. Cáliz verde con abundantes manchas concentradas hacia el acúmen de los sépalos y a lo largo de su parte central. Corola pentagonal, violeta pálido con acúmenes de color blanco en ambas superficies. Ovario con pigmentación en las paredes internas. Fruto de forma globosa, verde con manchas pigmentadas.

Muestras tubérculos con carne de color amarillo claro, ojos de profundidad media, grelos o brotes con coloración violeta y ápice blanco-verdoso, alternando formas comprimidas, redondas e incluso ovals. Piel morado oscuro, casi negro, con áreas de color rojo-morado oscuro alrededor de los ojos (Fig.7). Número cromosómico $2n=4x=48$ (Gil *et al.*, 2000).



Fig. 7. Tubérculos de la variedad Tormenta.

CAPÍTULO III

ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO*

III. ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO*

III.1 FASE DE ESTABLECIMIENTO

III.1.1 MATERIAL

Para el desarrollo de los protocolos de establecimiento y multiplicación *in vitro* partimos de los brotes o “grelos” de tubérculos de las variedades Tormenta, Borralla y Mora cedidos por el Servicio de Agricultura del Cabildo Insular de Tenerife. Este material se encuentra debidamente caracterizado dentro de la colección que dicha institución mantiene en el CCBAT (Centro de Conservación de Biodiversidad Agrícola de Tenerife). Por cada una de las variedades se diferencian dos entradas referidas a localidades diferentes donde dicha variedad se cultiva. Así, de la variedad Borralla se contó con las entradas 33 (Las Carboneras, La Laguna) y 18 (Teno Alto, Buenavista); de la variedad Mora; las entradas 37 (Roque Negro, Santa Cruz) y 56 (Las Carboneras, La Laguna) y de la variedad Tormenta las entradas 11 (La Esperanza, El Rosario) y 61 (Barranco Las Lajas, Tacoronte) (Tabla 8).

Se realizaron dos entregas de material espaciadas por un periodo de tiempo de un año. Con la primera entrega se realizan los estudios pertinentes para evaluar el protocolo de esterilización y el medio de cultivo más adecuado durante la fase de establecimiento. Con la segunda entrega de material, y una vez determinado el protocolo de esterilización y el medio de cultivo adecuado en la fase de establecimiento, se analizan los comportamientos *in vitro* de las variedades en estudio considerando las variedades por entradas (Tabla 8) y se mantienen diferenciados de esta manera para los sucesivos estudios de: análisis de determinación de la carga vírica y experiencias de saneamiento.

<i>VARIEDAD</i>	<i>ENTRADAS</i>	<i>LOCALIDAD</i>
MORA	37	Roque Negro, Santa Cruz
	56	Las Carboneras, La Laguna
BORRALLA	18	Teno Alto, Buenavista
	33	Las Carboneras, La Laguna
TORRENTA	11	La Esperanza, El Rosario
	61	Barranco Las Lajas, Tacoronte

Tabla 8. Entradas en estudio por cada una de las tres variedades y localidad de recolección de cada una de ellas.

III.1.2 METODOLOGÍA

III.1.2.1 Esterilización del material vegetal

El cultivo *in vitro* de órganos y tejidos vegetales requiere condiciones asépticas, por lo que es necesario realizar una esterilización tanto del material vegetal de partida como de los útiles que se emplearán a lo largo de este proceso. En este apartado describiremos los ensayos realizados en relación a la esterilización del material vegetal.

Dos protocolos de esterilización, que denominaremos como E1 y E2, fueron ensayados (Fig. 8). El protocolo E1 es el empleado en nuestro laboratorio de manera rutinaria. El protocolo E2 se diferencia de éste, principalmente, en que se realiza un tratamiento previo con un fungicida y la concentración a la que se emplea el agente esterilizante es mayor. A continuación pasamos a describir el protocolo de esterilización que de manera rutinaria se emplea en nuestro laboratorio (E1) al tiempo que iremos detallando los aspectos en los que el protocolo E2 se va diferenciando.

Dada la naturaleza del material de partida, antes de la esterilización es necesario un lavado enérgico con el fin de eliminar restos de suelo que hubieran podido quedar adheridos. Para ello los grelos son escindidos del tubérculo y sumergidos en un recipiente conteniendo agua y unas gotas (10-20/l) del detergente Tween 80 por un tiempo aproximado de unos 40 minutos. El Tween 80 es un agente mojante que disminuye la tensión superficial

permitiendo un mejor contacto entre la solución acuosa y la superficie del objeto inmerso en ella (Pierik, 1990).

En el caso del protocolo E2 intercalamos a continuación del lavado un tratamiento con un fungicida polivalente, sistémico, de amplio espectro (Cedkudazin 50PM; Agroindustrial S.A.) cuyo principio activo es la carbendazima; a una concentración de 2 g/l, por un tiempo de 45 minutos, previo a la esterilización superficial y al tratamiento con el agente esterilizante.

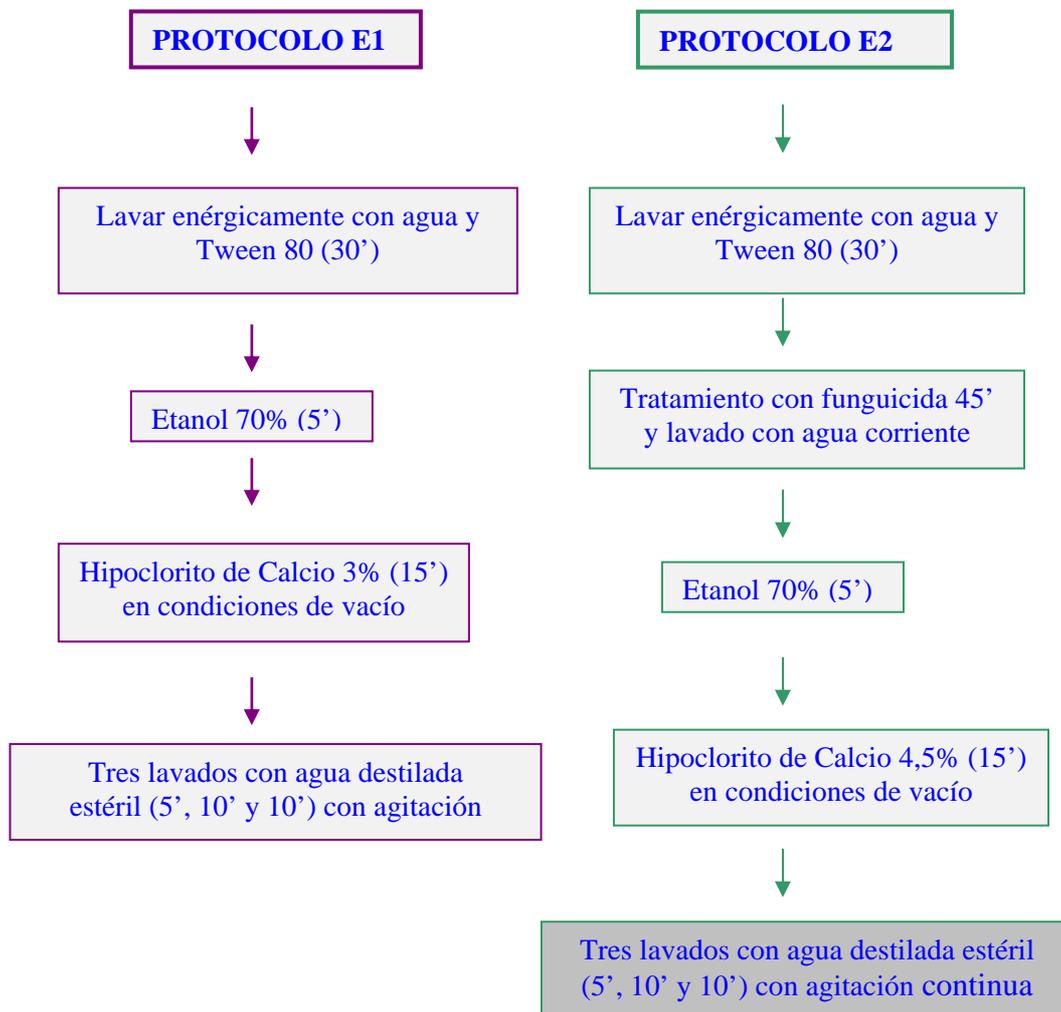


Fig. 8. Esquema de los protocolos de esterilización E1 y E2 ensayados durante la fase de establecimiento del cultivo *in vitro*.

Posteriormente, el material fue sometido a una pre-esterilización superficial con etanol al 70 % durante 5 segundos. El paso por etanol precede al tratamiento con el agente esterilizante para mejorar el contacto de éste con la superficie del tejido. El etanol elimina las ceras y resinas hidrófobas que protegen a los microorganismos del contacto con los esterilizantes acuosos. El tiempo de exposición del material vegetal al etanol depende del tipo de material, ya que éste puede ser muy tóxico, y producir una desecación de los tejidos (Bonga y Von Aderkas, 1992). Lo más frecuente es mantener los segmentos sumergidos durante 5-30 segundos en etanol al 70-75 % (Evans *et al.*, 1983). El etanol se utiliza, normalmente, a estas concentraciones porque el etanol al 96 % utilizado en la esterilización de mesas e instrumentos produce excesiva deshidratación de los tejidos (Pierik, 1990).

A pesar de que el etanol es un potente fitotóxico, no acaba con todos los microorganismos, por lo que, tras el paso por el alcohol el material debe ser sometido a un tratamiento con un agente esterilizante (Bonga y Von Aderkas, 1992). Los agentes esterilizantes más comunes son el hipoclorito cálcico y el hipoclorito sódico. En nuestro caso se empleó el hipoclorito cálcico ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) en lugar del hipoclorito sódico (NaClO), dada la especial sensibilidad de muchas plantas a este otro agente esterilizante (Pierik, 1990). Además, las sales de calcio presentan la ventaja de que penetran en los tejidos con más lentitud que el hipoclorito sódico.

Se preparó una solución de hipoclorito cálcico al 3 % en el protocolo E1 y al 4,5 % en el protocolo E2 (Fig. 9). La solución de hipoclorito es filtrada y el líquido clarificado es dispensado en botes de cristal añadiéndose unas gotas de Tween 80. Los brotes o grelos permanecieron sumergidos en el agente esterilizante durante 15 minutos, bajo condiciones de vacío. Para hacer vacío se introdujeron los recipientes en un desecador y se conectó a una bomba de vacío, aumentándose así la eficacia del proceso de esterilización (Fig. 9). También es una práctica aconsejable agitar o remover vigorosamente la solución para hacer llegar el agente esterilizante hasta las zonas de difícil acceso del material vegetal (Pierik, 1990; Bonga y Von Adrekas, 1992).



Fig. 9 Desecador conectado a la bomba de vacío.

Finalmente, después de la esterilización con hipoclorito cálcico, éste fue eliminado, y el material sometido a tres lavados sucesivos con agua destilada estéril para eliminar los restos del agente esterilizante (Pierik, 1990). El primero de ellos rápido (1 minuto) y los otros dos más largos (10 minutos cada uno de ellos con agitación continua). Los restos del hipoclorito cálcico dada su naturaleza no sólo son tóxicos para el explanto, por que pueden interferir, por ejemplo, alterando el metabolismo de los aminoácidos (Bonga y Durzan, 1982), sino que también destruye componentes esenciales del medio nutritivo, por ejemplo, la tiamina (Bonga y Von Aderkas, 1992).

III.1.2.2 Esterilización útiles y materiales.

Todos los útiles y materiales para la siembra fueron esterilizados siguiendo las indicaciones de Dodds y Roberts (1982), en una autoclave vertical Selecta Autotester (Mod. 437-G) a 1 atm de presión por un tiempo de 20 minutos (Fig. 10).

El autoclave esteriliza por medio de calor húmedo, más efectivo a la hora de eliminar microorganismos que el calor seco. Este calor húmedo es proporcionado por vapor de agua a presión (Bonga y Von Aderkas, 1992; Collins y Edwards, 1998), y siempre que el tiempo de exposición sea suficiente pueden destruirse todos los microorganismos. La esterilización depende del

tiempo, presión, temperatura y del objeto que se va a esterilizar. Los medios nutritivos deben de ser esterilizados de forma separada al vidrio, papel, etc.; normalmente a una temperatura de 121 °C y presión de 103.5 Kpa.



Fig. 10. Autoclave vertical Selecta Autotester (Mod. 437-G).

III.1.2.3 El medio de cultivo

III.1.2.3.1 *Composición del medio de cultivo*

El medio nutritivo es un factor importante en el cultivo *in vitro* de células y tejidos (Bonga y Von Aderkas, 1992). La función principal de muchos componentes del medio es nutricional, es decir, proporciona energía o sirve de base para la formación de otras moléculas esenciales de las células vegetales. Sin embargo, algunos componentes tienen también funciones que no son nutricionales y a veces son de naturaleza más física que química (Dodds y Roberts, 1982). Así un medio de cultivo debe de contar con las sales minerales, estar suplementado por una fuente de carbono, vitaminas, un aporte hormonal y una agente gelificante que le permita dar consistencia al medio.

a) Sales Minerales

Existen más de 200 medios de cultivo para el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Los medios para cultivo *in vitro* son herederos de las soluciones nutritivas usadas para el cultivo hidropónico. La gran mayoría de los medios propuestos son modificaciones de estos antiguos medios. Sólo unos pocos son formulaciones originales en su composición y entre ellos cabe destacar los propuestos por: Knudson (1946), Sëller (1953), Murasighe y Skoog (1962), Lismaier y Skoog (1965), White (1964), Gamborg *et al.* (1968), Nitsch y Nitsch (1969), Schenk y Hilderbradt (1972), Lloydand McCown (1981).

De todos ellos la formulación salina del medio de cultivo propuesta por T. Murasighe y F. Skoog en 1962 (Tabla 9) para callos de médula de tabaco, es el medio de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales más empleado en la actualidad y al que denominamos como MS. Este medio de cultivo se caracteriza por tener un contenido muy alto de nitrógeno total (60,017 mmol. L⁻¹) del cual el 34 % está en forma reducida (NH₄⁺, mmol. L⁻¹) y por una concentración igualmente elevada en potasio (20,042 mmol. L⁻¹). El resto de las sales también están a mayor concentración que en el resto de los medios propuestos, si bien en un menor grado que las antes destacadas (Tabla 9).

Esta formulación salina tiende a ser el medio elegido en los protocolos de micropropagación de papa (Mellor y Stacey-Smith, 1977; Henshaw *et al.*, 1980 a,b; Espinoza *et al.*, 1992)

b) Fuente de carbono

Si bien las plantas en su medio natural son por lo general autótrofas, los tejidos vegetales en cultivo *in vitro* son heterótrofos con respecto al carbono, debido a la ausencia o insuficiencia de actividad fotosintética. Con este fin se añaden hidratos de carbono al medio nutritivo. La concentración a emplear depende mucho del tipo y edad del material vegetal, del poder osmótico del azúcar elegido y de la capacidad de asimilación específica que para ella muestre el material vegetal, así como de los objetivos que se persigan. Los azúcares que más se citan como suministro de carbono reducido a los cultivos son sacarosa, glucosa y fructosa.

El azúcar más utilizado es la sacarosa a concentraciones entre el 2 % y el 5 % en el medio. En nuestro caso la concentración de sacarosa empleada tanto para la fase de establecimiento como para la fase de multiplicación fue de 3 %.

c) Vitaminas

Los tejidos de las plantas superiores producen la mayoría de las vitaminas requeridas a lo largo del ciclo de vida por su metabolismo. Sin embargo, bajo las condiciones *in vitro*, la producción endógena de algunas de las vitaminas, en particular la tiamina, es a menudo insuficiente, cuando no inexistente. Por lo tanto, para garantizar un crecimiento óptimo, habitualmente se añade al medio de cultivo, algunas vitaminas como el ácido nicotínico (B₃), la piridoxina (B₆), la tiamina (B₁) y el mioinositol. Otras como el pantotenato de calcio se añaden ocasionalmente, como es en nuestro caso, en una concentración de 2 mg/l.

d) Aporte hormonal

El crecimiento y desarrollo de yemas *in vitro* se ve favorecido además de por los nutrientes propios del medio de cultivo, por el aporte exógeno de un regulador de crecimiento. En este sentido el regulador de crecimiento que de manera más general se emplea en los protocolos de micropropagación de papa es el Ácido Giberélico, GA (Morel y Muller, 1964; Goodwin, 1966, Espinoza *et al.*, 1992 Golmizare y Panta, 1997). Si bien, bajas concentraciones de otros reguladores, como por ejemplo: Kinetina, (KIN), Benciladenina (BA) y ácido indolacético (IAA), en combinación con el ácido Giberélico (GA) pueden ser beneficiosos para el crecimiento y desarrollo de los brotes (Novak, *et al.*, 1980). Altas concentraciones de IAA inhiben el desarrollo de los brotes e inducen a la formación de callo, sin embargo, bajas concentraciones de esta auxina (< 0,4 µM) en combinación con BA o GA promueve el desarrollo vigoroso de brotes y raíces (Gregorini y Lorenzini, 1974; Pennazio y Vecchiati, 1976).

En nuestro caso ensayamos el efecto del GA tanto en la fase de establecimiento como en la fase de multiplicación, a una concentración de 1

mg/l en el medio de cultivo (Espinoza *et al.*, 1992). Además de un medio carente de reguladores de crecimiento y que según trabajos previos realizados en el Departamento da lugar a excelentes resultados en el desarrollo y formación de brotes a partir de grelos, garantizándonos además la integridad genética de nuestro material vegetal (Ravelo, 2002).

e) Agente gelificante

El principal agente gelificante en el cultivo *in vitro* es el agar, que es un polisacárido con una elevada masa molecular procedente de paredes de algas que se usa como agente gelificante en la mayor parte de los medios nutritivos. El agar disuelto forma un gel que es capaz de retener el agua y adsorber compuestos.

La concentración a la que normalmente se emplea el agar es de 0,6 - 0,8 %. Si se utiliza una concentración más baja (0,4 %), el medio nutritivo permanece semilíquido, sobre todo cuando el pH es bajo. Si la concentración es muy alta (1,0 %), el medio nutritivo queda muy sólido, haciendo difícil la inoculación y la nutrición de los tejidos (Pierik, 1990). En el presente trabajo la concentración de agar empleada fue de 0,7 %.

En la siguiente figura (Fig. 11) se esquematiza la composición de los medios de cultivos empleados durante la fase de establecimiento. Ambos medios consisten en la formulación salina de Murasighe y Skoog (1962) enriquecido con sacarosa, pantotenato de calcio y empleando como agente gelificante el agar. Sin embargo, el Medio 2 se diferencia del Medio 1 por el aporte hormonal (Ác. Giberélico); así como de algunas vitaminas (L-Arginina). Este medio de cultivo es el recomendado para la introducción de brotes por Espinoza y colaboradores (1992), si bien se diferencia del mismo en la ausencia de ácido ascórbico, empleado normalmente como agente antioxidante.

MEDIO 1		MEDIO 2	
Sales MS		Sales MS	
Sacarosa	3%	Sacarosa	3%
Pantotenato de calcio	0,02%	Patotenato de calcio	0,02%
		L-Arginina -HCl	4 mg/l
		Ác. Giberélico	1 mg/l

Fig. 11 Esquema de la composición de los medios de cultivo ensayados durante la fase de establecimiento del cultivo *in vitro*.

III.1.2.3.2 *El pH del medio de cultivo*

El pH del medio de cultivo es uno de los factores a tener en cuenta por diversas razones:

1. Valores bajos de pH, inferiores a 3.5, impiden la solidificación por los agentes gelificantes añadidos a los medios.
2. El valor del pH afecta a la solubilidad de muchos componentes del medio de cultivo (Ej.: sales metálicas, carbonatos), así como a la absorción de determinados nutrientes por parte del explanto (Ej.: la absorción de iones NO₃⁻ aumenta con la acidez del medio).
3. El valor del pH del medio puede afectar a la actividad de muchas proteínas de la membrana y ello a su vez afectar al pH celular (Ej.: las invertasas de pared, la familia de las proteínas G).

En general se trabaja a pH entre 5,2 y 5,8 para el medio MS. En concreto, se aconseja un pH entre 5,7 y 5,8 para estos medios.

III.1.2.3.3 *Preparación del medio de cultivo*

Para la preparación de los medios de cultivo es conveniente partir de soluciones concentradas de las sales minerales. A estas soluciones concentradas (10 X y 100 X) se las denomina "soluciones madre" o "soluciones stock".

De manera general se utilizan cinco soluciones madres, solución de macronutrientes A, solución de macronutrientes B, solución de micronutrientes A, solución de micronutrientes B, solución de vitaminas y aminoácidos. La composición y concentraciones en cada una de estas soluciones se muestran en la tabla 9.

Estas soluciones pueden ser sustituidas por diversos preparados que han ido apareciendo en el mercado y que contienen la mezcla de sales y vitaminas en forma granulada. En nuestro caso se emplearon las sales y vitaminas de la casa comercial Duchefa S.L., siendo necesario a la hora de preparar el medio 4,406 g/l de esta mezcla para conseguir la concentración adecuada de sales en los medios de cultivos ensayados.

<i>Solución de Macronutrientes A</i>	<i>mg/l</i>
NH ₄ NO ₃	1650.0
KNO ₃	1900.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.0
KH ₂ PO ₄	170.0
<i>Solución de Macronutrientes B</i>	
Cl ₂ Ca.2H ₂ O	440.0
<i>Solución de Micronutrientes A</i>	
H ₃ BO ₃	620.0
MnSO ₄ .4H ₂ O	2230.0
IK	83.0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25.0
CuSO ₄ .5H ₂ O	2.50
CoCl ₂ .6H ₂ O	2.50
ZnSO ₄ .H ₂ O	860.0
<i>Solución de Micronutrientes B</i>	
FeSO ₄ .7H ₂ O	2780.0
EDTA	3726.0
<i>Solución de vitaminas y aminoácidos</i>	
Glicina	2.0
Tiamina-HCl	10.0
Piridoxina-HCl	50.0
Ac. Nicotínico	50.0

Tabla 9. Composición de la solución de sales propuesta por Murasige & Skoog (1962).

III.1.2.4 La siembra

La siembra de los explantos se llevó a cabo en la cabina de flujo laminar frontal (Modelo ADS LAMINAIRE). En estas cabinas el aire se toma del exterior y se hace pasar a través de un filtro de poro muy fino, antes de que llegue a la mesa de la cámara de inoculación. Este sistema de filtrado asegura que el flujo de aire sobre la mesa sea completamente estéril. Para la esterilización del instrumental se emplea un esterilizador seco (Incinerador eléctrico con perlas a 250 ° C).

El mantenimiento de la esterilidad en la zona de siembra depende de una serie de pautas: esterilizar manos y brazos con alcohol, al igual que toda la superficie interna de la cámara, colocar en la cámara los utensilios esenciales de trabajo (Fig. 12) y mantener las condiciones de esterilidad durante todo el proceso de siembra.

A los explantos le son escindidos los extremos basales y apicales que han estado en contacto directo con el hipoclorito y transferidos al tubo de ensayo. Los explantos son introducidos ligeramente en el medio de cultivo manteniendo la polaridad (Pierik, 1990).



Fig. 12. Cabina de flujo laminar y utensilios de siembra.

III.1.2.5 Condiciones de incubación de los cultivos

Resulta necesario, tanto para la investigación como para la aplicación práctica del cultivo *in vitro*, el disponer de una cámara de crecimiento de cultivo (Fig. 14), en la que se controla la luz, la temperatura, etc. La cámara debe de estar aislada, de manera que no se vea afectada por los cambios externos a ella. La iluminación es suministrada generalmente por tubos fluorescentes.

A la hora de considerar los parámetros que afectan a las condiciones de incubación, debemos tener en cuenta los trabajos realizados por diversos autores dirigidos a establecer las condiciones de incubación más adecuadas de *Solanum tuberosum* L. *in vitro*. Hussey y Stacey (1981) observaron que el grado de elongación y engrosamiento de los segmentos, el número de nudos y la morfología general del brote están afectados por la longitud del día, la intensidad lumínica y la temperatura. Al utilizar un amplio rango de irradiancias obtuvieron un intervalo óptimo entre 120 y 160 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para el desarrollo de brotes. Experimentos similares para estandarizar la temperatura arrojaron un intervalo óptimo entre 20-25° C, bajo luz continua, para la formación de nudos en los cultivares analizados por estos autores (Arian Pilot, Majestic y King Eduard).

Considerando estos antecedentes el material vegetal se mantuvo en la cámara de crecimiento bajo las siguientes condiciones:

CONDICIONES DE INCUBACIÓN	
TEMPERATURA	20° C \pm 2° C
FOTOPERIODO	16 horas de luz y 8 de oscuridad
IRRADIANCIA	110 $\mu\text{Em}^{-2}.\text{s}^{-1}$
TIPO DE LÁMPARAS	Tubos Fluorescentes Blancos (PHILIPS TLD, 58 W/84)
HUMEDAD RELATIVA	50-60 %

Fig. 13. Condiciones de incubación de los cultivos en la cámara de crecimiento.



Fig. 14 Cámara de Cultivo.

III. 1. 3 RESULTADOS DE LA FASE DE ESTABLECIMIENTO.

III.1.3.1 Análisis y discusión de resultados de los protocolos de esterilización

El éxito de un protocolo de esterilización depende del diseño del protocolo en sí, como del estado fitosanitario en el que se encuentre el material de partida.

La eficiencia de los protocolos de esterilización se determinó por el porcentaje de contaminación observado en cada variedad. La figura 15 representa dicho porcentaje para cada una de las variedades en los protocolos de esterilización ensayados.

Observamos que las variedades Mora y Torrenta responden de un modo similar frente a los dos protocolos de esterilización, mientras que en la variedad Borralla los porcentajes de contaminación más elevados se muestran con el protocolo E1 frente al protocolo E2. Estos resultados ponen de manifiesto que el empleo de un protocolo más agresivo (E2) no da lugar a una mejora en los resultados frente al E1 para las variedades Mora y Torrenta. Sin embargo, si se observa una disminución en el porcentaje de contaminación de los explantos de la variedad Borralla tratado con el protocolo E2, si bien estos valores siguen estando por encima del 50 % de contaminación.

Por otro lado, se observan diferencias en el comportamiento entre las variedades. Los porcentajes de contaminación más bajos los presenta la variedad Torrenta para los dos protocolos de esterilización ensayados, seguidos por la variedad Mora, mientras que los porcentajes de contaminación más altos en los dos protocolos de esterilización se presentan en la variedad Borralla.

Las diferencias en el comportamiento de las variedades frente a los protocolos de esterilización ensayados, así como los elevados porcentajes de contaminación obtenidos con los dos protocolos de esterilización ensayados, están relacionados con el estado fitosanitario de los tubérculos utilizados como material de partida. Los tubérculos cedidos en esta primera entrega por el Servicio de Agricultura presentaban un lamentable estado fitosanitario y de conservación, de ellos los que se encontraban en mejor estado fitosanitario eran los de la variedad Torrenta, la cual mostró los porcentajes de contaminación más bajos para los dos protocolos de esterilización ensayados; frente a los de la variedad Mora y Borralla, que presentaban un peor aspecto, un mal estado de conservación en el caso de la variedad Mora y además, en el caso de la variedad Borralla un lamentable estado fitosanitario. Siendo estas dos variedades las que mostraron unos porcentajes de contaminación por encima del 50% para los dos protocolos de esterilización.

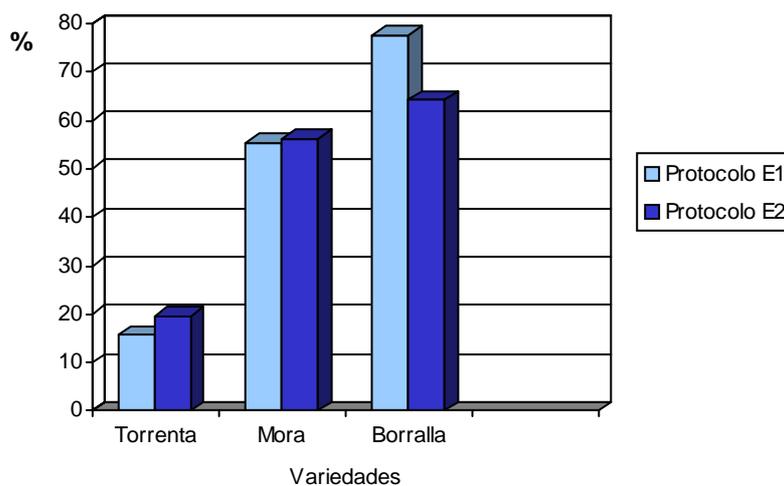


Fig. 15. Porcentaje de contaminación para las tres variedades en estudio con los protocolos de esterilización E1 y E2.

La importancia del estado fitosanitario del material de partida a la hora de introducir material *in vitro* fue comprobada cuando se repite el protocolo de esterilización E1 con una segunda entrada de material. Nuevamente evaluamos el porcentaje de contaminación a nivel de entradas analizadas por cada variedad. Se considera además el porcentaje de éxito del protocolo de esterilización, entendido éste como el porcentaje de plántulas que no desarrollaron contaminación tras el establecimiento *in vitro*. Dichos resultados quedan reflejados en la siguiente tabla.

<i>Variedad</i>	<i>Entradas</i>	<i>% contaminación</i>	<i>% éxito</i>
BORRALLA	33	2.98%	97.02%
	18	4.94%	95.06%
MORA	56	9.02%	90.98%
	37	3.4%	96.6%
TORRENTA	61	2.56%	97.44%
	11	7.57%	92.43%

Tabla 10. Porcentajes de contaminación y porcentajes de éxito observados en las dos entradas analizadas de cada variedad para el protocolo E1.

Como se puede observar, los porcentajes de contaminación obtenidos en la repetición del ensayo con el protocolo E1 son bajos para todas las variedades en estudio, y por tanto los porcentajes de éxito muy por encima de los alcanzados en el ensayo inicial con la primera entrega de material. Los porcentajes de contaminación más altos los obtenemos en la variedad Mora, entrada 56 con un 9,02 %, seguido por la variedad Torrenta, entrada 11 con un 7,57 %. Estos resultados ponen de manifiesto la efectividad del protocolo de esterilización seleccionado, además de la importancia del estado fitosanitario del material de partida.

Comparando estos resultados con los obtenidos en el primer ensayo para este mismo protocolo (Fig. 16) observamos que existen diferencias

significativas en la respuesta del material a un mismo protocolo de esterilización, obteniéndose unos porcentajes de contaminación muy bajos, frente a los valores mostrados en el primer ensayo y que relacionamos directamente con la mala calidad del material suministrado. De este modo se constata la importancia de la fuente de material y de su responsabilidad frente al éxito o fracaso de su utilidad como material de estudio.

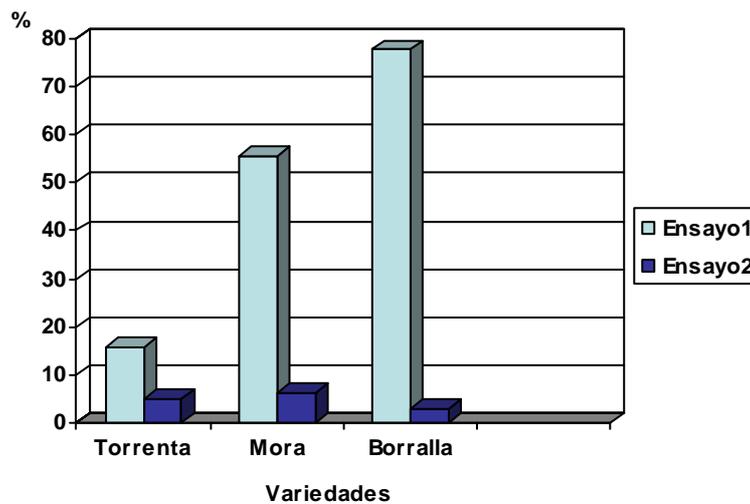


Fig.16 Comparación de los porcentajes de contaminación para el protocolo de esterilización E1 obtenidos en los ensayos de esterilización (1 y 2) para las variedades en estudio.

Podemos deducir además, que el agente esterilizante, hipoclorito de calcio, es adecuado para la esterilización de este tipo de material vegetal, pues ninguna de la variedades mostró señales de toxicidad por el mismo, al no observarse zonas del tejido quemadas ni necróticas. Por su parte, la elección del hipoclorito de calcio como agente esterilizante se fundamenta además, por ser un agente que produce un impacto ambiental bajo, frente a otros agentes como pudiera ser el cloruro de Mercurio (Pierik, 1990). La concentración de hipoclorito cálcico en torno al 3 % parece ser adecuado, pues el aumento de la concentración (4,5 %) no mostró una mejora sustancial. Emplear concentraciones mayores nos obligaría a testar su influencia en las

diferentes fases del protocolo de micropropagación dado que se ha señalado la posibilidad de alteraciones en el material vegetal.

Tras constatar la directa influencia del estado fitosanitario del material vegetal, y en el sentido de mejorar los porcentajes de éxito decidimos emplear una mayor concentración del agente surfactante (Tween 80), aplicar vacío y agitación para mejorar la acción del agente esterilizante. Tal y como esperábamos, esto se tradujo en una mejora en los resultados (Fig. 16).

El empleo de tratamientos previos de saneamiento (Ej.: incubación en soluciones antifúngicas, como en el protocolo de esterilización E2) suelen ser de gran ayuda cuando no se puede obtener material en buen estado de conservación, algo bastante frecuente de acuerdo con las experiencias en nuestro laboratorio. En nuestro caso el uso del agente fungicida, si bien mejoró ligeramente los resultados frente a los observados en las experiencias en que este agente no se empleó, esta mejora no fue sustancial, por lo que para futuros trabajos recomendamos buscar compuesto/s más adecuado/s, así como, realizar tratamientos previos de las plantas madres con tiempo suficiente para que sus efectos sean ya evidentes al escindir los explantos que inicien la línea de cultivo *in vitro* del material.

Tras estas consideraciones, señalamos al protocolo de esterilización E1 como adecuado para la esterilización del material vegetal ensayado, siempre y cuando éste se encuentre en un estado fitosanitario aceptable.

III.1.3.2 Análisis y discusión de los resultados de inducción del cultivo

El desarrollo de un protocolo de micropropagación para papa varía en función del explanto inicial elegido, de la composición del medio de cultivo seleccionado, del aporte hormonal exógeno, así como del tipo de hormona/s empleado. Por ejemplo, el uso de elevadas concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) tiene un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de los brotes, es más, parece desprogramar el patrón morfogénico, desorganizar los tejidos e inducir la formación de callos (Gregori y Lorenzini, 1974; Pennazio y Vecciati, 1976). Sin embargo, a bajas concentraciones y en combinación con giberelinas (GA) o Citoquininas como la benciladenina (BA),

esta auxina promueve el desarrollo vigoroso de brotes capaces de desarrollar raíces espontáneamente, con un efecto mucho menos marcado en cuanto a la callogénesis (Novak *et al.*, 1980).

Experiencias previas realizadas en nuestro Departamento, sobre un medio MS carente de reguladores de crecimiento nos aportaron unos resultados similares a los observados en experiencias realizadas con los reguladores de crecimiento GA₃ y BA (Ravelo, 2002). Además, el no aportar sustancias reguladoras externas garantiza con mayor seguridad la estabilidad del patrón de desarrollo predeterminado en el material.

Sin embargo, otros autores señalan que el empleo de giberelinas durante la fase de establecimiento da lugar a un mejor desarrollo de los brotes (Espinoza *et al.*, 1992; Novak *et al.*, 1992). El Medio 2 se diferencia del Medio 1 en el aporte exógeno de GA, y es un medio que se emplea de manera rutinaria, en los protocolos de micropropagación, en diferentes centros especializados como en el Centro Internacional de la Papa, para la introducción de brotes, así como en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Agraria de La Molina, donde se emplea tanto durante la fase de establecimiento como durante la fase de multiplicación.

Para analizar el comportamiento de las variedades en estudio a lo largo del tiempo de cultivo (30 días), se evaluaron de manera periódica (cada 10 días) tres parámetros: la longitud total del explanto (Long), el número de nuevas yemas formadas (nº nds) y la distancia entre las mismas (Dy). Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS versión 11.5 Windows (Statistical Product ad Service Solutions Ibérica S.L., Licencia de Campus, ULL), realizando una comparación de varianzas (ANOVA; p=0,05). Se comprobó la normalidad de los datos mediante la Prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas con el estadístico de Levene. Los resultados se han representado en la figura 17.

Los análisis muestran que no existen diferencias significativas entre los dos medios de cultivo ensayados respecto a las variables longitud (Long) y distancia entre los nudos (Dy), para la var. Borralla (Fig. 17). Sin embargo, existen diferencias significativas respecto a la variable número de nudos (nº nds); observándose que los valores más altos para esta variable se alcanzan en

el **Medio 1**, con un 6,92 de media, frente al valor medio de 5,71 alcanzado por esta variable en el **Medio 2**.

Por su parte, en las variedades Mora y Torrenta, podemos afirmar que existen diferencias significativas entre los medios de cultivo ensayados respecto a la variable longitud, poniendo de manifiesto que en el **Medio 2** se alcanza excelentes valores para esta variable en ambas variedades. Sin embargo, respecto al número de nudos, a pesar de que estadísticamente existan diferencias significativas entre los medios de cultivo, el análisis de los datos mediante estadísticos descriptivos, al igual que la representación de los valores medios para esta variable (Fig. 17) apunta a que esas diferencias son mínimas, en ambas variedades. Así, para la var. Mora se alcanza un valor medio de esta variable de 6,5 en el Medio 1 y de 7,1 en el Medio 2; mientras que en la var. Torrenta los valores medios de esta variable están en torno a 8 nuevas yemas para ambos medios de cultivo

Podemos considerar, que las diferencias más significativas entre los dos medios de cultivo para estas dos variedades (Mora y Torrenta) las encontramos en la variable longitud total del explanto, observándose que ambas alcanzan los mayores valores en el **Medio 2**, frente al **Medio 1**. Esto nos lleva a considerar que el aporte exógeno de GA en el **Medio 2** parece afectar de un modo significativo al desarrollo del explanto, promoviendo su elongación. Sin embargo el comportamiento de la var. Borralla es contrario al de éstas, mostrando que si bien no hay diferencias en cuanto a la variable longitud en ambos medios; no podemos hacer idéntica afirmación para la variable número de nudos, la cual se ve favorecida en el **Medio 1** frente al **Medio 2**.

Este efecto del ácido giberélico de manera diferencial entre las variedades puede estar relacionado con el contenido endógeno de esta hormona en los explantos empleados para el establecimiento del cultivo. Recordar que esta hormona está ligada al proceso de brotación de los grelos en el tubérculo, y que en caso de tubérculos dormantes, la aplicación de la misma acelera el proceso de brotación. Así, pudiera ser, que dada las diferencias en los periodos de latencia de los tubérculos de las diferentes variedades (mayor periodo de latencia Torrenta (156 días), seguido por

Borralla (119 días) y Mora (97 días)); los tubérculos de las variedades Mora y Torrenta estuvieran en un periodo de brotación menos avanzado que los de la variedad Borralla y por tanto el nivel endógeno de giberelinas fuera bajo y por consiguiente, el aporte exógeno que se realiza durante el establecimiento del cultivo *in vitro* sea significativo; mientras que los tubérculos de la variedad Borralla, podrían encontrarse en un estado más avanzado del proceso de germinación, con lo que el nivel endógeno de giberelinas esté más alto y por tanto los explantos no se vean estimulados por el aporte exógeno de esta hormona en el medio de cultivo durante la fase de establecimiento *in vitro*. Si bien habría que considerar si estos tubérculos estuvieron sometidos a las mismas condiciones de conservación, pues variaciones en estas condiciones también influyen en estos periodos de latencia.

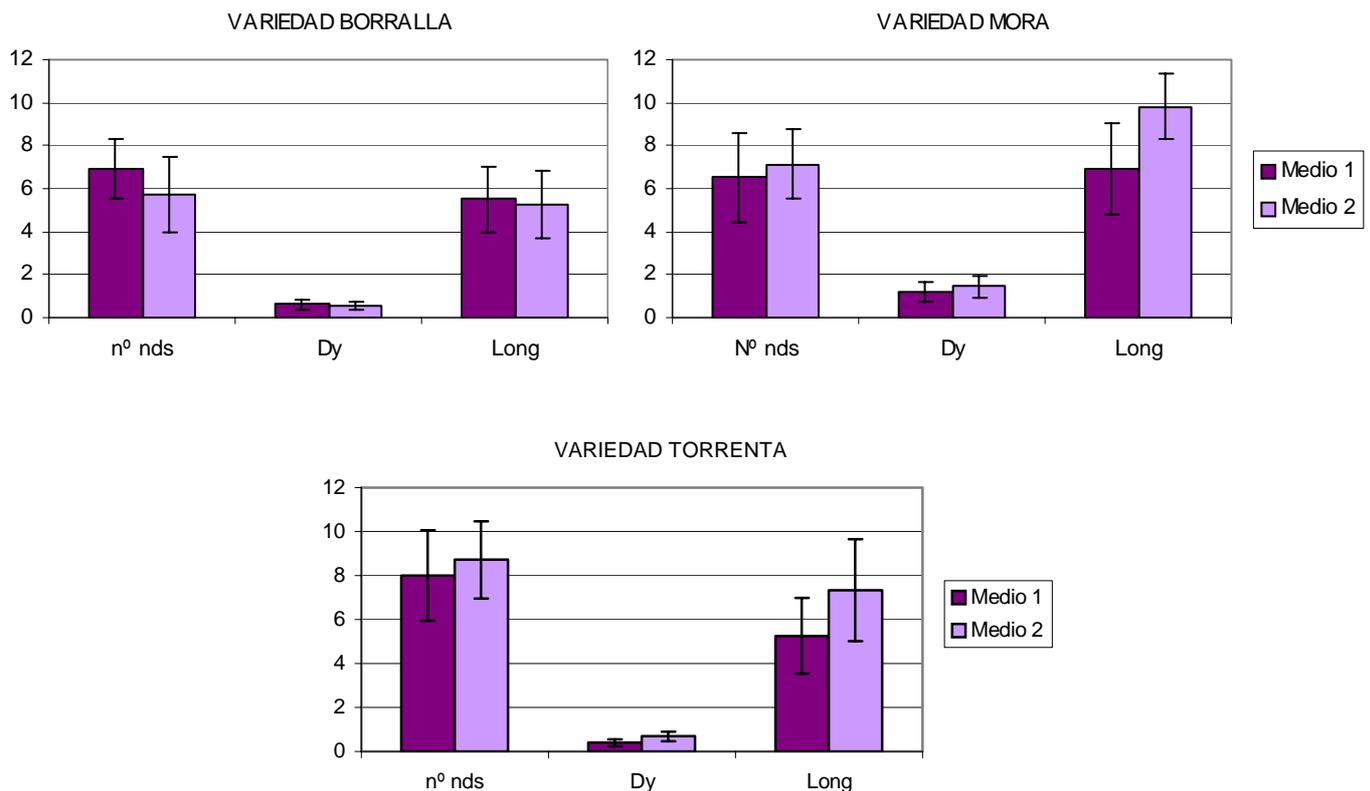


Fig.17 Representación de los valores medios de las variables número de nudos (nº nds), distancia entre nudos (Dy) y longitud total del explanto (Long) junto con sus desviaciones estándar para las tres variedades en cada uno de los medios ensayados durante la fase de establecimiento (Medio 1 y Medio 2).

Analizando el comportamiento de las variedades sobre cada medio de cultivo por separado (Fig. 18) comprobamos que en el **Medio 1** existen diferencias significativas entre las variedades respecto a su respuesta, y que vemos reflejado en los valores que muestran las tres variables en estudio. Así la var. Tormenta es la que alcanza los valores más altos para la variable nº de nudos (nds). Mientras que es la var. Mora en la que se observan los valores máximos para las variables Dy y Long en este medio (Fig. 18). Un comportamiento similar de las variedades se observa sobre el **Medio 2**, donde la var. Tormenta alcanza nuevamente los máximos valores para la variable número de nudos y la var. Mora para las variables Dy y Long, si bien en este caso las diferencias entre los valores alcanzados por las variables en estudio entre las variedades son más significativas (Fig. 18).

Podemos considerar así que el Medio 1 parece adecuado para la fase de establecimiento *in vitro* a partir de brotes de tubérculos, pues además de los resultados reseñados anteriormente observamos que los explantos desarrollados sobre este medio mostraban un buen desarrollo de raíces así como un desarrollo vigoroso de los brotes, frente a aquellos desarrollados en el Medio 2. Hemos de considerar, por otro lado, que las diferencias respecto a la variable número de nudos son mínimas entre los **Medios 1 y 2**, poniendo de manifiesto el bajo efecto que el giberélico tiene sobre esta variable y que el **Medio 1**, por ser un medio carente de reguladores de crecimiento, nos aporta una mayor protección de la integridad genética de nuestro material de trabajo.

Resultados similares han sido observados por otros autores, Hussey y Stacey (1981) con las variedades *Arran Pilot*, *Majestic* y *King Edward* obtuvieron, al igual que para nuestras variedades, brotes enraizados sobre un medio MS carente de reguladores de crecimiento. Posteriormente, Garner y colaboradores (1989) en su trabajo sobre la inducción y el desarrollo de microtubérculos *in vitro*, obtuvieron plántulas de papa a partir de brotes de tubérculos de la variedad británica *Maris Piper* tras cuatro semanas de cultivo sobre un medio MS libre de reguladores. Harvey y colaboradores (1994) estudiando el papel del ácido Absícico en el proceso de enraizamiento

utilizaron como material de partida brotes de tubérculos sobre un medio MS sin aporte exógeno de reguladores de crecimiento obteniendo también excelentes resultados. Más recientemente, Zobayed y colaboradores (2001) obtienen a partir de brotes de tubérculos plántulas de papa hasta con cinco nuevas yemas utilizando un medio MS sin reguladores de crecimiento durante la fase de establecimiento, valores muy similares a los obtenidos en la var. Borralla, pero muy por debajo a los logrados en la variedad Mora o Torrenta.

Podemos concluir, que el uso del medio MS sin aporte de reguladores de crecimiento da lugar a brotes con entre 5 a 8 nuevas yemas enraizadas.

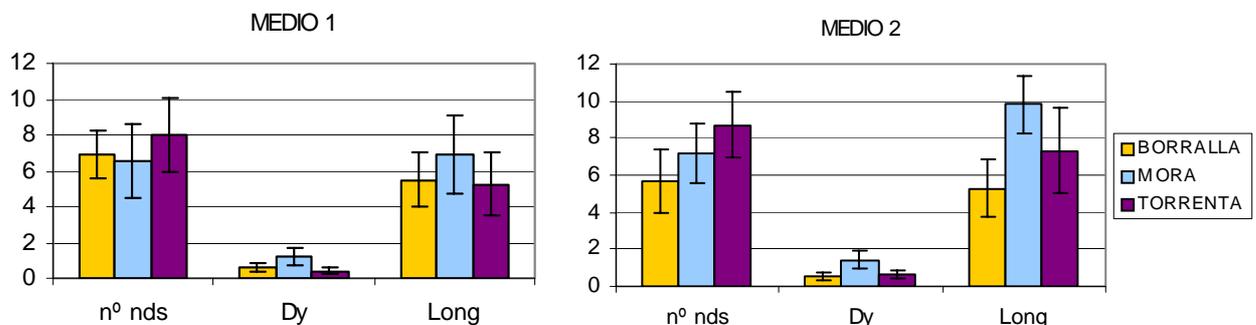


Fig. 18. Representación gráfica de los valores medios de las variables número de nudos (nº nds), distancia entre nudos y longitud total del explanto junto con las desviaciones estándar en los dos medios de cultivos ensayados durante la fase de establecimiento (Medio 1 y Medio 2) para cada una de las variedades en estudio.

Considerando el **Medio 1** como un medio de cultivo adecuado para introducir material de papa *in vitro*, se ensaya este mismo medio para realizar el establecimiento *in vitro* de la segunda entrega de material y determinar si existen diferencias significativas a nivel de las entradas de cada una de las variedades en estudio, pues al proceder de distintas localizaciones su comportamiento *in vitro* podría ser diferencial.

Del mismo modo que se procedió en la experiencia anterior evaluamos la evolución del cultivo mediante tres parámetros: longitud (Long), distancia entre nudos (Dy) y número de nudos (nº nds), cada diez días durante el tiempo de cultivo (30 días). Igualmente los datos fueron analizados con el paquete

estadístico SPSS versión 11.5 Windows (Statistical Product ad Service Solutions Ibérica, SL, Licencia de Campus, ULL), realizando una comparación de varianzas (ANOVA; $p=0,05$). Se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas con el estadístico de Levene.

En la figura 19 se representan los valores medios de estas variables junto a sus desviaciones estándar. Observamos que no existen diferencias significativas para las variables número de nudos (n° nds) y distancia entre nudos (Dy) entre las entradas analizadas para cada una de las variedades. Sin embargo, se presentan diferencias significativas para la variable longitud (Long) entre las entradas de las variedades Mora y Torrenta. Siendo superior los valores en la entrada 56 frente a la entrada 37 de la var. Mora y la entrada 61 frente a la 11 de la var. Torrenta.

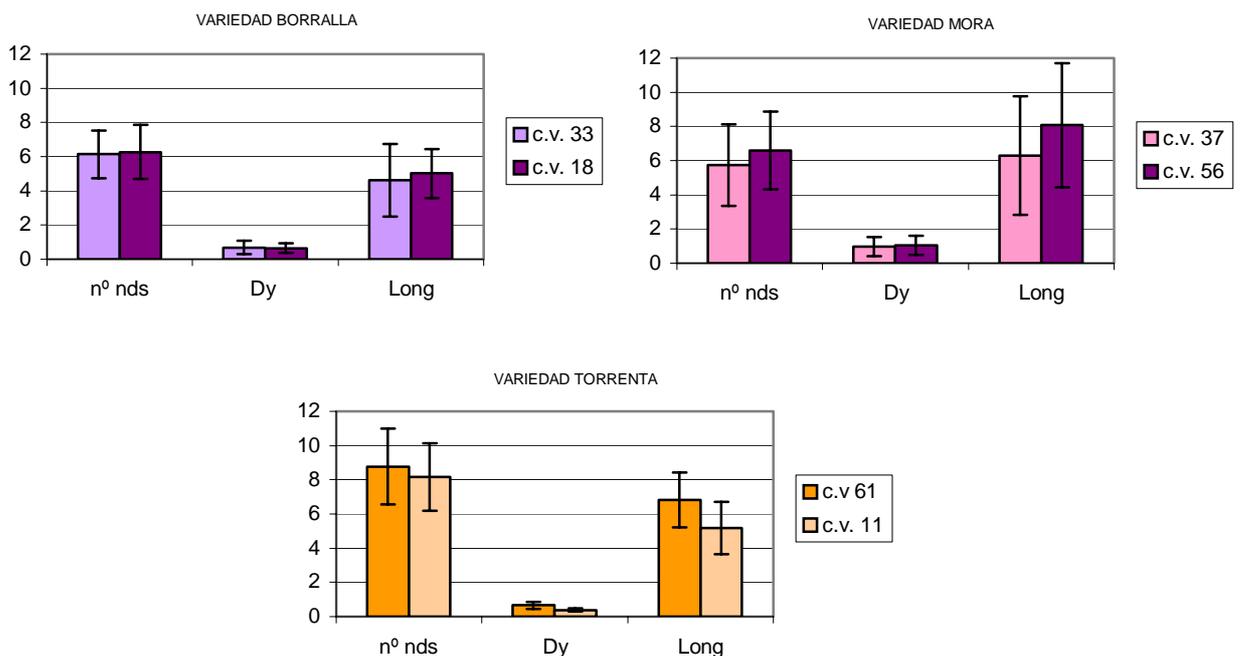


Fig. 19 Representación gráfica de los valores medios de las variables número de nudos (n° nds), distancia entre nudos y longitud total del explanto junto con las desviaciones estándar para las entradas de cada una de las variedades en estudio durante la fase de establecimiento.

Podemos concluir que la diferente procedencia del material no parece influir en el comportamiento de la variedad durante la fase de establecimiento del cultivo *in vitro*.

III.2 FASE DE MULTIPLICACIÓN

III.2.1 MATERIAL

Después de cuatro semanas de cultivo, los brotes introducidos durante la fase de establecimiento se han desarrollado y son cortados en segmentos nodales e inoculados en un nuevo medio de multiplicación. La propagación mediante nudos está basada en el principio de que los nudos de una vitroplántula colocado en un medio de cultivo adecuado inducirán el desarrollo de la yema axilar resultando en una nueva plántula de acuerdo a los postulados de la teoría de la dominancia apical del vástago. Hay que reseñar que este tipo de propagación está basado en el desarrollo de una estructura morfológica preexistente, la cual se activa y no viéndose alterado su patrón de desarrollo. Las condiciones del medio de cultivo juegan un papel importante para romper la dormancia de la yema axilar y promover su rápido desarrollo (Lizárraga, *et al.*, 1992).

III.2.2 METODOLOGÍA

Durante esta fase de multiplicación se ensayaron dos estrategias diferentes: multiplicación en medio sólido (Md1 y Md2) y multiplicación en medio líquido sin regulador de crecimiento pero en dos condiciones diferentes: agitación (Md3) y condiciones estática (Md4). Las ventajas en el empleo del medio líquido para mejorar la fase de multiplicación han sido reportadas por varios autores (Hammerschalg, 1982; Harris y Mason, 1983). El paso de un cultivo por fase líquida conlleva un aumento en el número de plántulas y, por tanto, en el número de nuevas yemas, lo que puede ser aprovechado para mejorar el rendimiento de la fase de multiplicación (Hussey

y Stacey, 1981; Espinoza *et al.*, 1992; Lizárraga *et al.*, 1989). Experiencias llevadas a cabo por equipos del Centro Internacional de la Papa (CIP) sugieren que la recomendación de someter a agitación el medio líquido a fin de promover la aireación para un mejor desarrollo de los brotes no parece ser esencial (Golmizare y Panta, 1997).

III.2.2.1 Multiplicación en medio sólido.

De las plántulas obtenidas *in vitro* durante la fase de establecimiento se escindieron segmentos uninodales (un único nudo por segmento) de 1,5 cm. de longitud aproximadamente y se sembraron en dos medios de cultivos sólidos de composición diferente, los **Medios 1 y 2** empleados durante la fase de establecimiento y que denominamos como Md1 y Md2. Dicho cultivo se mantuvo bajo las condiciones de incubación ya descritas en el apartado anterior por un periodo de 30 días.

Durante el tiempo de cultivo, éstos fueron evaluados de manera periódica (cada 10 días) considerando tres parámetros: la longitud del vástago desarrollado a partir de la yema axilar (Long), el número de nuevas yemas formadas (nº nds) y la distancia de separación entre las mismas (Dy).

III.2.2.2 Multiplicación en medio líquido

Parte del material obtenido durante la fase de establecimiento se transfirió a un medio de cultivo líquido de composición idéntica al **Medio 1**. 25 ml. de este medio se dispensaron en elermeyers de 250 ml., en cada uno de los cuales se colocaron 6 segmentos con 3 nudos cada uno de ellos (segmentos multinodales). Parte de los elermeyers se mantuvieron en condiciones de agitación, utilizando para ello un agitador orbital (Modelo, LAB-LINE) ubicado en la cámara de incubación (Fig. 20); mientras que otra parte fue mantenido en condiciones estáticas en las repisas de la cámara de incubación y bajo las condiciones de incubación ya señaladas en el apartado de metodología.

Durante el tiempo de cultivo se realizaron evaluaciones cada diez días considerando cuatro parámetros: la longitud alcanzada por el explanto (Long), el número de nuevas yemas formadas (n° nds) y la distancia de separación entre las mismas (Dy) y el número de plantas nuevas formadas.

Al igual que en la fase de establecimiento, los datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS versión 11.5 Windows (Statistical Product ad Service Solutions Ibérica, SL, Licencia de Campus, ULL), realizando una comparación de varianzas (ANOVA; $p=0,05$). Se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas con el estadístico de Levene.



Fig. 20. (A) Cultivo en medio líquido bajo la condición de agitación (B) Cultivo en medio líquido bajo la condición estática.

III.2.3 RESULTADOS DE LA FASE DE MULTIPLICACIÓN

III.2.3.1 Análisis y discusión de resultados de la fase de multiplicación en medio sólido.

La siembra de segmentos uninodales sobre un medio sólido de composición idéntica al utilizado en la fase de establecimiento, con el fin de multiplicar seriadamente nuevos brotes parece efectiva para las variedades en estudio hasta el punto de que puede continuarse de manera indefinida. Esta estrategia queda avalada en distintos trabajos (Garner y Blake ,1989;

Zobayed *et al.*, 2001). Tanto es así, que la propagación *in vitro* de papa por el cultivo seriado de yemas axilares, actualmente, se propone como método adecuado para la multiplicación rápida de cultivares a partir de individuos de élite, es decir, que presenten características de interés, como ausencia de virus, la resistencia a patógenos, etc. (Nozeram *et al.*, 1977; Goodwin *et al.*, 1980; Hussey y Satcey, 1981, Espinoza *et al.*, 1992).

En la figura 21 se representan los valores medios de las tres variables junto a sus desviaciones estándar para cada una de las variedades y en los dos medios de cultivo sólidos ensayados. Se observa que existen diferencias significativas entre las variables nº de nudos y longitud para la variedad Borralla en los dos medios ensayados. Alcanzándose unos valores medios de 5,41 para el nº de nudos y de 3,90 cm. para la longitud total del explanto en el **Medio 1**; frente a los 8,345 de media en el nº de nudos y 7,84 cm. de longitud sobre el **Medio 2**. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en cuanto a la variable Dy. Idéntico comportamiento mostró la var. Tormenta, si bien las diferencias entre los valores medios de estas variables no son tan llamativas.

En lo que al comportamiento de la var. Mora se refiere, observamos que no existen diferencias significativas entre las variables números de nudos y Dy, sin embargo si se observaron diferencias en la variable longitud, si bien nuevamente estas diferencias no eran muy marcadas.

Los resultados parecen sugerir que el **Medio 2** es más adecuado para la fase de multiplicación que un medio sólido sin aporte exógeno de reguladores de crecimiento, pues el primero parecer dar lugar a un mayor número de nuevas yemas para las tres variedades en estudio, así como un mejor desarrollo de las plántulas *in vitro*, al desarrollarse plántulas con una mayor longitud. Parece ser que la adición del regulador de crecimiento si parece tener un efecto en la producción de nuevas yemas durante la fase de multiplicación, a diferencia de lo que observamos durante la fase de establecimiento.

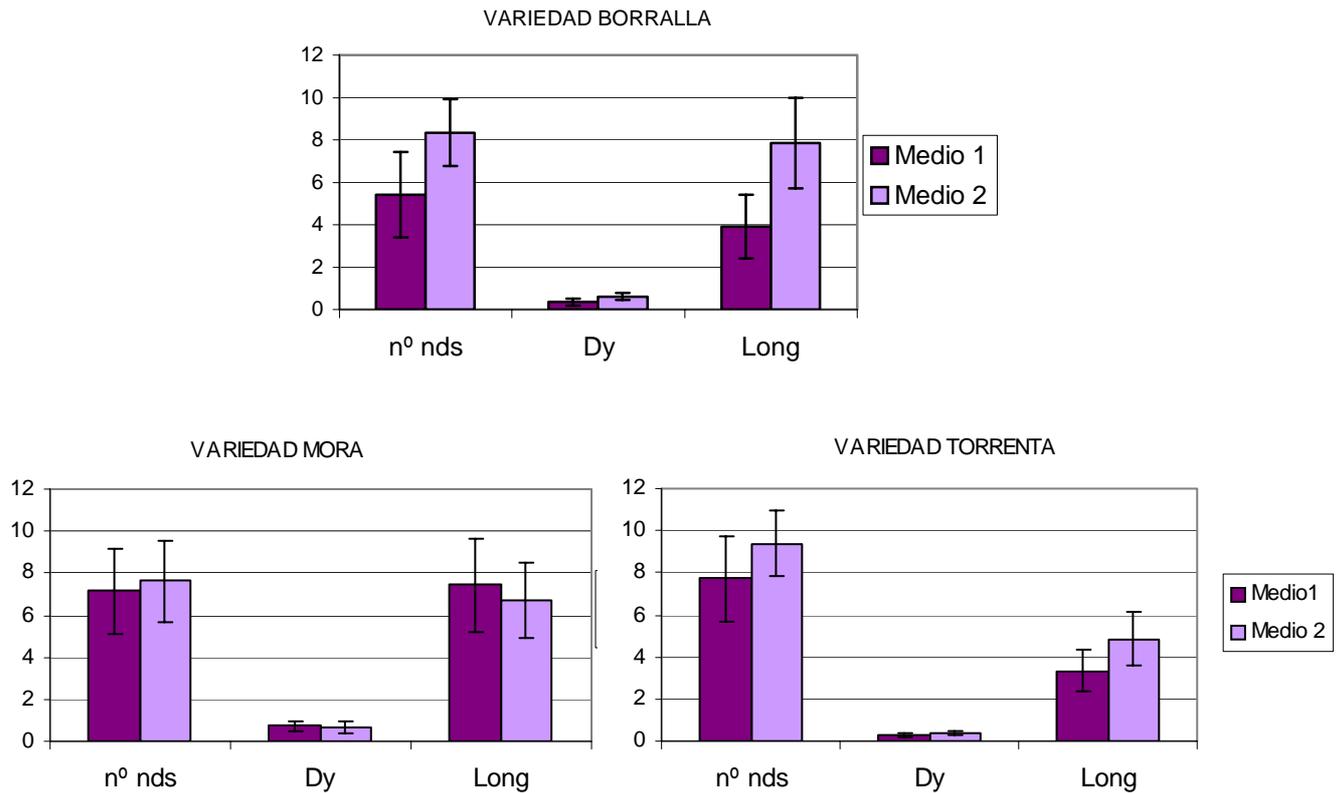


Fig. 21. Representación de los valores medios de las variables número de nudos (n° nds), distancia entre nudos y longitud total del explanto (junto con las desviaciones estándar) para las tres variedades en cada uno de los medios de multiplicación ensayados durante la fase de multiplicación (Medio 1 y Medio 2).

La adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo durante la fase de multiplicación con el fin de mejorar el desarrollo de las plántulas ha sido observada por varios autores. Por su parte, Alchantis y colaboradores (1994) realizaron un estudio sobre la respuesta de *Solanum tuberosum* L. cultivada de forma rutinaria *in vitro*, sobre un medio suplementado con Sulfato de Adenina y Kinetina, tras 4 semanas de cultivo la longitud media de los brotes fue de 4,40 cm. portando cada uno de ellos 5 nuevas yemas. Valores que quedan muy por debajo de los alcanzados por nuestras variedades en estudio sobre el Medio 2, y muy próximos a los valores alcanzados por la variedad Borralla en el Medio 1.

Sin embargo, Espinoza y colaboradores (1992) observaron que sobre un medio MS suplementado con GA y pantotenato de calcio se induce un aumento en el número de yemas, contabilizando hasta seis yemas por brote

transcurridas tres semanas de cultivo. Valor muy similar a los alcanzados por nuestras variedades en estudio en el Medio 2. Además, trabajos posteriores como los de Debabrata y colaboradores (1997) muestran valores de entre 8 y 10 cm. de longitud total en los explantos tras cuatro semanas de cultivo y con una media de hasta 11 nuevas yemas sobre cada uno de los brotes. Valores próximos a los alcanzados por nuestras variedades en estudio sobre el Medio 2. En estas experiencias, los autores del citado trabajo utilizaron plántulas de los cultivares indios *Kufri Jyoti* y *Kufri Chandramukhi* inducidos y mantenidos en un medio MS suplementado con reguladores de crecimiento (GA y NAA), dejando reflejado nuevamente la influencia que los reguladores de crecimiento hacen sobre el crecimiento de los brotes y el aumento en el número de yemas, aunque hay que considerar además la influencia de las características inherentes del material empleado en el estudio.

III.2.3.2 Análisis y discusión de resultados de la fase de multiplicación en medio líquido.

Con el objeto de optimizar el protocolo de micropropagación de nuestras variedades aumentando la tasa de multiplicación, optamos por el ensayo de una fase de cultivo en medio líquido en el protocolo de micropropagación. Se analizó así el comportamiento de las variedades en estudio sobre un medio líquido sometido a agitación constante y en un medio líquido en condiciones estáticas. Se tomaron datos durante el tiempo de cultivo de las variables, número de nudos (n° nds), distancia entre nudos (Dy), longitud total del explanto (Long) y n° total de nuevas plántulas formadas (n° plnts)

Para el análisis de los resultados es necesario considerar además, que el número de explantos sembrados por elermeyer fue de 6, con tres nudos cada uno de ellos, por tanto, si de cada yema se formase una nueva plántula se obtendría una media de 18 nuevas plántulas por elermeyer.

En la figura 22 quedan reflejamos los valores medios alcanzados por estas variables tras 30 días de cultivo junto con sus desviaciones estándar frente a las condiciones ensayadas.

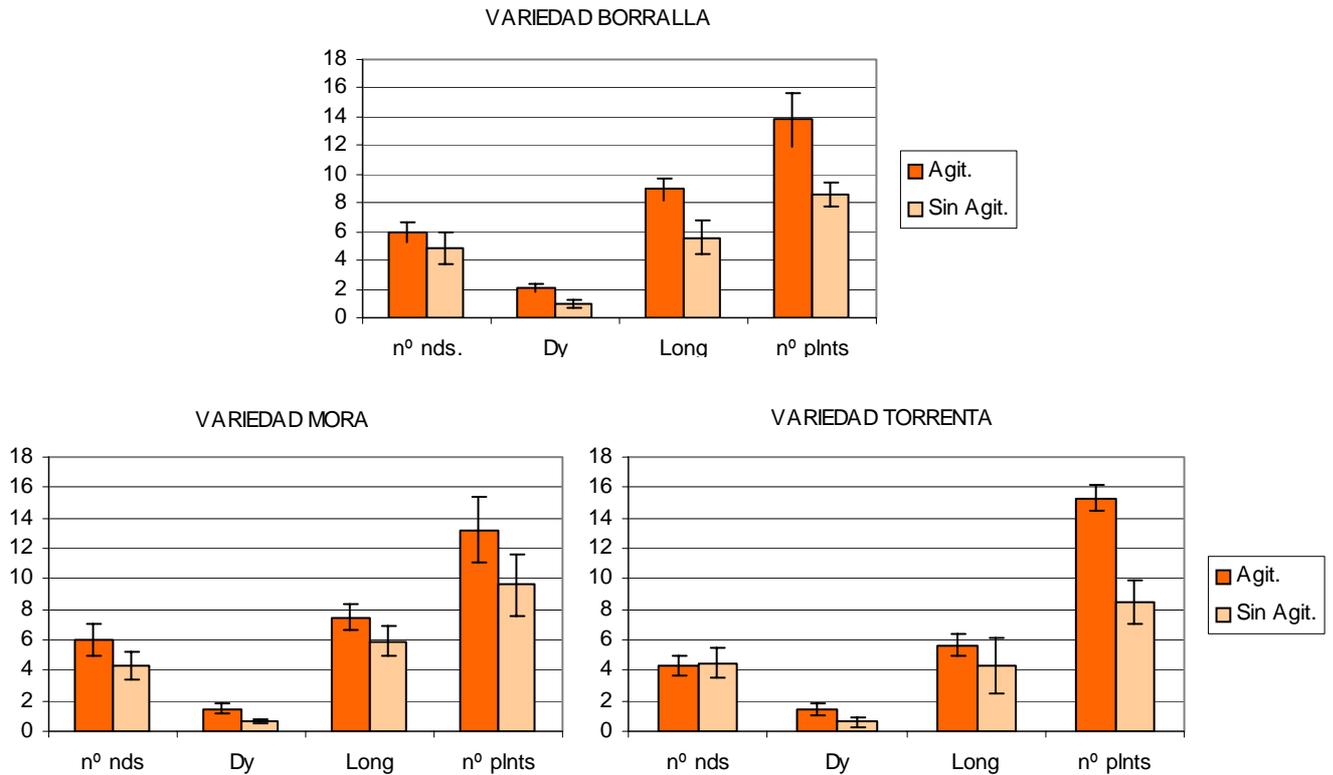


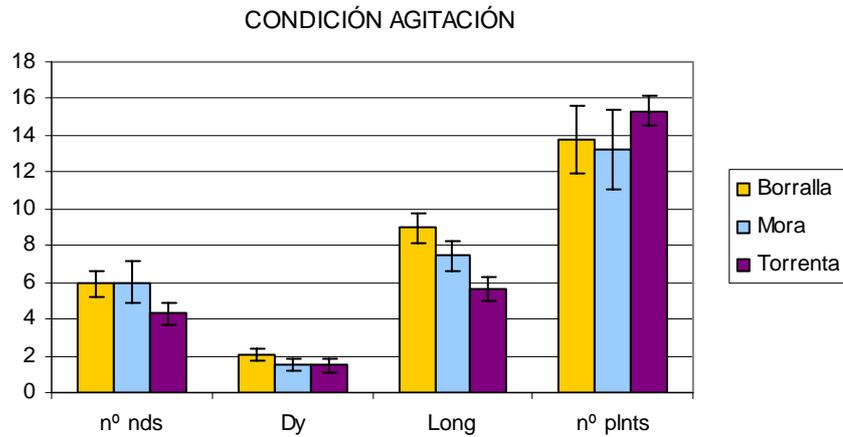
Fig. 22. Representación gráfica de los valores medios de las variables número de nudos (nº nds), distancia entre nudos y longitud total del explanto junto con las desviaciones estándar para las tres variedades en cada una de las condiciones ensayadas (Agitación y no agitación) durante la fase de multiplicación.

Analizando la respuesta de las tres variedades en estudio a las condiciones de cultivo ensayadas, observamos claramente que para las tres variedades los valores de las variables en estudio son superiores para el cultivo en agitación, frente a los alcanzados en el caso de cultivo estático, salvo en la variable número de nudos para la var. Tormenta donde no se dieron diferencias significativas entre las distintas condiciones. Por otro lado, las diferencias más notorias la encontramos en la variable número de plántulas, estando este valor entorno a 13-14 nuevas plántulas por elermeyer en aquellos explantos sometidos a la condición de agitación de las tres variedades, frente a las 8 a 9 alcanzados en la condición de sin agitación. Diferencias menores se observan en cuanto a la respuesta del resto de las

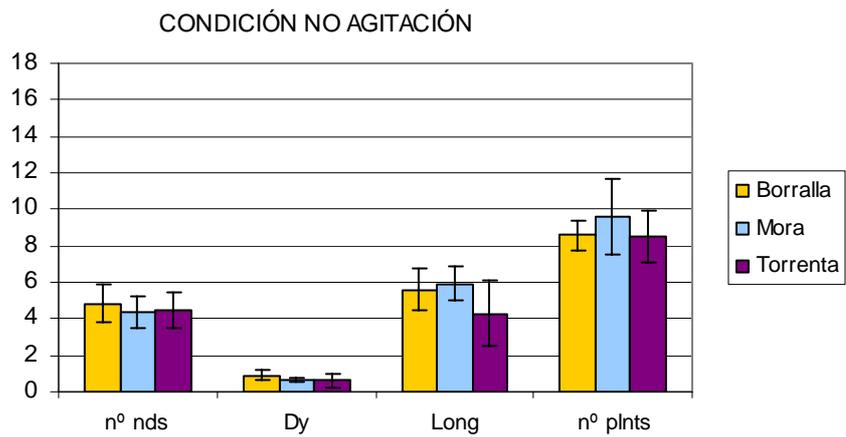
variables analizadas, si bien los valores alcanzados por estas variables son siempre superiores en los explantos sometidos a cultivo en agitación, frente a aquellos en cultivo estático. Sin embargo, diferencias significativas no se observaron en las variables Dy y Long.

Respecto a la respuesta a nivel de variedad, en la representación conjunta del comportamiento de las variedades frente a cada una de las condiciones ensayadas (Fig. 23), se observa que no existen diferencias significativas en el comportamiento de las variedades en la condición de agitación respecto a la variable Dy, sin embargo, si se considera la variable nº de nudos observamos que no existen diferencias entre las var. Borralla y Mora pero sí entre ellas y la var. Torrenta. Un comportamiento similar se observa al analizar la variable longitud. En cambio, respecto a la variable nº de plantas, es ésta última variedad, la Torrenta, la que queda por encima de los valores alcanzados por las variedades Mora y Borralla.

Respecto al comportamiento de las variedades en cultivo estático, la principal diferencia entre las variedades la encontramos en la variable nº de plantas por elermeyer, donde los valores más altos los muestra la var. Mora con un valor medio de 9,6 plantas por elermeyer, seguida por la var. Borralla y Torrenta con valores medios de 8,6 y 8,5 respectivamente, y por tanto no observándose diferencias significativas entre ellas. En la variable longitud, son las variedades Mora y Borralla las que muestran valores más altos, sin diferencias significativas entre ellas y con valores medios de 5,9 y 5,5 respectivamente, mientras que la var. Torrenta muestra un valor medio de esta variable de 4,28; significativamente por debajo de los valores mostrados en las variedades Mora y Borralla.



(A)



(B)

Fig. 23. Comparación de la respuesta de cada una de las variedades en las dos condiciones de cultivo durante la fase de multiplicación (a) Agitación (B) No Agitación.

Considerando el desarrollo de los explantos, las diferencias que se observan entre el cultivo en medio líquido en agitación y estático, está relacionado con el intercambio gaseosos (etileno, dióxido de carbono, ...) y el aporte de oxígeno a los cultivos, así como las sustancias tóxicas que se generan durante el cultivo son excretadas al medio y difundidas por el mismo, lo que hace que la aireación constituya un factor limitante en el crecimiento

de células, tejidos, etc. (Margara, 1988; Pierik, 1990). Por ello cuando se utiliza un medio líquido en los protocolos de micropropagación, una manera de asegurar la correcta aireación de los cultivos es el uso de agitación. Aunque si bien hay autores, que consideran que la agitación del medio líquido para acelerar y promover el desarrollo de nuevas plántulas no es esencial para obtener un exitoso desarrollo de las mismas (Golmizare y Panta, 1997).

Como una alternativa al empleo de cultivos en agitación o en condiciones estáticas se está generando en la actualidad los sistemas de automatización con birreactores y los aparatos de inmersión temporal, en los que el medio de cultivo líquido está en contacto con los explantos de manera alternante y en periodos de tiempo corto. Este tipo de sistemas permite la aireación de los cultivos, la renovación de los nutrientes, etc. (Levin y Vasil, 1989; Aiteken-Christie, 1991; Alchanatis, *et al.*, 1994; George, 1996; Ziv *et al.*, 1996).

En lo que al sistema radicular se refiere, se observó un mejor desarrollo del mismo para aquellos explantos sembrados en un medio líquido en agitación frente al desarrollado sobre un medio líquido sin agitación o sobre medio solidificado. Resultados similares a los trabajos de Pennazio y Redolfi (1973), quienes obtuvieron un mejor desarrollo del sistema radicular en brotes de papa cultivados en medio líquido, frente al obtenido en medio gelificado. De este modo se constata que un buen intercambio gaseoso, y por ende, un buen suministro de oxígeno al medio de cultivo, conlleva una mejora en el desarrollo del sistema radicular *in vitro*

En lo que al desarrollo del vástago se refiere, se constataron claras diferencias entre un medio líquido en agitación y un medio sin agitación, tal y como señalamos anteriormente. Así, se observó un desarrollo más vigoroso, con hojas grandes y tallos gruesos, sobre un medio líquido en agitación frente al cultivo estático. Trabajos posteriores como los de Zobayed y colaboradores (2001) abordan el papel de la ventilación frente al crecimiento y desarrollo de los explantos corroborando nuestros resultados.

El uso del medio líquido en el protocolo de micropropagación tiene como propósito aumentar el número de plántulas y consecuentemente el número de yemas en un periodo relativamente corto. Este hecho queda

reflejado en los resultados de nuestras experiencias al obtener tras un periodo de 10 días en torno a 4 nuevas yemas en un medio líquido para las tres variedades en estudio, mientras que en un medio sólido se obtiene un menor número de éstos para el mismo tiempo de cultivo (2 a 3). Resultados similares fueron obtenidos por Espinoza y colaboradores (1994) quienes observaron sobre un medio líquido suplementado con hormonas un aumento en el número de yemas tras 2-3 semanas de cultivo, frente al menor rendimiento de un medio sólido con idéntica composición.

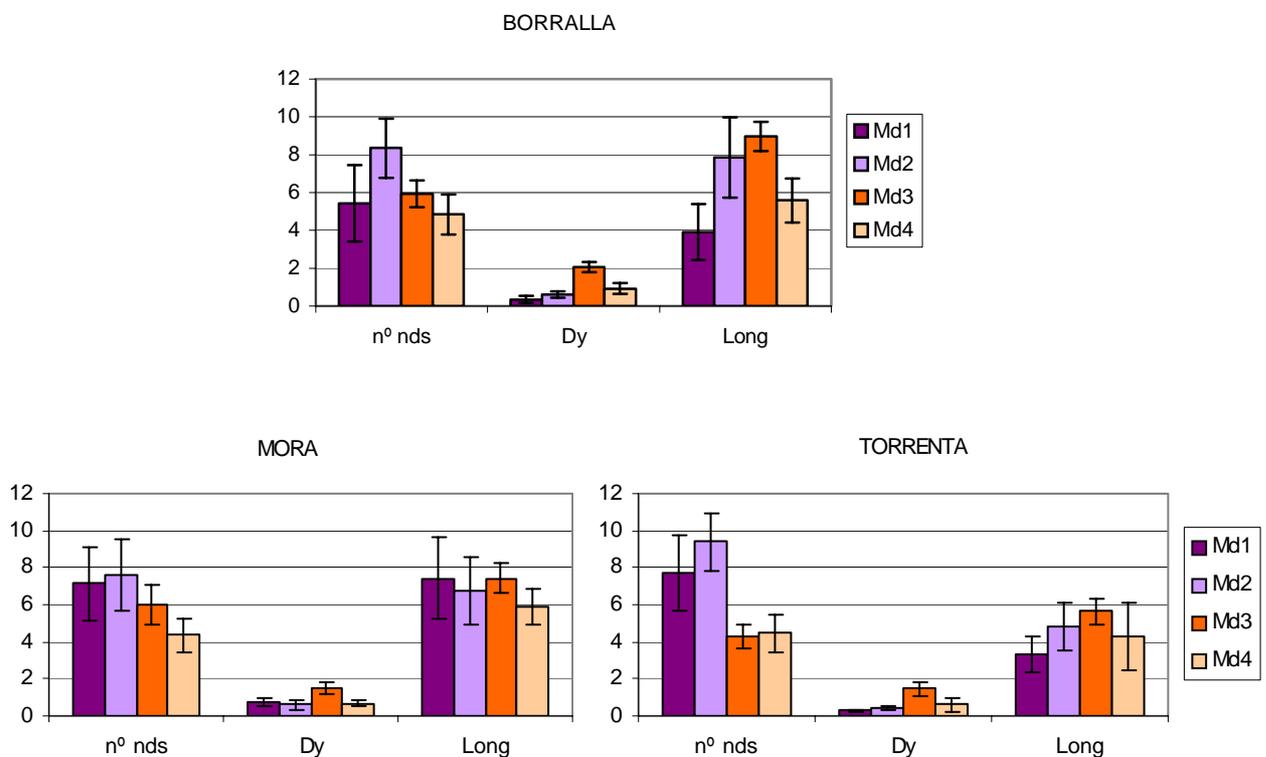


Fig 24. Comparación de la respuesta de cada una de las variables en los cuatro medios de cultivo ensayados durante la fase de multiplicación.

Si analizamos el comportamiento de cada variedad sobre cada uno de los medios de cultivo ensayados durante la fase de multiplicación (Fig.24), observamos que en las tres variedades existen diferencias significativas. Las variedades Borralla y Tormenta parecen mostrar excelentes ratios en cuanto al número de nudos en el Md2 con respecto al resto de los medios ensayados, mientras que el medio líquido en agitación (Md3) parece hacerlo para la

variable longitud en estas dos variedades, encontrándonos los valores más bajos para esta variable sobre Md1.

Por su parte, la variedad Mora también presenta los valores más altos para la variable número de nudos en el Md2, si bien con escasas diferencias a los valores alcanzados en Md1. Así mismo, si bien se consideran diferencias para la variable longitud, estas son muy pequeñas, alcanzándose los valores más bajos para esta variable en el medio líquido en la condición de no agitación (Md4). Sin embargo para las tres variedades, los valores más altos de la variable Dy se alcanzan en el Md3.

A la vista de estos resultados podemos considerar que el empleo de un medio sólido durante la fase de multiplicación suplementado con GA induce a un incremento en el número de nudos de manera general, frente al empleo de un medio sólido o líquido carente de reguladores de crecimiento. Por otro lado, debemos considerar que el empleo del medio líquido durante la fase de multiplicación puede beneficiar de cara a aumentar el número de plántulas que se pueden conseguir en un corto periodo de tiempo, si bien no tiene un efecto directo sobre la variable número de nudos.

En este sentido, podemos considerar que para el diseño de un protocolo de micropropagación de estas variedades, el empleo de un medio de cultivo sólido, sin aporte exógeno hormonal para la fase de establecimiento, seguido por la alternancia de un medio sólido con giberelina que induce el aumento de nudos, con un medio líquido para lograr un aumento en el número de plántulas, se muestra como adecuado para estas variedades. Sin embargo, consideramos que una alternativa, que permitiría mejorar esta fase de multiplicación, sería el empleo de las técnicas de inmersión temporal, que al tiempo de inducir un incremento en el número de nudos, da lugar a la formación de un elevado número de nuevas plántulas en un corto periodo de tiempo.

CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN DE LA CARGA VIRICA

IV EVALUACIÓN DE LA CARGA VÍRICA

IV.1 INTRODUCCIÓN

Hace muchos años, los productores de papa observaron que el cultivo reiterado de esta planta en una misma localidad, utilizando como semillas tubérculos de su propia cosecha, daba lugar a una reducción paulatina en el rendimiento del cultivo, hablándose entonces de *degeneración*. Se consideraba que la semilla de papa *degeneraba*, rendía menos, y entonces se recurría al uso de tubérculos producidos en otras zonas.

Durante casi cincuenta años, el problema de la degeneración de la papa ha sido motivo de discusión entre investigadores y productores, y las hipótesis sobre sus causas han sido innumerables. La etiología y el modo de difusión de este fenómeno observado en el cultivo de papa quedó definitivamente aclarada en las primeras décadas del siglo XX, con las investigaciones de Appel (1907) en Alemania, Quanjer (1916) y Oortwijn Botjes (1920) en Holanda, Orton (1920) y Schultz y Folsom (1921), en los EEUU; Murphy y Mckay (1924) en Irlanda y Smith (1931) en Inglaterra. Éstas y otras investigaciones posteriores demostraron que los virus eran la causa de esta *degeneración*, al provocar una progresiva disminución del rendimiento en un proceso irreversible (Fernández, 1995).

En el reino vegetal se encuentran virosis en más de dos mil especies, pertenecientes a más de 1.509 familias diferentes; además se han encontrado virus en bacterias, algas y hongos. Un virus puede infectar a una o varias especies vegetales; y una planta puede estar afectada por uno o más virus al mismo al mismo tiempo.

Entre 1600-1860 encontramos descripciones de fenómenos como: la variegación de flores, el enrollamiento y el amarillamiento de hojas, los mosaicos foliares, entre otras, que fueron atribuidas a causas no bien definidas, y que hoy reconocemos como ocasionadas por virus.

En 1886 Adolfo Mayer, un alemán residente en Holanda, observó que el jugo extraído de hojas de tabaco afectadas por un moteado al que llamó mosaico, reproducía la enfermedad cuando era inoculado en las hojas de

plántulas de tabaco sanas. En 1892, el ruso Dimitri Iwanosky demostró que el agente del mosaico del tabaco, contenido en el jugo extraído de hojas enfermas, conservaba su capacidad infectiva aún después de haber sido pasado por filtros que retenían las bacterias; no era visible al microscopio corriente ni podía cultivarse en los medios de cultivo habituales, lo que le llevó a considerar que se trataban de bacterias muy pequeñas (filtrables).

Los mismos resultados fueron dados a conocer siete años después por el holandés Martinus W. Beijerinck, el cual denominó a ese agente filtrable, *Contagium vivum fluidum*, destacando la naturaleza infecciosa del mismo.

En 1935 se logró un gran avance en el conocimiento de los virus cuando el químico americano W.M. Stanley logró la cristalización del virus del mosaico del tabaco (TMV), después de haber precipitado una preparación concentrada y parcialmente purificada del virus. Tales cristales, de composición proteica, permanecían infecciosos, como si fueran “cristales vivos”.

Dos años más tarde, en 1937, Bawden y Pirie descubrieron, en Inglaterra, que el TMV contenía un 95% de proteína y un 5% de ácido ribonucleico (ARN), describiendo a los virus como moléculas de núcleo-proteína.

IV.1.1 NATURALEZA Y CARACTERÍSTICAS DE LOS VIRUS DE PLANTAS

Los virus son parásitos obligados, por ello solo pueden replicarse dentro de las células del huésped, utilizando los mecanismos celulares para sintetizar otras entidades virales. Cada partícula viral contiene una porción de ácido nucleico que forma la parte central y una cubierta o capa de proteína que le sirve de protección formada por subunidades denominadas capsómeros. Respecto al ácido nucleico puede ser ARN o ADN, de hebra simple (s) o doble (d), y con tamaños muy variables en función del virus. El porcentaje de ácido nucleico es de alrededor de 5% en virus alargados y de 15 a 45% en virus con partículas isométricas. El tamaño del ácido nucleico varía entre $0,4 \times 10^6$ y $15,5 \times 10^6$ Daltons. La mayoría de los virus de plantas, sin embargo, tienen un ácido nucleico entorno a 2 ó 3×10^6 Daltons.

Las partículas individuales de la mayoría de los virus son de pequeño tamaño, visibles únicamente al microscopio electrónico. El tamaño y la forma de las partículas de los diferentes virus varían considerablemente entre grupos, pero la forma es característica similar entre miembros de un mismo grupo y éstas pueden ser entre alargadas, baciliformes de forma cilíndrica y poliédrica.

Los virus alargados tienen sus subunidades proteicas y nucleótidos dispuestos en una cadena helicoidal. Algunos como TMV (*Tobacco mosaic virus*) y PMTV (*Potato mop top virus*), tienen partículas en forma de varilla rígida de aproximadamente 300 x16 nm, mientras que otros como PVX (*Potato virus X*), PVY (*Potato virus Y*) y los clostovirus, tienen partículas como filamentos flexuosos de 10-12 nm de diámetro y 500-2000 nm de longitud. Respecto a los virus con partículas casi esféricas (isométricas), presentan diámetros de entre 17 y 75 nm. Otros virus están constituidos por partículas baciliformes de un mismo tamaño (*Rhadovirus*) o de tamaños variados (*Alfamovirus*).

IV.1.2 TRANSMISIÓN, INFECCIÓN, REPLICACIÓN Y MANIFESTACIÓN DE SÍNTOMAS.

Al proceso por el cual un virus pasa de una planta infectada a una sana se le denomina *transmisión*, y requiere de un agente o vector. Éste paso puede realizarse mediante un vector biológico específico, por medio de heridas causadas por instrumentos de cultivo, durante el manejo de las plantas. Algunos virus pueden ser solamente transmitidos por un vector, y otros, sólo por contacto, pero otros pueden ser transmitidos en ambas formas.

Al ingreso del virus a la célula y su multiplicación posterior se denomina *infección*. Una vez que los virus se introducen en las células del huésped, se multiplican por un proceso llamado *replicación*, usando la maquinaria biosintética de la célula infectada para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas propias.

Una vez multiplicados, los virus son transmitidos a las células cercanas pasando de célula a célula por medio de las estructuras propias de

comunicación intercelular (Ej.: vía plasmodesmos), hasta llegar a los vasos conductores; de allí vía floema y xilema la infección se generaliza.

La fisiología del hospedante se ve alterada, manifestándose entonces síntomas de la enfermedad y que pueden ser muy variables: amarillamiento del follaje, mosaico, aclaración de las nervaduras, encrespado o arrugado de las hojas, estriado, manchas irregulares o concéntricas, decoloraciones, enanismo, achaparramiento, y otros.

La presencia y diagnóstico en campo de la virosis se basa generalmente en la observación de estos síntomas, acompañado de la exclusión de todas las otras causas posibles, desde las nutricionales o abióticas en general, a las ocasionadas por otros agentes biológicos. El uso de la microscopía electrónica, y de las distintas técnicas de detección inmunológicas y basadas en el ácido nucleico permiten confirmar la presencia/ausencia de virus como agentes causales de la sintomatología observada.

IV 1.2.1 Formas de transmisión de los virus en papa

a) Transmisión por contacto.

Este tipo de transmisión ocurre cuando las heridas en las plantas infectadas liberan savia que puede contaminar plantas sanas. Para que sea eficiente, el virus debe alcanzar una alta concentración, y la planta receptora debe ser susceptible a la infección. Los virus de papa que pueden ser transmitidos de esta forma son PVX (*Potato virus X*), PVS (*Potato virus S*), APLV (*Andean potato latent virus*), APMV (*Andean potato mottle virus*) y el viroide PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) (Loughnana y Murphy, 1938; Merriam y Bonde, 1954). Para algunos virus, como PVX y el viroide PSTVd, la transmisión por contacto es la forma principal de diseminación.

b) Transmisión por vectores

Muchos virus dependen para su diseminación de vectores biológicos como pueden ser los áfidos (Homópteros picadores-chupadores de la familia de los *Aphididae*) o las moscas blancas (Homópteros picadores-chupadores

familia *Aleurodidae*), principales responsables del transporte y diseminación de los virus.

En papa, los áfidos son de significación especial ya que los dos virus más importantes del cultivo (PLRV, *potato leafroll virus*, y PVY *Potato virus Y*) son transmitidos por especies de áfidos (Salazar, 1995), entre ellos *Myzus persicae* (Sulzer) o «pulgón verde del melocotón y la papa» (Fig. 25), presenta una distribución generalizada, encontrándose en todos los lugares donde se cultiva la papa y es considerado desde hace muchos años como el vector de virus de plantas más importante.

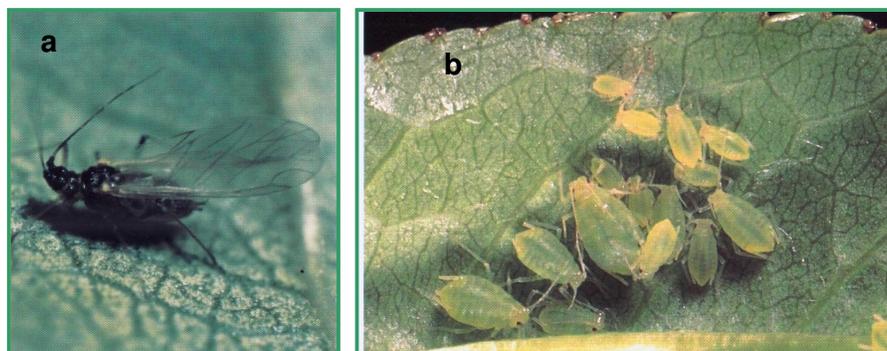


Fig 25 a) Áfido adulto, forma alada, *Myzus persicae*; b) Áfidos, Colonia áptera de *M. persicae*. (Barbagallo *et al.*, 1998).

c) Transmisión a través de semilla y Polen

Los virus pueden ser transmitidos a través de las partes de la planta usadas para la propagación, en el caso de la papa los tubérculos-semilla. Constituyendo ésta la principal forma de diseminación de los virus en el cultivo y sobre la que los programas de certificación de semilla han de centrar su atención.

La transmisión de virus a través de semilla-botánica y polen es también conocida como transmisión vertical (Fulton, 1964; Bennet, 1969). Sin embargo, el conocimiento sobre la transmisión de virus por semilla sexual es todavía muy limitado, y por ello los mecanismos que excluyen a muchos virus del tejido reproductivo son desconocidos. En papa, solamente se ha verificado que el viroide PSTVd y el virus PVT (*Potato virus T*) son transmitidos por

semilla y polen. Otros virus han sido transmitidos de manera experimental, pero la evidencia de transmisión en condiciones naturales es incierta o no confirmada. La transmisión de PSTVd por semilla fue citada por primera vez en papa y tomate por Benson y Singh (1964), experiencias posteriores han confirmado esta vía de transmisión para este viroide.

IV.1.2.2 Tipos de transmisión de virus

Durante el proceso de prueba o ingesta del áfido, los virus pueden ser adquiridos, para luego ser transferidos a plantas sanas durante la prueba o alimentación subsiguiente. Los áfidos que adquieren virus son llamados *virulíferos* y pueden permanecer así por minutos, horas, días o el resto de sus vidas. Este período de retención lleva a considerar tres tipos de transmisión: no persistente, semipersistente y persistente (Harris, 1977).

a) Transmisión no persistente

La adquisición e inoculación del virus pueden ser completadas en segundos o pocos minutos y por ello, no existe un período de latencia detectable. Los áfidos permanecen virulíferos por unos cuantos minutos después de la adquisición y pierden su capacidad de transmitir el virus después de la *ecdisis* (muda), al eliminar los estiletes viejos, la faringe y la membrana que recubre el intestino y el ciego.

Los virus transmitidos en forma no persistente pertenecen a varios grupos. Los *Potyvirus* son el grupo más numeroso y mejor conocido de virus transmitidos de esta manera. En papa destacan, PVY y PVA (*Potato virus A*). Otro grupo de virus transmitidos en forma no persistente por los áfidos son los *Carlavirus*, PVS y PVM (*Potato virus M*) son los únicos miembros de este grupo descritos en papa.

b) Transmisión persistente

El *Virus del enrollamiento de la papa* (PLRV) es el único virus en papa transmitido en este modo. El virus es adquirido e inoculado durante la ingesta. Entre la adquisición y la transmisión hay un periodo de latencia que

varía de uno a varios días. El virus es retenido durante la ecdisis y por eso se mantiene la infectividad durante toda la vida del insecto.

Un período de 10-15 min. (Stegwee, 1960) se considera como el período mínimo de ingesta que requiere el vector *Myzus persicae* para adquirir de forma persistente la condición de virulífero para PLRV.

c) Transmisión semipersistente

Los virus transmitidos en forma semipersistente son aquellos que pueden ser adquiridos e inoculados en períodos de acceso de apenas 30 minutos entre la adquisición y la transmisión, pero no durante pruebas breves, como en el caso de la transmisión no persistente. En este tipo de transmisión, la infectividad de los áfidos se incrementa con la duración del tiempo de alimentación hasta un límite, usualmente 12 horas (Watson, 1972). La persistencia del virus en el vector es de unos cuantos días, pero pierde considerable infectividad tras 24 horas. Casi todos los virus transmitidos de esta manera pertenecen al grupo de los *Closterovirus*.

IV.1.3 NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN

Cuando se descubrieron los virus como una de las causas de las enfermedades de plantas, se les dio nombres que incluían la planta en la cual se halló la enfermedad y el síntoma más conspicuo y prevalente. Varios investigadores trataron de nombrar y clasificar a los virus en un modo más sistemático. Jonson y Hoggan (1935), Smith (1937) y Holmes (1939) publicaron clasificaciones y nomenclaturas de virus con criterios diferentes. Ninguno de estos sistemas ni otros intentos más recientes de reclasificación fueron aceptados (Lwoff *et al.*, 1962). Por esta razón el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) fue creado con el fin de sentar las reglas para la nomenclatura y clasificación de los virus. Este comité estableció un sistema de taxonomía y nomenclatura aceptado internacionalmente (Matthews, 1979). A principios de 1980 el ICTV había aprobado la constitución de 50 familias de virus y muchos otros grupos, entre los cuales había 23 grupos de virus de plantas (no familias). En 1992 el ICTV aprobó nueve familias que contienen un

total de 23 géneros de virus de plantas. Además reconoce 22 géneros aún no agrupados en familias.

IV.2 VIRUS QUE AFECTAN AL CULTIVO DE LA PAPA

Un gran número de virus pueden afectar al cultivo de la papa. Beemster y Box (1987) describieron 23 virus, con muy diversa incidencia sobre el cultivo y variada distribución geográfica. Actualmente se considera que más de 27 virus y viroides afectan al cultivo de papa (Tabla 11). Sin embargo, en la mayoría de los países PLRV (*Potato leafroll*), PVY (*Potato virus Y*), PVX (*Potato virus X*), PVS (*Potato virus S*), PVA (*Potato virus A*), PVM (*Potato virus M*) y el viroide del tubérculo ahusado de la papa (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) son los que se consideran de mayor importancia por su incidencia en el rendimiento del cultivo y los que han recibido especial atención en los programas de certificación de semillas (Tabla 12).

VIRUS	ABREVIATURA	GENOMA	GRUPO
Virus de mayor importancia			
Potato leafroll	PLRV	ss(+)ARN	Luteovirus
Potato virus Y	PVY	ss(+)ARN	Potyvirus
Potato virus X	PVX	ss(+)ARN	Potexvirus
Potato virus A	PVA	ss(+)ARN	Potyvirus
Potato spindle tuber viroid	PSTVd	ss circular ARN	Viroid
Virus de menor importancia			
Alfalfa mosaic	AMV	ss(+)ARN	Grupo AMV
Andean potato mottle	APMV	ss(+)ARN	Comovirus
Andean potato latent	APLV	ss(+)ARN	Tymovirus
Beet curly top	BCTV	ssADN	Greminivirus
Cucumber mosaic	CMV	ss(+)ARN	Cucumovirus
Potato aucuba mosaic	PAMV	ss(+)ARN	Potexvirus
Potato moptop	PMTV	ss(+)ARN	Tobamovirus
Potato virus M	PVM	ss(+)ARN	Carlavirus
Potato virus S	PVS	ss(+)ARN	Carlavirus
Potato virus T	PVT	ss(+)ARN	Capillovirus
Potato virus U	PVU	ss(-)ARN	Nepovirus
Potato virus V	PVV	ss(+)ARN	Potyvirus
Potato yellow dwarf	PYDV	ss(-)ARN	Rhabdovirus
Potato yellow vein	PYVV	?	?
Solanum apical leaf curling	SALCV	ssADN	Geminivirus
Tobacco mosaic	TMV	ss(+)ARN	Tobamovirus
Tobacco necrosis	TNV	ss(+)ARN	Necrovirus
Tobacco rattle	TRV	ss(+)ARN	Tobravirus
Tobaco ringsopt	TRSV	ss(+)ARN	Nepovirus
Tobacco streak	TSV	ss(+)ARN	Ilarvirus
Tomato blackring	TBRV	ss(+)ARN	Nepovirus
Tomato spotted wilt	TSWV	ss(+)ARN	Tospovirus

Tabla 11. Virus conocidos que afectan al cultivo de la papa, acrónimo, tipo de ácido nucleico y grupo al que pertenecen. Basado en el sistema de Berger (1994) (Singh, 1999).

VIRUS	GRUPO	PARTÍCULA	PÉRDIDAS .	HUESPED	TRANSM. NATURAL
PLRV (Potato leafroll virus)	Luteovirus	Icosaédrica (24 nm)	90%	Sobretudo Solanáceas	Pulgones (no persistente)
PVY (Potato virus Y)	Potyvirus	Helicoidal (730 x 11 nm)	80%	Sobretudo Solanáceas	Pulgones (no persistente)
PVA (Potato virus A)	Potyvirus	Helicoidal (730 x 15 nm)	40%	Solanáceas	Pulgones (no persistente)
PVX (Potato virus X)	Potexviurs	Helicoidal (515 x 13 nm)	15%	Sobretudo Solanáceas	Contacto
PVS (Potato virus S)	Carlavirus	Helicoidal (650 x 12 nm)	Poco efecto	Solanáceas Quenop.	Contacto Pulgones (no persistente)
PVM (Potato virus M)	Carlavirus	Helicoidal (650 x 12 nm)	Poco efecto	Sobretudo Solanáceas	Pulgones (no persistente)

Tabla 12. Virus más importantes que afectan al cultivo de la papa. Grupo al que pertenecen, morfología de las partículas, pérdidas ocasionadas en el rendimiento de la cosecha, huésped y principal vector de transmisión para cada uno de ellos.

IV. 2.1. DESCRIPCIÓN DE LOS VIRUS OBJETO DE EVALUACIÓN

IV.2.1.1. Familia: LUTEOVIRIDAE

Género: POLEOVIRUS

Especie: POTATO LEAFROLL VIRUS

Acrónimo: PLRV

Potato leaf roll virus, causante del enrollado de las hojas, está estrechamente ligado a la historia de la degeneración de la papa. Los trabajos de Appel (1907), pusieron de manifiesto que el enrollado de las hojas era producido por una entidad independiente sin relación con otros agentes parásitos conocidos.

Descrito Por Quanjer, Van der Leek y Oortwijn Botjes (1916). Si bien las purificación de sus partículas se debe a Peters (1967). Estas son isométricas de 24 nm de diámetro.

Es transmitido por alrededor de 10 especies de áfidos en un modo persistente y común donde quiera que se cultive papa.

Hospedantes

Como hospedante principal está la papa (*Solanum tuberosum*). Sin embargo, diversas especies del género *Solanum* y especies pertenecientes a otros géneros de la familia Solanaceae también son susceptibles de infección por este virus como *Lycopersicon esculentum*, *Physalis angulata*, *P. Floridiana*, *Nicotiana tabacum*, *Nicandra Physaloides*, *Petunia híbrida*, *Atropa belladonna*, *Datura stramonium*, *Hyoscyamus Níger* (Webb et al., 1952). También son susceptibles especies de otras familias como *Amaranthus caudatus*, *Celosia argente*, *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae) y *Nolana Lanceolada* (Nolanaceae; Natti et al., 1953), *Capsella bursa-pastori* (Cruciferae, Thomas, 1984) y *Montina perpoliata* (Portulaceae, Tamada et al., 1984) (Rothamsted Research Center, <http://www.dpvweb.net>).

Sintomatología

La principal manifestación que produce este virus en la mayoría de las variedades de papa es la formación de hojas enrolladas (Fig. 26b, 26c). Pero además puede también promover una amarillez intervenal, crecimiento de tallos erectos y de menor desarrollo que las plantas sanas (Fig. 26a). Se supone que en esta amplia gama de síntomas pueden intervenir diversos factores (variedad, estado vegetativo de la planta, condiciones ambientales y raza del virus).

Síntomas primarios: Son aquellos que se manifiestan en la misma estación o periodo vegetativo en que las plantas han contraído la infección. Los más típicos son clorosis y enrollamiento de las hojas jóvenes. Algunos cultivares pueden desarrollar pigmentación rojiza o púrpura, especialmente en los márgenes de los folíolos. El enrollamiento de las hojas puede estar limitado a veces sólo a la base de los folíolos.

El virus parece estar confinado al tejido floemático donde se ha observado su presencia mediante microscopía electrónica de transmisión (Kojima *et al.*, 1969, Casper, 1988). Se ha encontrado en el citoplasma de células del parénquima floemático y células acompañantes en las que forman agregados. A nivel histológico, la infección por PLRV se traduce en muchas variedades por una acumulación de callosa en los tubos cribosos y en necrosis del tejido floemático de los pecíolos, tallos y tubérculos (Golinowski y Garbaczewska, 1984). Desde el punto de vista bioquímico hay una disminución de la actividad fotosintética y del contenido en clorofila, con modificación de los metabolismos glucosídicos (acumulación de almidón foliar) y proteico.

Síntomas secundarios. Se denominan así a los síntomas manifestados por las plantas a partir del segundo año de infección. Los síntomas característicos en este caso son el enrollamiento pronunciado de las hojas basales en forma de cuchara, el porte erguido y el enanismo de la planta; la acumulación de almidón hace que las hojas se tornen duras y crujientes lo que puede permitir la diferenciación de la infección viral de los enrollados blandos debidos a *Rhizoctonia* o a *Erwinia* (Fig. 26). Se ha descrito, para algunas

variedades de papa americanas y británicas, la aparición de necrosis internas en forma de redes en los tubérculos (Peters y Hones, 1981).

La severidad de los síntomas depende de la raza del virus, del cultivar y de las condiciones ambientales. En *S. tuberosum* ssp andígena los síntomas secundarios (enanismo amarillo) son marcadamente diferentes a los observados en *S. tuberosum* ssp *tuberosum*, caracterizado por un hábito de crecimiento marcadamente erguido, una clorosis intervenal en el margen de las hojas, especialmente en las hojas superiores, siendo escaso el enrollamiento de las hojas inferiores. Los síntomas secundarios en híbridos entre estas dos subespecies consiste en el enrollamiento de las hojas inferiores típico de *S. tuberosum* ssp *tuberosum* (Hooker, 1981).



Fig. 26. (a) Crecimiento erguido y clorosis. (b) Enrollado de foliolos (c) Enrollado en la base de los foliolos (Fuente: Trabajo campo del GBVa-ULL).

Etiología

La morfología del agente causal (Fig. 27) es la de partículas isométricas de 24 nm de diámetro (Peters, 1967; Takanami y Kubo, 1979; tomado de: Rothamsted Research Center, <http://www.dpvweb.net>).

El ácido nucleico, ARN de cadena simple (ss) con polaridad positiva (+), contiene seis marcos abiertos de lectura (ORFs) (Van der Wilk *et al.*, 1989, Mayo *et al.*, 1989, Keese *et al.*, 1990) y una proteína unida al extremo 5' (VPg).

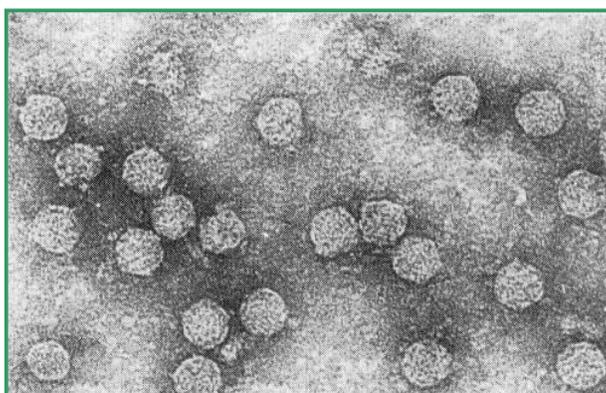


Fig.27. Imagen a microscopio electrónico de transmisión de las partículas isométricas de PLRV. (Fuente: Rothamsted Research Center, <http://www.dpvweb.net>).

Transmisión

Este virus se transmite por injerto e insectos de un modo persistente. Hay citadas, hasta el momento, cinco especies de áfidos transmisoras de este virus, de las cuales la principal es *Myzus persicae* (Fig. 25). Las otras son: *Aphis rhamni*, *Myzus circumflexus*, *M. Convolvuli* y *Macrosiphum euphorbiae* (Fernández, 1995).

Razas o variantes

Se han podido distinguir diversas razas en función de la severidad de síntomas manifestados en papa, *P. floridiana* (Webb *et al.*, 1951) o *Montina perfoliata* y de acuerdo con la eficiencia en la transmisión por *Myzus persicae* (Tamada *et al.*, 1984), si bien no hay pruebas de diferenciación serológica

entre estas razas. Algunos autores diferencian estas variantes denominándolas 1, 2, 3 y 4 atendiendo a la severidad de los síntomas provocados en papa; sin embargo, otros investigadores consideran sólo tres variantes: severo, moderado y medio. (Hooker, 1981).

Diagnóstico

PLRV puede ser detectado por ELISA, NASH y por inoculación en plantas indicadoras. En estos casos los mejores huéspedes indicadores son *Physalis. Floridiana* y *Datura stramonium* (Salazar, 1995). Respecto a las pruebas serológicas son aplicables a hojas, tallos y tubérculos en infección primaria y secundaria (Mehrad *et al*; 1978., Tamada y Harison 1980; Gugerli y Gehriger, 1980), y es la técnica más empleada de manera rutinaria. Sin embargo, el avance de las técnicas de biología molecular en los últimos años ha permitido la detección precisa de este virus mediante las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (RT-PCR) (Singh, 1999).

Daños

Potato leaf roll virus es uno de los virus más destructivos para el cultivo de la papa. Se considera que es el responsable de alrededor del 60% de las pérdidas en las cosechas. Sin embargo, en estas tres últimas décadas sus efectos han sido reducidos considerablemente mediante el control de los vectores y el empleo de semillas sanas.

IV.2.1.2. Familia: POTYVIRIDAE

Género: POTYVIRUS

Especie: POTATO VIRUS Y

Acrónimo: PVY

PVY es el responsable de deformaciones foliares y de la necrosis de hojas y tallos en papa.

En las primeras décadas del pasado siglo, esta sintomatología junto a el encrespamiento de la hoja o “leaf curl” se vinculaba a la degeneración de la

papa. La etiología de este complejo sintomatológico fue puesta de manifiesto por Smith (1931), en Inglaterra, tras aislar de plantas que presentaban síntomas similares a los mencionados, dos virus diferentes, *Potato virus X* y *Potato virus Y*.

Investigaciones dirigidas al estudio de este complejo durante este tiempo dieron lugar a la generación de diversidad de nombres para esta sintomatología: en Europa, la denominaron “stipple streak”, “leaf drop streak” y “acropetal necrosis” y en los Estados Unidos le dieron el nombre de “streak” y “rugose mosaic” (Fernández, 1995).

Potato virus Y es el miembro tipo del género *Potyvirus*, familia *Potyviridae* (De Bokx y Huttinga, 1981; Brunt, 1992; Shukla, 1994; Hall *et al.*, 1998). Es un virus de partículas flexuosas de 730 x 11 nm, que se transmite por contacto y por varias especies de áfidos de manera no persistente. Está presente en todas las regiones del mundo donde se cultiva papa, afectando además a los cultivos de pimiento, tabaco y tomate en países de clima templado-cálido (Salazar, 1971; Glais *et al.*, 2002).

Hospedantes

Su hospedante principal es la papa (*Solanum tuberosum*), si bien causa enfermedades importantes en Tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y pimiento (*Capsicum annum*).

Son también susceptibles numerosas especies, la mayoría de las cuales pertenecen a la familia Solanaceae: (géneros *Browallia*, *Capsicum*, *Cyphomandra*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Lycopersicon*, *Lycium*, *Nicandra*, *Nicotiana*, *Petunia*, *Physalis*, *Salpiglossis*, *Schizanthus*, además de otros *Solanum*). Aunque también afecta a especies de las familias: Quenopodiáceas, Amarantáceas, Leguminosas y de las compuestas (Horvath, 1985).

Sintomatología

En la mayoría de las variedades, *Potato virus Y* causa un listado necrótico de hojas y tallos (“Leaf drop streak”) en el primer año de infección, y un mosaico a partir del segundo. En otras, como “Arran Pilot”, “Arran Victory”, etc., causa mosaico a partir del primer año de infección. Existen

además considerables diferencias en cuanto a la severidad y tipo de síntomas de plantas individuales de una misma variedad, pues mientras algunas muestran un pronunciado encrespamiento y enanismo, otras sólo manifiestan un mosaico definido, y otras, necrosis y corrugación de las hojas inferiores. Estas diferencias en la expresión de los síntomas están relacionadas tanto con la raza del virus, como con la variedad, el estado fisiológico de la misma y las condiciones ambientales

A continuación pasamos a describir los dos síntomas que de manera generalizada produce este virus:

Listado necrótico de hojas y tallos. Esta manifestación es conocida en inglés como “leaf drop streak” y “acropetal necrosis” y aparece en el mismo año de la infección (síntomas primarios). Las hojas presentan, primero, un mosaico y luego pequeñas lesiones negruzcas e irregulares en las nervaduras, más visibles en el envés. Esta necrosis de nervadura se extiende rápidamente y alcanza el pecíolo y el tallo principal haciendo que las hojas se desprenden y queden colgando del tallo. Las primeras en verse afectadas son las de la parte inferior de la planta; la necrosis avanza en forma acrópeta (“acropetal necrosis”) hasta que en casos graves llegan a colgar todas menos las del ápice. Las pocas hojas del brote terminal, muestran rara vez una marcada necrosis, pero pueden estar intensamente afectadas por un severo mosaico y una acentuada rugosidad. El tallo presenta con frecuencia manchas necróticas color castaño oscuro, alargadas, y se vuelve sumamente quebradizo. La decoloración es superficial y parece no afectar los tejidos vasculares.

Síntomas similares a los descritos están relacionados con otros agentes causales o problemas nutricionales, por ejemplo: *Phytophthora infestans* puede producir un listado necrótico en tallos de papa, similar al que causa el virus Y. Por otro lado, plantas desarrolladas en suelos con un exceso de manganeso puede presentar una sintomatología muy similar. Por su parte, *Rhizoctonia sp.* induce también necrosis de los

tallos, si ésta suele estar limitada a la suela a la parte subterránea (Fernández, 1995).

Mosaico severo. Este tipo de síntoma se manifiesta por lo general a partir del segundo año (síntomas secundarios), aunque con muy poca frecuencia, también pueden producirse casos de “leaf drop streak”. El mosaico severo puede ser causado por otros virus, solos o en acción conjunta; lo que dificulta el diagnóstico en campo, siendo necesario hacer determinaciones experimentales. Otros síntomas importantes son: folíolos de tamaño muy reducido, encrespado, las plantas son pequeñas y maduran antes que las sanas y su rendimiento es muy bajo, aunque los tubérculos no manifiestan ninguna anomalía visible (Fig. 28).

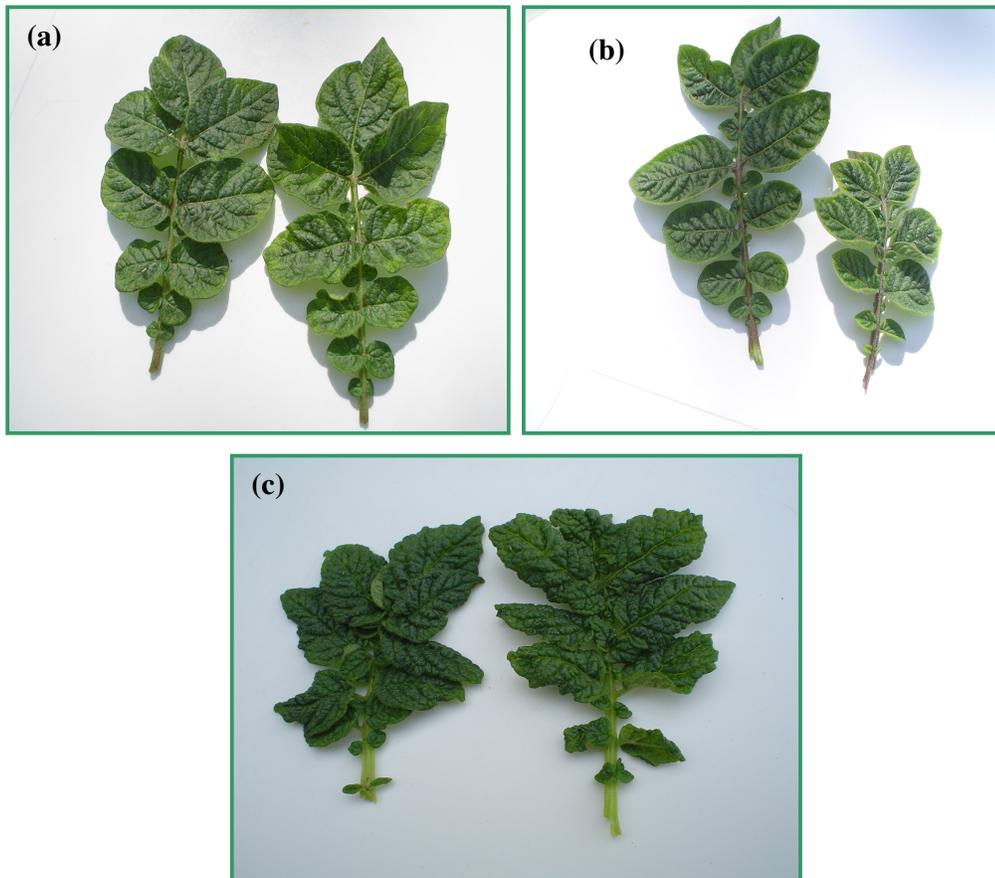


Fig 28. Distintos grados de severidad causados por PVY. (a) Clorosis marginal y ligero fruncimiento. (b) Reducción foliar, clorosis marginal y moderado fruncimiento. (c) Fuerte fruncimiento y clorosis (Fuente: Trabajo Campo GBVa-ULL).

Etiología

Se trata de un virus con ARN monocatenario de polaridad positiva y aproximadamente de 9.7 Kb, con una proteína VPg covalentemente unida al extremo 5' y una cola poli-A en su extremo 3' y cuya secuencia es conocida (Robaglia *et al.*, 1989). Durante el proceso de infección, este ARN es traducido en una larga poliproteína que posteriormente es procesada en 10 proteínas maduras (Dougherty y Carrington, 1988; Riechmann *et al.*, 1992).

Las células infectadas muestran partículas filamentosas, flexuosas, de una longitud de 730 nm y de una anchura de unos 11 nm. Da lugar a la formación de estructuras citoplasmáticas en forma tubular, laminar y en molinete inclusiones en los tejidos infectados denominadas *Pinwheel* (Fig. 29).

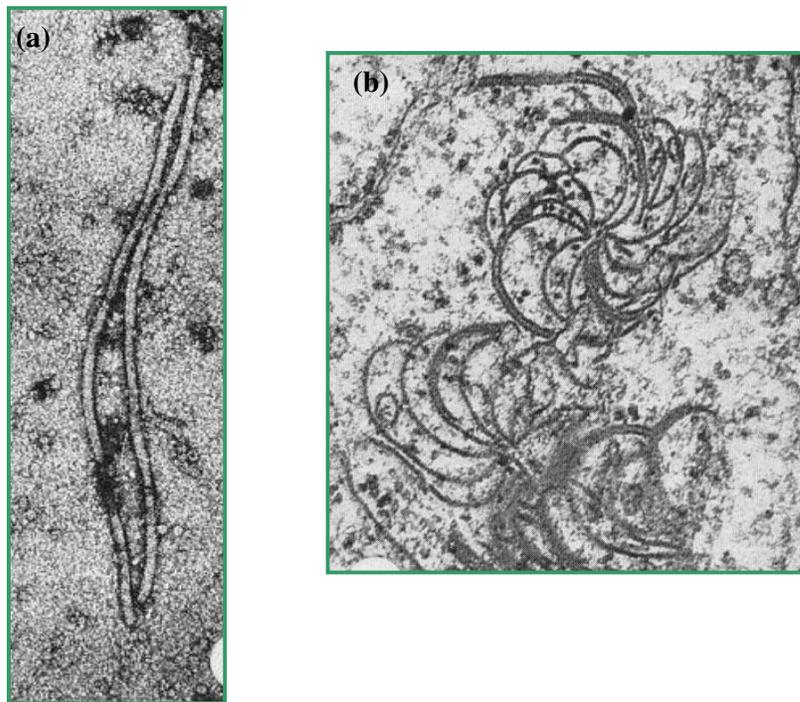


Fig. 29. (a) Inmuno-electromicroscopía y decoración de partículas de PVY. (b) Cortes ultrafinos de tejidos infectados en los que pueden observarse claramente estructuras en molinete (*Pinwheel*) (Fuente: Rothamsted Research Center, <http://www.dpvweb.net>).

Transmisión

Este virus se transmite fácilmente por jugos, injerto e insectos; alrededor de unas 40 especies de áfidos pueden transmitir este virus en modo no persistente (Sigvald, 1984). Los pulgones que se reproducen en la papa son considerados como sus principales vectores, aunque con una eficacia de transmisión variable: de 59 % en el caso de *Myzus persicae*, del 31% en el de *Aphis nasturtii* (Bradley y Rideout, 1953), y aproximadamente del 9% en *Aphis frangulae* (Kostiw, 1975). Dichos porcentajes fueron determinados a nivel de laboratorio, si bien se han confirmado bajo condiciones naturales, especialmente en Polonia (Gabriel, 1969). Es transmitido fácil y eficientemente después de un breve período de alimentación en plantas enfermas en forma no persistente.

Razas o variantes

Pueden ser distinguidos de acuerdo con la reacción local o sistémica en hospedantes tales como *Nicotiana tabacum* L “White Burlet” y “Samsun NN”, *Physalis pubescens* L., y varios cultivares de papa (*Solanum tuberosum* L) (De Bokx y Huntinga, 1981; Barnett, 1992) tres grupos de razas o variantes. Estos grupos son denominados como:

- Y⁰ o Cepa ordinaria (*Common strain*): Diferenciado por la severidad de los síntomas en *N. glutinosa*, *P. floridiana* y *S. tuberosum*. Presenta una distribución mundial (Kahn y Monroe, 1963).
- Y^C o estirpes con estrías necróticas punteadas (*Stipple-streak strain*): poco común en Europa, ha sido citado para Australia, Nueva Zelanda, India y Suramérica, pero no en Norteamérica (d’Aquino *et al.*, 1995). Se diferencia de las otras razas en que no es transmitido por *Myzus persicae*.
- Y^N o cepa necrótica (*Tobacco veinal strain*): Produce una necrosis severa de las venas en tabaco. Aislado por primera vez en América del sur, aparecieron por primera vez en Alemania, luego en Suiza y extendiéndose luego a toda Europa. Está presente en América del

Sur pero raramente en Norteamérica (Singh, 1992; McDonald *et al.*, 1994).

Las dos primeras razas dan lugar a una reacción de hipersensibilidad en cultivares de *Solanum tuberosum* debido a la presencia de diferentes genes de resistencia denominados $N_{y_{tbr}}$ y N_c para PVY^o y PVY^c respectivamente. (De Bokx y Huntinga, 1981; Jones 1990).

Los avances en la Biología Molecular han permitido, recientemente que nuevas razas hayan sido propuestas. La raza PVY^{NTN}, es una variante de PVY^N de alta virulencia y responsable de la enfermedad denominada como PTNRD (*potato tuber necrotic ringspot disease*) y que da lugar a una severa pérdida en la calidad de los tubérculos (Beczner *et al.*, 1984, Ohshima *et al.*, 2000). Esta enfermedad fue citada por primera vez en Hungría en los ochenta (Beczner *et al.*, 1984), y se ha dispersado posteriormente por Europa (LeRomancer y Nedellec, 1997). Estudios filogenéticos muestran a esta variante como miembro del grupo PVY^N (van den Heuvel *et al.*, 1992; Tordo *et al.*, 1995; Shukla y Ward, 1998). No se puede distinguir de otros aislados del grupo PVY^N por métodos convencionales de serología, si bien éstos permiten diferenciarlo del resto de las razas (PVY^o, PVY^N y PVY^c) (van den Heuvel *et al.*, 1994).

Finalmente, aislados de PVY^o capaces de superar los genes de resistencia $N_{y_{tbr}}$ y N_c de ciertos cultivares de *Solanum tuberosum* han sido determinados y denominados como PVY^z (Chrzanowska, 1991 y 1994).

Por otro lado, aislados de PVY^N, serológicamente relacionados con PVY^o, induce síntomas menos severos que PVY^N en papa y se ha denominado como PVY^N-Wilga (PVY^N-W) (Chrzanowska, 1991 y 1994).

La relación entre estas diferentes razas de PVY ha sido analizada a nivel molecular, empleando para ello regiones codificantes y no codificantes del genoma vírico (Shukla y Ward, 1989; van der Vlugt *et al.*, 1993; Boonham *et al.*, 1999). Este tipo de análisis, independientemente de la región escogida para ser realizados han arrojado idénticos resultados, diferenciando los aislados de PVY en dos grupos principales, el *ordinario* y el *necrótico*. Además de estos dos grupos principales, un tercer grupo de aislados que afecta a pepino y tomate ha sido identificado en base a la variabilidad encontrada en

la región del extremo 5' sin traducción (*untranslate*) y la ORF de la P1 (Tordo *et al.*, 1995). Este tercer grupo representa los aislados de PVY^C.

Estudios moleculares realizados sobre este último grupo han llevado a dividirlo en dos grupos genéticos denominados como C1 y C2 (Blanco-Urgoiti, *et al.*, 1998); sin embargo esta distinción no se ve reflejada en una manifestación diferencial de síntomas.

En lo que a la sintomatología de las razas o variantes se refiere; podemos ver que tras una contaminación por cepas Y^N, aparecen mosaicos leves, incluso muy leves y por tanto difíciles de detectar. Los síntomas de infección secundaria consisten en mosaicos más severos que aparecen más o menos precozmente en función de las condiciones climáticas (De Bokx y Huttinga, 1981; Hooker, 1981).

La cepa PVY^{NTN} además de producir los síntomas típicos del virus Y en planta, produce síntomas en el tubérculo. Inicialmente aparecen unos anillos circulares de color marrón o canelo sobresaliendo sobre la piel del tubérculo, sobretodo en la zona de los ojos; posteriormente estas zonas circulares se deprimen al morir las células que la forman llegando a producirse grietas o hendiduras al romperse la piel y a medida que van muriendo las células hacia el interior del tubérculo, se va acentuando la depresión y el tejido muerto va tomando una apariencia corchosa (Beczner *et al.*, 1984).

Los síntomas de infección primaria por Y^O dependen de las variedades de papa y son necrosis, mosaicos y una amarillez de los folíolos; la necrosis de las nerviaciones, observada con frecuencia en el envés de la hoja, o internervios (anillos o manchas) se generalizan y acarrearán la marchitez de las hojas que caen (*leaf drop streak*) o permanecen unidas al tallo pero colgantes a lo largo de él. Las plantas con infección secundaria por Y^O son endebles y sus hojas presentan un fuerte mosaico acompañado de abullonamiento y abarquillado de las hojas. En principio las necrosis son menos importantes que en una infección primaria (Hooker, 1981)

Las cepas del tipo Y^C inducen en las variedades que poseen el gen Nc, como las *Eerstelin*, *King Edgar*, entre otras, una reacción de hipersensibilidad que da lugar a lesiones necróticas en el punto de la inoculación o a una necrosis apical letal; esta última, la cuál solo se pone en evidencia por injerto

de una planta enferma sobre una variedad hipersensible, raramente se observa en campo. Otras variedades sensibles (*Desireé*, *Pentlend Crown*) exteriorizan mosaicos leves y abullonamiento (Jones, 1987) y “estrias necróticas puntiformes” sobre hojas, pecíolos y tallos. Induce sobre los tubérculos de algunas variedades necrosis internas o externas que pueden ser visibles en el momento de la recolección o aparecer durante la conservación.

Diagnóstico

El PVY puede ser detectado por una variedad de técnicas: plantas indicadoras, ensayos ELISA, NASH. Los avances en biología molecular han permitido en los últimos años diferenciar cepas de PVY mediante las técnicas de RT-PCR (Singh, 1999).

Daños

En la bibliografía encontramos pérdidas que van desde el 10 al 80 % de la cosecha de papa (De Bokx y Huntinga, 1981). Este amplio margen de incidencia ha de ser interpretado a la luz de la variabilidad en razas o estirpes mostrado por PVY; y de la capacidad de asociarse a otros virus como PVA o PVX.

Estudios realizados sobre el efecto de las distintas razas permitieron determinar que, las comunes tienden a acelerar la brotación, y por tanto las plantas mueren prematuramente. En cambio, las razas necróticas no alteran la brotación, por lo que la muerte anticipada de la planta está en relación directa con la severidad de la raza necrótica del virus.

La infección provocada por las razas comunes reduce en un 39 % el número de tubérculos en una treintena de variedades verificadas, en tanto que la reducción provocada por las razas necróticas fueron del 13 % en variedades con síntomas enmascarados y de 20 % en variedades con síntomas bien definidos. (Fernández, 1995).

IV.2.1.3 Familia: *FLEXIVIRIDAE*

Género: *POTEXVIRUS*

Especie: *POTATO VIRUS X*

Acrónimo: *PVX*

Potato virus X es el causante de la enfermedad el “mosaico leve” o también denominada “mosaico latente”. Es uno de los virus más importantes en la papa por la acción depresiva que ejerce en su rendimiento; su habilidad para asociarse a otros virus; asociado con PVA produce un mosaico leve o “mild mosaic”, y con PVY (una de las asociaciones más destructivas en papa) un mosaico rugoso; su amplia difusión y la dificultad de reconocerlo en campo dificultan en gran medida su erradicación.

El descubrimiento de esta infección se remonta a los trabajos de Murphy y McKay (1924) quienes al estudiar el contenido de virus en variedades de papas inglesas, observaron que eran portadoras sin síntomas de uno o más virus. Posteriormente, Smith (1931) estudiando la etiología del mosaico rugoso, comprobó que está causada por dos virus: *Potato virus X* y *Potato virus Y* (Fernández, 1995).

Se trata de un virus de partículas alargadas (515 nm), que se transmite principalmente por contacto. Afecta a todas las variedades en cultivo, en muchas está presente en porcentajes elevados, alcanzando en algunas de ellas el 100 % de infección. Produce pérdidas de 10 a 20 % de producción (Bode, 1968).

Hospedantes

Como hospedante principal está la papa (*Solanum tuberosum*). Sin embargo, numerosas especies incluidas dentro de siete familias son susceptibles, siendo las más numerosas las Solanaceas (Purcifull y Edwardson, 1981) en especial los géneros: *Atropa*, *Browallia*, *Capsicum*, *Chamaesaracha*, *Cyphomandra*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Lycopersicom*, *Lycium*, *Nicandra*, *Nicotiana*, *petunia*, *Physalis*, *Salpiglossis*, *scopolia*, *Schizanthus* y *Solanum*. Aunque algunas plantas de otras familias, como por ejemplo, *Amaranthaceae* y *Chenopodiaceae* son también susceptibles.

Sintomatología

Los síntomas dependen de la variedad y de la raza del virus con la cual está infectada. Produce un moteado internerval sin deformación en las hojas (Fig. 30) o enanismo de las plantas. Razas más virulentas causan un mosaico severo, necrosis internerval, enanismo de las plantas y reducción del tamaño foliar. Ciertas combinaciones de variantes de PVX y genotipo de hospedadores pueden causar una necrosis apical extensiva, la cual puede conducir a muerte de partes del vegetal o bien de la planta entera, y causar necrosis en los tubérculos (Hooker, 1981).

En la manifestación de los síntomas también influye el ambiente: las temperaturas elevadas enmascaran los síntomas, en tanto que las que oscilan entre 14 y 22° C, los muestran de forma más visible (Fernández, 1995).

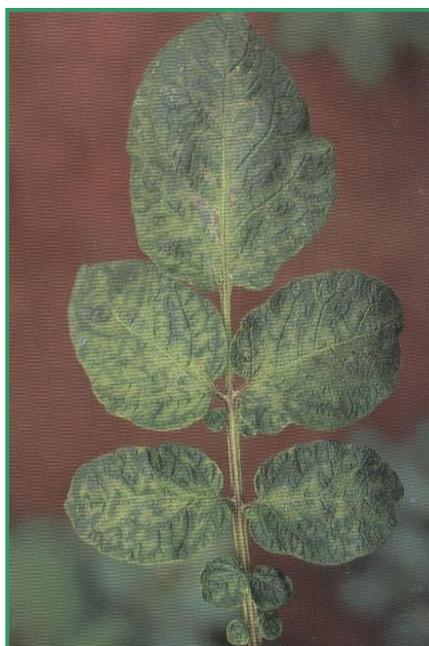


Fig. 30. Mosaico causado por la infección con PVX. (Fuente: Internacional Potato Center, CIP 1996).

Etiología

Es un virus de ARN monocatenario, con partículas filamentosas (Fig. 31), flexuosas de unos 515 x 13 nm (Brandes, 1964).

La secuencia nucleotídica (6435 bases excluyendo la cola poly-A del extremo 3') ha sido determinada (Huisman *et al.*, 1988; Skryabin *et al.*, 1988). Presenta en el extremo 5' un m⁷GpppG cap (Sonnenberg *et al.*, 1978), una cola poly-A en el extremo 3' (Morozov *et al.*, 1987) y 5 ORFs (Huisman *et al.*, 1988, Skryabin *et al.*, 1988).

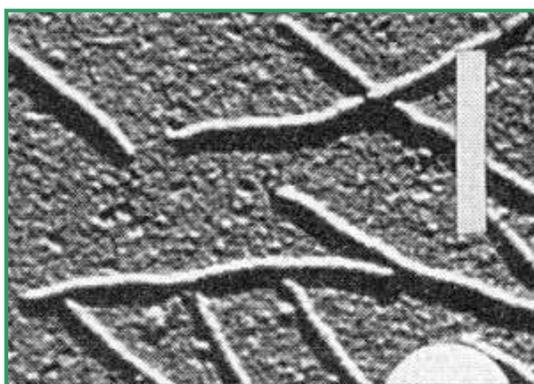


Fig.31.Fotografía microscopio electrónico de barrido de las partículas filamentosas de PVX. (Fuente: Rothamsted Research Center, <http://www.dpvweb.net>).

Transmisión

A pesar de su enorme difusión en todas las variedades cultivadas, este virus no tiene insecto vector conocido. Sin embargo, la transmisión en campo se produce por contacto entre plantas o partes de plantas infectadas (tallos, hojas y raíces), por la acción del hombre en el empleo de herramientas agrícolas contaminadas, animales o maquinaria (Salazar, 1995).

Diagnóstico

Puede ser detectado por métodos serológicos (ELISA), por métodos de hibridación de ácidos nucleicos (NASH), mediante técnicas moleculares (RT-PCR), así como mediante el empleo de plantas indicadoras.

Este virus tiene una gama muy amplia de hospedantes indicadores. Algunos autores han descrito el comportamiento de un numeroso grupo de plantas pertenecientes a diversas familias, señalando como plantas con reacción local, sin infección sistémica las siguientes: *Solanum pseudocapsicum*, *Lycium halimifolium*, *Verónica orchidea*, *V. Serpyllifolia*, *V. Teucrium*, *V. Longifolia*, *Digitalis lanata*, *D. Ambigua*, *Amaranthus caudatus*, *A. Hybridus*, *A. Retroflexus* y *A. Tricolor*. Siendo las especies más utilizadas por su reacción con lesiones locales en las hojas inoculadas *Gomphrena globosa* y *Chenopidium amaranticolor* (Fernández, 1995).

Nicotiana rustica, *N. Tabacum*, *N. Glutinosa*, *Datura stramonium*, *Capsicum annum*, *Lycopersicon esculentum* son especies que reaccionan visiblemente a muchas razas de este virus.

Daños

Bawden y colaboradores (1948) indicaron que PVX causaba más pérdidas en el cultivo en Inglaterra que PLRV y PVY juntos. Esto se debe, según los autores, a que mediante adecuados programas de certificación, PLRV y PVY fueron controlados de manera satisfactoria, no sucediendo lo mismo con PVX, dada su invisibilidad sintomática en campo.

Diversos autores han estimado las pérdidas en cosecha causada por razas débiles de virus X, entre 12-20 % (Fernández, 1995).

Resumiendo puede decirse que la importancia de PVX se debe a su amplia difusión, su habilidad para asociarse a otros virus, a la disminución que provoca en los rendimientos y al elevado número de variedades que lo portan sin manifestación de síntomas, lo que dificulta su control y erradicación en campo.

IV.2.1.4 Familia: *POTYVIRIDAE*

Género: *POTYVIRUS*

Especie: *POTATO VIRUS A*

Acrónimo: *PVA*

PVA es considerado el responsables de los denominados mosaicos suaves. Trabajos realizados por diferentes autores indicaron que el “mild mosaic” o mosaico suave, observado hacia 1911 en Alemania en diferentes variedades de papa, había sido transmitido de plantas enfermas a sanas por medio del áfido *Macrosiphum solanifolii*. Posteriormente Loughnana (1933) señaló que el “crinkle”, enfermedad similar a la ya descrita pero que recibió este nombre tras su descripción en Holanda e Irlanda, también era transmitido por *Myzus persicae*. Sin embargo, fueron Murphy y MacKay (1932) quienes denominaron al agente causal de esta enfermedad como *Potato virus A* y comprobaron su transmisión por injerto.

Es un virus de ARN de partículas filamentosas, que se transmite por jugos y por áfidos en un modo no persistente. Ampliamente distribuido en el mundo entero.

Hospedantes

Su hospedante natural parece ser *Solanum tuberosum*, aunque se conoce un amplio número de plantas susceptibles, todas dentro de la familia Solanaceae: *Datura feroz*, *D. Stramonium*, *Hyoscyamus albus*, *Lycopersicon viscosa*, *Nicandra physaloides*, *Nicotiana alata*, *N. Angustifolica*, *N. Tabacum*, entre otras (Mc Leod, 1962).

Sintomatología

La expresión de síntomas depende de la variedad de papa, de la existencia de otros virus en la misma planta y de su patogenicidad. Las hojas de las plantas infectadas por lo general manifiestan un mosaico suave (Fig. 32a), rugosidad de la superficie de la hoja y margen de la hoja ondulado. En las plantas infectadas, normalmente se presenta un crecimiento abierto por que los tallos se curvan hacia el exterior. A temperaturas altas y con

intensidad lumínica elevada los síntomas pueden quedar enmascarados y ser difíciles de reconocer (Hooker, 1981).

Asociado con razas del virus X, la sintomatología varía desde un mosaico casi imperceptible, hasta un intenso encrespamiento foliar (“crinkle”) (Fig. 32c). Aunque generalmente el virus A esta presente de forma asintomática en la gran mayoría de las variedades, en muchos cultivares se muestra el denominando mosaico medio que consiste en un moteado clorótico, a veces severo, en el cual las áreas amarillas se alternan con áreas oscuras. Las áreas moteadas varían en tamaño y localización siendo normalmente entre las venas. Una ligera rugosidad puede observarse en la superficie de las hojas y el margen de las mismas puede llegar a ondularse (Fig. 32).

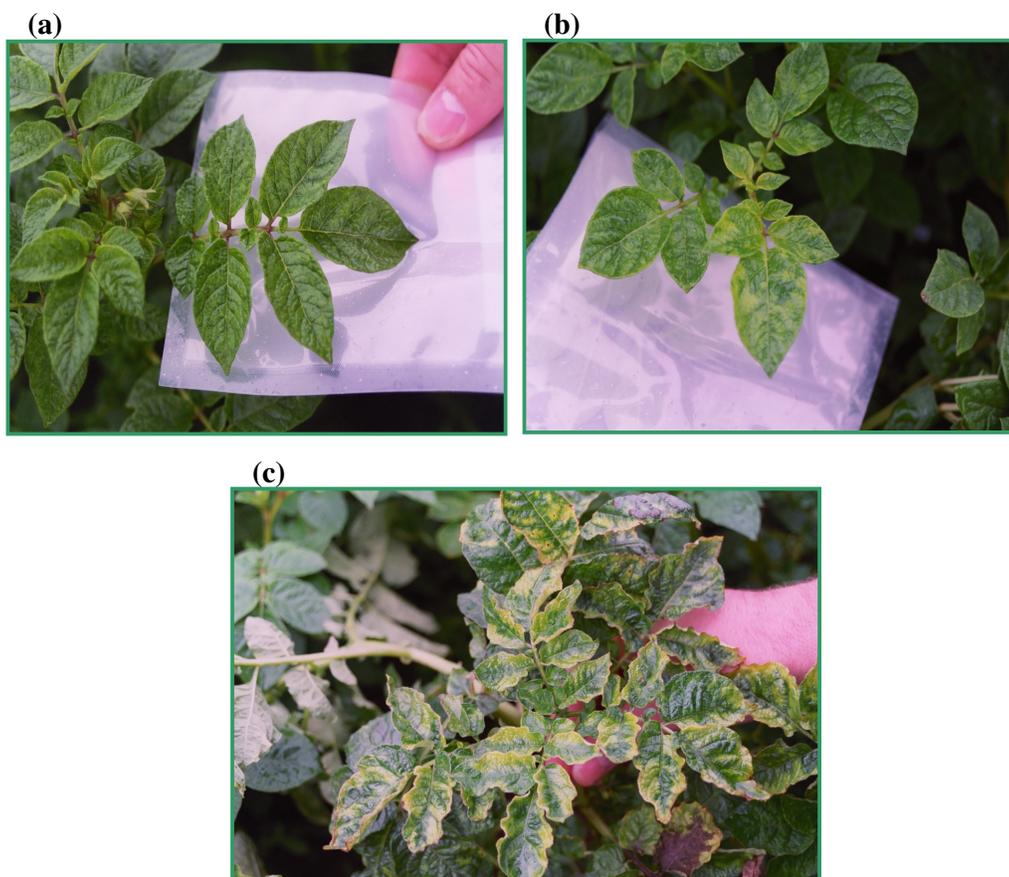


Fig.32. Distintos grados de severidad en síntomas. (a) Mosaico ligero (b) Mosaico severo (c) Mosaico intenso acompañado de ondulado y arrugado foliar. En todas está presente PVA, asociado con PVY y PVS. (Fuente: Trabajo Campo GBVa-ULL).

Etiología

PVA es un miembro de la familia *Potyviridae*, género *Potyvirus*. Es un virus de ARN con partículas filamentosas de 730 x 15 nm (Fig 33) (Bartels, 1971).

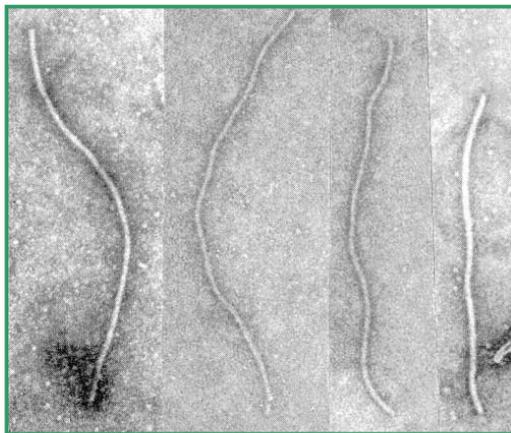


Fig. 33 .Fotografía al microscopio electrónico de transmisión de partículas de PVA por la técnica de IEM y decoración (Fuente: Rothamsted Research Center, <http://www.dpvweb.net>).

Transmisión

Es transmitido por injerto y por áfidos (Rouselle *et al*; 1999). Al menos 7 especies de áfidos se consideran que transmiten este virus entre los que destacan: *Aphis frangulae*, *Macrosiphum euphorbiae* y *Myzus persicae*. Es un virus no persistente en sus insectos vectores, que pueden volverse infectivos con sólo quince segundos de alimentación en las plantas enfermas, pero el poder de retención del virus es muy breve.

Diagnóstico

Puede ser detectado por métodos serológicos (ELISA), por métodos de hibridación de ácido nucleicos (NASH), mediante las técnicas moleculares (RT-PCR), así como mediante el uso de plantas indicadoras.

Respecto a las plantas indicadoras empleadas para realizar transmisión por injerto se considera de manera especial por reaccionar con intensidad variable según la raza del virus: *Nicandra physaloides*. Aunque también *Lycopersicon pimpinellifolium* es una planta útil para identificar este virus, pues causa una necrosis en las hojas inferiores, que termina por generalizarse a toda la planta, a los doce o quince días de haber sido inoculada (Fernández, 1995).

Razas o variantes

Algunos autores han determinado la patogenicidad de numerosos aislamientos en *Nicandra physaloides* pudiendo distinguir al menos cuatro razas en relación a la virulencia: ligero, medio, severo-moderado y severo (Calvert, 1960)

Daños

Se considera que es responsable del 40 % del descenso en la producción (CIP, 1996), especialmente cuando las plantas son afectadas por razas de mayor virulencia dando lugar a la aparición de síntomas severos. Sin embargo, este virus puede ser llevado sin síntomas en muchas variedades, no causando daños importantes en cuanto al rendimiento de la cosecha.

Asociado con el virus X produce una acción sinérgica de efectos graves en el follaje (crinkle) y en la productividad (CIP, 1996).

IV.2.1.5 Familia: FLEXIVIRIDAE

Género: CARLAVIRUS

Especie: POTATO VIRUS M

Acrónimo: PVM

PVM es el responsable de la enfermedad denominada como “parencrinkle” (encrespamiento).

Salaman y Le Pelley (1930), en Inglaterra, comprobaron que los injertos de plantas aparentemente sanas de la variedad King Edward a plantas de papa de las variedades Presidente y Arran Victory, producían efectos graves de

intenso mosaico y hasta la muerte de las plantas en la variedad Arran Victory, mientras que en la otra no se manifestaba síntoma alguno. Supusieron que la causa de estos síntomas eran uno o más virus, llevados en forma enmascarada en la variedad King Edward. Denominaron “parencrinkle” a esta manifestación que por muchos años continuó despertando el interés de los investigadores, por su origen y comportamiento.

Descrito por Schultz y Folsom (1923) y Bagnall y col.; (1956). Es un virus de partículas filamentosas de 650 x 12 nm. Distribuido mundialmente, se transmite por jugos a un limitado rango de hospedadores, mientras que muchos aislados son transmitidos por áfidos de un modo no persistente (Rothamsted Research Center, <http://www.dpvweb.net>)

Hospedantes

Su hospedante natural es la papa, pero también se ha descrito para otras especies susceptibles como: *Gomphrena globosa*, *Datura stramonium*, *Nicotiana debneyi*, entre otras (Fernández, 1995)

Sintomatología

El rango de síntomas varía de ligero a severo dependiendo de la variedad infectada y de la raza de virus causante. Los síntomas más comunes son: moteados, mosaicos, arrugamiento y enrollado foliar y achaparramiento de los brotes (Fig. 34) (Hooker, 1981).

Algunos complejos sintomatológicos parecen ser causados por la asociación de virus M con virus S y X. Se producen entonces enfermedades que han recibido distintas denominaciones según la variedad de papa que afecte: “intervenial mosaic” (moteado intervenial); cuando algunas variedades de papas se presentan infectadas por estos tres virus a la vez. “Leaf rolling mosaic” (mosaico enrollado de la hoja) se manifiesta por un intenso mosaico de las hojas y un enrollamiento hacia arriba de sus bordes. “Paracrinkle” (encrespamiento), en este caso se produce un encrespamiento de hojas con parches cloróticos y en las generaciones subsiguientes se originan plantas enanas.

La mayoría de las variedades de papa infectadas por PVM también contienen PVS. En tal caso, la manifestación de síntomas depende de la virulencia de la variante de PVM implicada en la infección (Howard y Wainwright, 1960).



Fig. 34 Sintomatología mostrada por la asociación de PVM, PVS y PVA. (a) Abarquillado, abullonado y ligera clorosis (b) Fuerte abarquillado, encrespamiento del margen de la hoja, abullonado. (c) Ondulación del margen de los folíolos (ligera deformación), fuerte abullonado, ligera clorosis (d) Abarquillado con ligera deformación del extremo foliar, marcado clorosis, ligera ondulación del margen foliar. (Fuente: Trabajo campo GBVa-ULL).

Etiología

El virus M de la papa (PVM) pertenece al género de los *Carlavirus* (Fig. 35). Es un virus con ARN monocatenario, de partículas filamentosas casi rígidas, de dimensiones 650 x 12 nm. (Hooker, 1981).

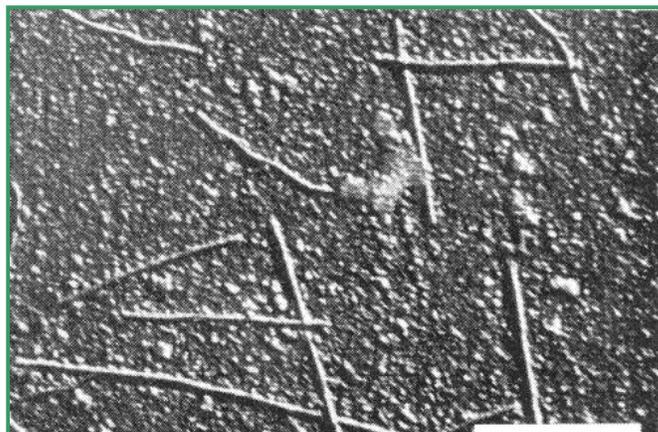


Fig. 35. Fotografía microscopio electrónico de barrido de partículas de PVM. (Rothamsted Research Center, <http://www.dpvweb.net>).

Transmisión

Se transmite por injerto, por jugos y por el áfido *Myzus persicae* en un modo no persistente; menos eficientemente por *Aphis frangulae*, *A. nasturtii* y *Macrosiphum euphorbiae* (Hooker, 1981). *Myzus persicae* transmite “paracrinkle” (encrespado). *M. Persicae*, *Macrosiphum euphorbiae* y *Myzus pelargonii* transmite “leafrolling mosaic” (mosaico enrollado de los folíolos) causado por la asociación del virus M con los virus S y X (Fernández, 1995).

Razas o variantes.

Se han llegado a citar hasta cuatro razas para este virus, sin embargo existe confusión a este respecto dada la tendencia de este virus a presentarse asociado con los virus S y X. Así, en algunas variedades de papa ciertas manifestaciones atribuidas a este virus son en realidad causadas por un complejo de virus, especialmente el complejo viral M-S responsable de la

enfermedad “leaf rolling mosaic” (mosaico enrollado de los folíolos), “intervenial mosaic” (mosaico intervenial) y X.

Diagnóstico

El método serológico (ELISA) parece ser el más empleado para su detección si bien pueden emplearse otros métodos como la hibridación de ácidos nucleicos (NASH) o el uso de plantas indicadoras.

Daños

En muchas variedades, el virus M causa daños inapreciables, sin embargo la asociación de este virus con el virus S y X puede dar lugar a daños mucho más graves. Las pérdidas en el rendimiento están en torno a una media de 10 a 15% (Fernández, 1995)

IV.2.1.6 Familia: FLEXIVIRIDAE

Género: CARLAVIRUS

Especie: POTATO VIRUS S

Acrónimo: PVS

PVS da lugar a síntomas que dependen de la raza del virus y de la variedad de papa. Debido a la forma inadvertida de la manifestación de sus síntomas, en el pasado, la enfermedad debida al virus S recibió el nombre de “virosis enmascarada” o “enfermedad latente de la papa”.

Descrito por De Bruyn Ouboter (1952) y Rozendaal (1952). Es un virus de ARN, encapsulado en unas partículas filamentosas rígidas a ligeramente curvadas de 650 x 12 nm característico del género *Carlavirus* y que presenta una distribución mundial.

Hospedantes

Presenta un rango de hospedante muy estrecho, limitado a especies pertenecientes a la familia *Solanaceae* y *Chenopodiaceae*. Se transmite por

inoculación de jugos. Las hojas de plantas infectadas muestran una ligera clorosis, endurecimiento de la superficie y ondulación del margen foliar.

Entre las especies susceptibles cabe citar: *Gomphrena globosa*, *Chenopodium album*, *Datura bernhardii*, *D. Metel*, *D. Stramonium*, *Nicotiana debneyi*, *Solanum acaule*, etc. (Hooker, 1981).

Sintomatología

Como ya señalamos, los síntomas dependen de la raza del virus y de la variedad de papa. En muchas ocasiones los síntomas producidos por este virus son inexistentes o muy leves en la mayoría de los casos.

De presentarse, se caracteriza por un moteado suave, visible principalmente en días nublados y tiempo fresco. En otras ocasiones causa enanismo y a veces un bronceado y otras manifestaciones foliares que frecuentemente se confunden con las que produce la carencia de potasio en el terreno (Fig. 36). La asociación con otros virus produce una exaltación de los síntomas (Fernández, 1995).

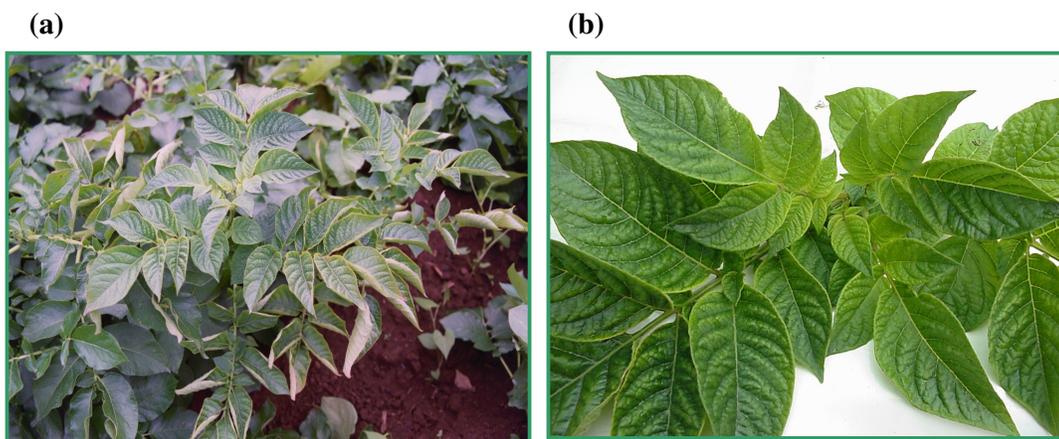


Fig. 36 Síntomas causados por PVS. Abarquillado, clorosis y ligero fruncimiento Internerval. (a) Efectos en planta entera. (b) Detalle. (Fuente: Trabajo campo GBVa).

Etiología

El virus S de la papa (PVS) pertenece al grupo de los *Carlavirus* (Wetter, 1971). Es un virus de ARN encapsulado en unas partículas filamentosas rígidas a ligeramente curvadas de 650 x 12 nm.

Transmisión

Es un virus que se transmite principalmente por contacto. Sin embargo, algunas razas pueden ser transmitidas eficientemente por áfidos, siendo *Myzus persicae* la especie citada como vector natural, con transmisión no persistente (Salazar, 1995).

Razas o variantes

Al menos dos grupos de variantes se han citado en papa. La diferencia principal entre las dos es la infección sistémica causada en *Chenopodium amaranticolor* y *C. quinoa* por las variantes andinas (Salazar, 1995).

Diagnóstico

El método serológico (ELISA) parece ser el más empleado para su detección si bien pueden emplearse otros métodos como: la hibridación de ácido nucleicos (NASH), el uso de plantas indicadoras y las técnicas de RT-PCR (Singh, 1999).

Daños

A pesar de la presencia generalizada del virus en el cultivo, y la susceptibilidad de casi todas las variedades cultivadas, sus efectos no son importantes. La acción del virus S sobre la cosecha se traduce en un relativo aumento en el número de pequeños tubérculos. Respecto a las pérdidas en el rendimiento está a la misma altura que el virus X, es decir en torno a un 5 o 15 % (Rousselle *et al*; 1999).

IV.3 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

IV.3.1 TÉCNICA DE DAS-ELISA

IV. 3.1.1 Introducción

La inmunodiagnosia tiene dos elementos fundamentales: el antígeno y el anticuerpo. Un antígeno es un agente químico o biológico capaz de estimular una respuesta inmunológica específica cuando es introducido en un animal. Las proteínas son excelentes antígenos, de ahí que se emplee la cubierta proteica de los virus como la base para la inmunodiagnosia.

Respecto a los anticuerpos, éstos son producidos cuando un antígeno es inyectado a un animal, el cual desarrolla una respuesta inmunológica frente a él. Las células del sistema linfático son las responsables de la producción de anticuerpos. Dado que cada célula del sistema linfático acepta un determinante antigénico del antígeno, un antígeno con múltiples determinantes antigénicos producirá anticuerpos con diferentes especificidades. Así, el suero del animal que contiene estos anticuerpos es llamado policlonal. Si las células que secretan anticuerpos son aisladas individualmente y continúan produciendo anticuerpos, éstos tendrán la misma especificidad y por ello se denominarán anticuerpos monoclonales.

El uso de métodos serológicos es hoy en día una de las técnicas más habituales para la detección de virus en papa. Avrameas (1969) desarrolló el uso de anticuerpos marcados con enzimas para su empleo en las técnicas serológicas convencionales. Sin embargo, la técnica denominada **ensayo de inmunoabsorción con conjugados enzimáticos** (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) fue desarrollada por Engvall y Perlmann (1971). Esta técnica fue empleada primero para detectar enfermedades infecciosas en humanos y animales (Voller *et al.*, 1974). Su uso para la detección de virus en plantas fue descrito por Soller y colaboradores (1976) y Clark y Adams (1977), y fue adoptada rápidamente para la detección de virus y otros patógenos. Varios tipos de ensayo de inmunoabsorción con conjugados enzimáticos han sido descritos y se aplican de acuerdo a las necesidades de la investigación o aplicación (Casper, 1977; Cambra *et al.*, 1979; Salazar, 1979, Sánchez-

Vizcaino y Cambra, 1981), si bien la técnica original descrita por Clark y Adams (1977) es aún la más utilizada.

La técnica de ELISA se basa en la producción de un conjugado anticuerpo-enzima en el cual ambas moléculas retienen sus propiedades individuales. El anticuerpo se adhiere al antígeno mientras que la enzima detecta y amplifica tal reacción. Esta técnica nos permite discriminar entre materiales sanos y enfermos de un modo cualitativo o bien determinar cuantitativamente la concentración de virus en una muestra.

La principal ventaja de las técnicas de ELISA es su practicidad, por producir resultados rápidos y confiables con la mayoría de los virus y su aspecto económico, permitiendo analizar un gran número de muestras sin elevados costes adicionales, por lo que puede ser fácilmente adaptada en programas de mejoramiento de semilla.

IV.3.1.2 Material

Para la realización de las pruebas de DAS-ELISA se tomaron muestras de hojas de cada una de las entradas de las tres variedades. Un total de 8 plantas por entrada fueron analizadas, lo que hizo un total de 48 muestras. Este material se encontraba en la finca experimental del Cabildo Insular de Tenerife en la localidad de la Esperanza. Las pruebas se realizaron dos veces a lo largo del tiempo de cultivo: la primera transcurrida tres meses de la siembra y la segunda un mes antes de la cosecha.

Por otro lado, tubérculos de este mismo material, que nos fue suministrado por el Servicio de Agricultura del Cabildo fueron sembrados en macetas con turba y vermiculita (1:1), y mantenidos bajo condiciones de invernadero en nuestras dependencias sobre los cuales se realizaron idénticos análisis.

IV 3.1.3 Metodología

Para nuestros estudios llevamos a cabo la técnica ELISA de doble anticuerpo (DAS-ELISA) descrita por M.F. Clark y A.N. Adams, en 1977 y que

comprende 4 etapas que se describen de manera esquemática a continuación (Fig. 37):

1.- *Sensibilización o recubrimiento de la placa.* Los anticuerpos (gammaglobulina, IgG) específicos para cada virus son adheridos a la superficie de cada pocillo de la placa de microtitulación. Se necesita un anticuerpo específico para cada virus.

2.- *Preparación de las muestras y adición a la placa.* La muestra a analizar es añadida a los pocillos de la placa. Si la muestra contiene partículas del virus específico (antígeno) para los anticuerpos aplicados quedaran adheridos a ellos.

3.- *Adición del conjugado enzimático.* Estos anticuerpos conjugados con la enzima quedan unidos a las partículas de virus que hayan quedado unidas a las IgG adheridas a la superficie del pocillo en el paso inicial.

4.- *Adición del sustrato y desarrollo de la reacción.* Finalmente, el sustrato es agregado a la placa. Si en el pocillo existe Inmunoglobulina conjugada a una enzima el sustrato es degradado, teniendo lugar una reacción colorimétrica (el pocillo adquiere una coloración amarilla característica de la reacción enzimática). El valor de absorbancia es medido en un espectrofotómetro a 405nm.

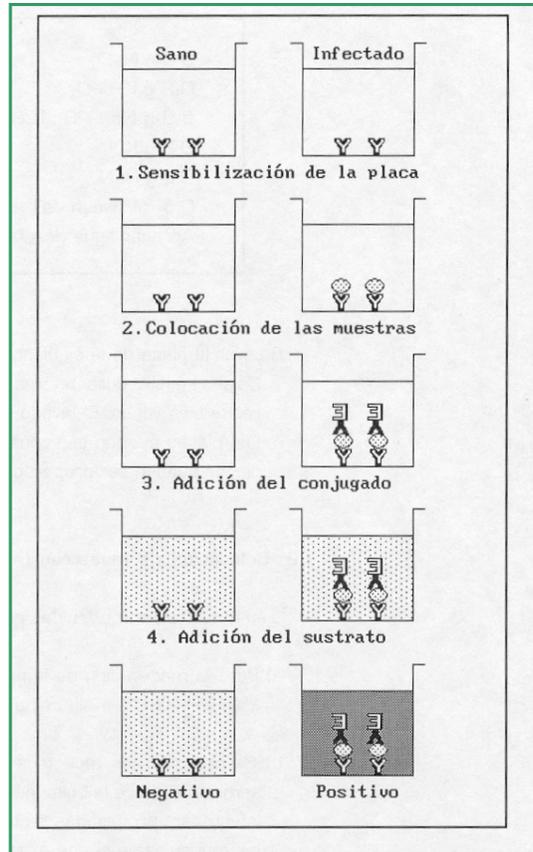


Fig. 37 Representación esquemática de la técnica de DAS-ELISA. (Fuente: Técnicas en virología de plantas. Centro Internacional de la Papa, CIP, 1997)

1.- Sensibilización o recubrimiento de la placa

Esta primera etapa consiste en cubrir los pocillos de la placa de microtitulación con un anticuerpo específico para cada virus. El set de anticuerpos policlonales empleados (IgG), así como los conjugados enzimáticos (IgG-AP) fueron suministrados por el Departamento de Virología del Centro Internacional de la Papa (CIP, Perú) y empleados a una dilución 1:300. Para realizar la sensibilización de la placa se diluyeron cada una de las gammaglobulinas purificadas (anticuerpos) en un tampón de cobertura¹. Se añadió 100 μ l de esta nueva mezcla a cada uno de los pocillos de la placa de microtitulación.

Las placas fueron incubadas durante tres horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo de incubación, la placa se lavó con PBS-Tween² para la eliminación de la IgG no adherida a ella.

2.- Preparación de las muestras y adición a la placa

Las muestras fueron extraídas por maceración del tejido vegetal, para ello, las hojas fueron recolectadas en bolsas de extracción, a las que posteriormente se les agregó el tampón de extracción³ en una relación de 3 ml por gramo de tejido. Las muestras fueron maceradas con ayuda de un rodillo o tubo de ensayo grande.

Una vez macerado el tejido, 100 μ l del mismo se depositaron en cada uno de los pocillos, entonces las placas son selladas e incubadas a 4 °C durante toda la noche.

3.- Adición del conjugado enzimático

Transcurrido el tiempo de incubación, la placa vuelve a ser lavada como se indicó anteriormente, hasta que el color verde de la muestra se eliminó por completo. A continuación se añadió el conjugado enzimático, en este caso la IgG está conjugada con la enzima fosfatasa alcalina (enzima fosfatasa alcalina-gammaglobulina: IgG-AP) y se incubó nuevamente a 37° C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo la placa se lavó como ya se indicó, para que el exceso del conjugado enzimático no adherido a las partículas víricas sea eliminado.

4.-Adición del sustrato y desarrollo de la reacción

Finalmente se añadieron 80 μ l de la solución sustrato. El sustrato a emplear dependerá de la enzima que ha sido conjugada con el anticuerpo. En nuestro caso, se empleó la fosfatasa alcalina, cuyo sustrato para es el p-nitrofenil fosfato.

El sustrato puede adquirirse en polvo o peletizado (en pastillas de concentración conocida). En nuestro caso usamos la versión peletizada del producto (Sigma, N-9389). Disolviendo cada pastilla en un volumen de 12 ml de tampón sustrato⁴.

1, 2, 3, 4 Ver Anexo I

Una vez agregado el sustrato, la placa se incubó a temperatura ambiente por el tiempo necesario hasta que se observe la reacción. Los pocillos que contengan muestras infectadas adquieren una coloración amarilla, fácilmente visible y que puede ser cuantificada con la ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm. En nuestro caso empleamos un lector de ELISA Thermolab System.

Las muestras fueron consideradas positivas cuando el valor de absorbancia era dos veces superior a la media de los valores de absorbancia de los controles sanos.

IV. 3.1.4 Resultados análisis DAS-ELISA

A continuación se representan los resultados obtenidos tras la realización de los análisis en el material de campo (Fig. 38 y 39). Para cada una de las entradas se muestra el porcentaje de plantas infectadas por cada uno de los virus para las que se realizó el ensayo, traduciéndose esos valores como porcentajes de incidencia de cada virus sobre cada una de las entradas analizadas.

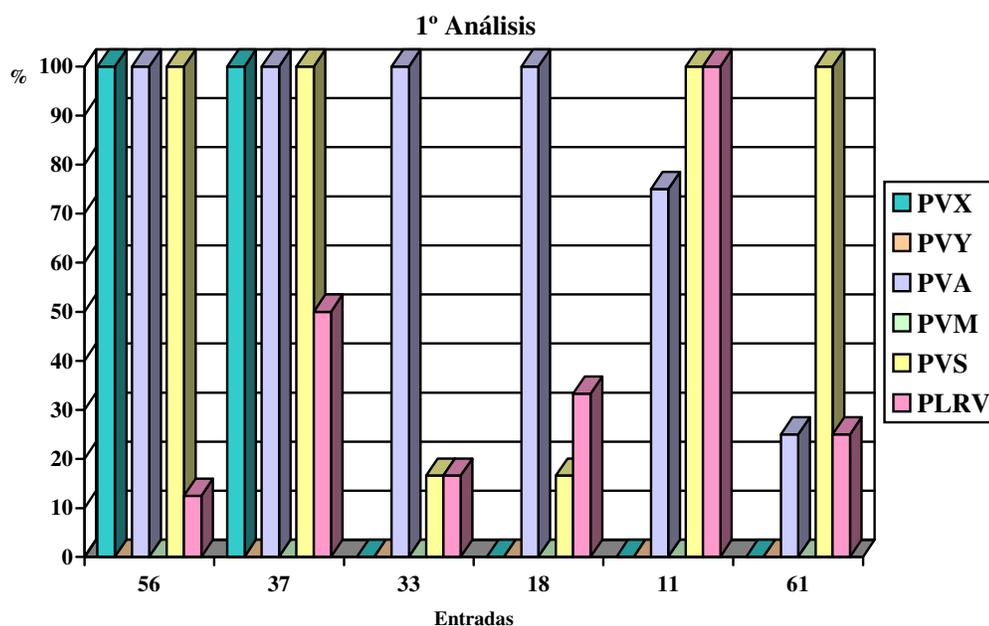


Fig. 38. Incidencia de los virus PVX, PVY, PVA, PVM, PVS y PLRV expresada en porcentaje de incidencia sobre cada una de las entradas por variedad analizadas en el primer ensayo de campo. Entradas 56 y 37, Mora; entradas 33 y 18, Borralla; entradas 11 y 61, Torrenta.

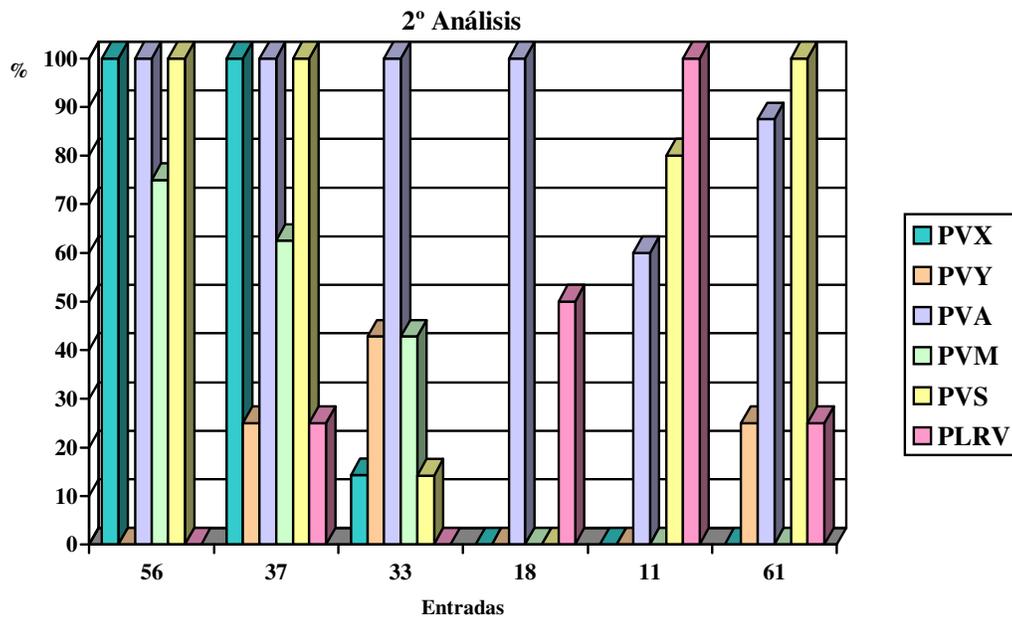


Fig. 39. Incidencia de los virus PVX, PVY, PVA, PVM, PVS y PLRV expresada en porcentaje de incidencia sobre cada una de las entradas por variedad analizadas en el segundo ensayo de campo. Entradas 56 y 37, Mora; entradas 33 y 18, Borralla; entradas 11 y 61, Torrenta.

Tras analizar la distribución de los virus en las distintas entradas, observamos que los virus M (PVM) e Y (PVY) se muestran ausentes en el primer ensayo, y aparecen con distintos grados de incidencia sobre las entradas de las variedades Mora (37 y 56), Borralla (33) y Torrenta (61) en el segundo análisis. Estas diferencias se deben principalmente a que si bien el material a analizar es el mismo, los análisis no se han realizado sobre la misma hoja. Además habría que considerar que la distribución de los virus dentro de la planta no es homogénea. Por tanto, si bien no podemos hacer un análisis comparativo entre estos dos ensayos, los resultados sí que nos permiten evaluar qué virus se presentan con una mayor incidencia, así como qué variedad muestra una mayor carga vírica.

Observamos que el virus A (PVA) fue detectado en todas las muestras analizadas de las entradas 37 y 56 (Mora) y de las entradas 33 y 18 (Borralla) en los dos análisis de campo realizados, si bien fue detectado tan solo en un 70 % y un 20 % de las entradas 11 y 61 respectivamente de la variedad

Torrenta en el primer análisis (Fig. 38). Estos porcentajes fueron superiores en el segundo ensayo para la entrada 61 de esta misma variedad (Fig. 39).

Los virus X (PVX) y S (PVS) fueron detectados en un 100 % de las muestras de las dos entradas de la variedad Mora (37 y 56) en los dos análisis de campo. Sin embargo, en las entradas de la variedad Torrenta el virus S fue detectado en el 100 % de las muestras analizadas de las dos entradas (11 y 61) durante el primer ensayo (Fig. 38); pero en el 80% de las muestras de la entrada 11 y en el 100 % de las muestras de la entrada 61 en el segundo análisis de campo (Fig. 39). Respecto a la distribución de PVX en las entradas de esta variedad, observamos que tanto en el primer análisis como en el segundo, en ninguna de las muestras se detectó la presencia de este virus. Así mismo, en las entradas 33 y 18 de la variedad Borralla este virus fue detectado en un bajo porcentaje de las plantas analizadas en el primer ensayo (Fig. 38), y en ninguna de las plantas analizadas de la entrada 18 durante el segundo ensayo (Fig. 39).

Respecto a la distribución del virus del enrollado de la hoja (PLRV) entre las tres variedades, como podemos observar en las figuras 38 y 39, fue detectado principalmente en las entradas de la variedad Torrenta, mostrándose en el 100 % de las plantas analizadas de la entrada 11 para los dos análisis y en torno al 25 % de las plantas de la entrada 61. En las variedades Mora y Borralla fue detectado únicamente en plantas de la entrada 18 (Borralla), aproximadamente en un 50 % de las analizadas en el segundo ensayo; mientras que en el primer ensayo fue detectado en un bajo porcentaje de plantas de ambas entradas (18 y 33). En la variedad Mora el comportamiento es similar, siendo detectado en aproximadamente un 25 % de plantas de la entrada 37 (Mora) durante el segundo ensayo y casi en un 50 % de plantas de esta misma entrada durante el primer ensayo.

Si consideramos a nivel de variedad cuál de ellas muestra una mayor incidencia de virus, nos encontramos que la variedad Mora prácticamente presenta incidencia de al menos tres de los virus analizados: PVX, PVA y PVS en casi el 100 % de las muestras analizadas, si bien algunas de las plantas analizadas mostraron además PVM o PLRV principalmente. La variedad Torrenta mostró también al menos 3 de los virus con mayor incidencia en las

muestras analizadas: PVS, PLRV y PVA, no llegando a ser el 100 % de las muestras analizadas como en la variedad Mora. En la variedad Borralla tan solo el PVA se presenta en el 100 % de las muestras analizadas, encontrándose el resto de los virus en unos porcentajes muy inferiores al resto de lo observado en las otras variedades.

Cuando pasamos a analizar los resultados obtenidos de las plantas de invernadero, se observan los resultados que quedan representados en la siguiente gráfica y que muestran una gran diferencia con respecto a los resultados de campo, poniendo de manifiesto nuevamente la imposibilidad de realizar un análisis comparativo entre los resultados de estos análisis al no estar realizados sobre el mismo material y además ser las condiciones de desarrollo diferentes, si bien nos permite observar la distribución de los virus en la variedades estudiadas, mostrándonos que variedad presenta una mayor incidencia de virus y qué virus parecen ser los que se distribuyen de manera mayoritaria en las muestras analizadas.

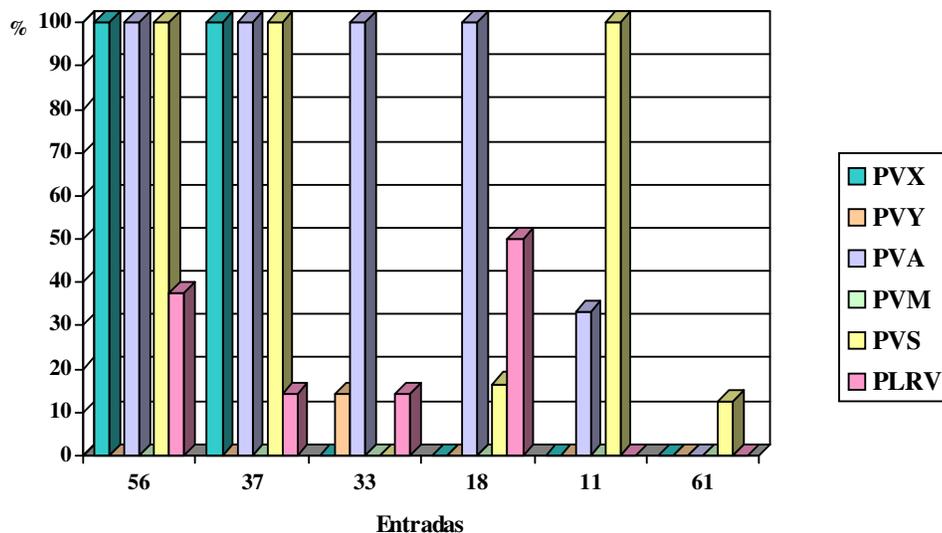


Fig. 40. Incidencia de los virus PVX, PVY, PVA, PVM, PVS y PLRV expresada en porcentaje de incidencia sobre cada una de las entradas por variedad analizadas en el invernadero. Entradas 56 y 37, Mora; entradas 33 y 18, Borralla; entradas 11 y 61, Torrenta.

En las plantas analizadas en invernadero observamos que PVX fue detectado en todas las muestras de las entradas 37 y 56 (Mora), mostrándose

ausente en el resto de las entradas (Fig. 40). PVY y PVM fueron detectadas por DAS-ELISA solamente en algunas muestras de la entrada 33 (Borralla). PVA y PVS mostraron la distribución más heterogénea: PVA fue detectado en todas las muestras de las entradas de la Mora y Borralla, en algunas de las plantas de la entrada 11 (Torrenta), pero totalmente ausente en las muestras de la entrada 61 (Torrenta). Por otro lado, PVS fue detectado en todas las muestras de las entradas 37 (Mora) y 61 (Torrenta) y en algunas muestras de la entrada 56 (Mora), 18 (Borralla) y 61 (Torrenta), pero totalmente ausente en las muestras de la entrada 33 (Borralla). Mientras que PLRV fue detectado en extractos de hojas de las variedades Mora y Borralla (Fig. 40).

Observamos además que la distribución de los virus en las variedades en estudio se mantiene de un modo homogéneo en todos los análisis, la variedad Mora parece estar infectada mayoritariamente por PVX, PVA y PVS; mientras que en las variedades Borralla y Torrenta los virus con más incidencia son PVA y PVS, respectivamente, presentándose además las mayores diferencias en los resultados de estas variedades en invernadero frente a campo. Esta situación refleja como el desarrollo de la virosis y la manifestación de la enfermedad está directamente relacionada con las condiciones ambientales de desarrollo de la planta, así como de la carga vírica propia de los tubérculos usados como semillas.

Estos análisis ponen de manifiesto la presencia de enfermedades virales en estas tres variedades de papa antiguas de Tenerife, lo cuál podría estar relacionado con la baja productividad de estas variedades. Además podemos establecer una cierta correlación entre la carga vírica de cada una de las variedades analizadas y su distribución geográfica. Las entradas con una mayor carga vírica (37 y 56, var. Mora; 33, var. Borralla) proceden de la misma región, Anaga, una de las zonas con una mayor tradición en el cultivo de papas antiguas. Esto podría explicar que las entradas de la var. Mora sean las que se muestren con una mayor carga vírica, pues esta variedad constituía en el pasado una de las principales variedades de cultivo en la zona (Gil, 1999), por lo que el cultivo reiterado con semillas propias puede haber llevado a que en esta variedad se muestre tal carga vírica. En la actualidad, esta variedad se ha reemplazado en gran medida por la variedad Borralla, de

modo que el cultivo conjunto con la anterior variedad puede haber influido en un aumento en la carga vírica de esta variedad, reflejado en la entrada 33 recolectada de esta misma localidad. Pues en las muestras de la entrada 18 de la misma variedad la carga vírica mostrada es menor. Esta entrada fue recolectada en la zona de Teno Alto, localidad aislada y muy alejada del Macizo de Anaga.

Por otro lado, observamos que las entradas de la variedad Tormenta, mostraban también una menor carga vírica. Esta variedad se cultiva principalmente en la zona de la Esperanza, si bien las entradas analizadas proceden tanto de esta localidad (entrada 11) como de la zona de Tacoronte (entrada 61). Ambas localidades se encuentran aisladas entre ellas, lo que explica las diferencias en la carga vírica de las entradas, y a su vez aisladas de la zona de Anaga, que parece mostrarse como la zona geográfica con una mayor carga viral, debido probablemente al tratarse de una zona donde el cultivo de la papa es muy tradicional, relegado, en el caso de estas variedades antiguas, a parcelas familiares que llevan a cabo las labores de campo de un modo tradicional y sin uso de maquinaria agrícola, situación que puede haber hecho que en las variedades de esta zona el proceso acumulativo de la carga vírica en las semillas se haya intensificado.

IV 3.2 TÉCNICA DE RT-PCR

IV 3.2.1 Introducción

La infección de virus sobre plantas puede dar lugar a grandes pérdidas económicas, no sólo por la acción en sí del virus en la cosecha sino por su habilidad para permanecer en las semillas o en el material vegetal que se emplea para la propagación (Singh 1989; Mandahar, 1990; Agrios, 1990). Esta situación lleva a que las medidas preventivas constituyan la base para producir plantas libres de virus y viroides. Algunas de las actuaciones que se llevan a cabo son el diagnóstico y detección de virus en el material de campo, el control de los vectores transmisores de virus, los métodos post-cosecha como la siembra de tubérculos semillas bajo condiciones controladas para la evaluación visual de síntomas (Slack y Singh, 1998; Maury *et al.*, 1998) y los análisis ELISA para determinar los niveles víricos en el material propagado. Sin embargo, estos métodos consumen mucho tiempo y no son aplicables a tubérculos dormantes (Huttinga, 1996; Singh y Singh, 1996).

El rápido avance de la biología molecular, en particular de las técnicas basadas en el ácido nucleico, ha permitido desarrollar herramientas útiles en el diagnóstico y detección en el campo de la virología. Por ejemplo, la técnica de hibridación de ácidos nucleicos para la detección de viroides a gran escala fue empleada por primera vez por Owens y Diener (1981) y para virus de plantas en la década de los ochenta Gould y Symons 1983, y Maule 1983. Posteriormente, la técnica de amplificación de ácidos nucleicos (PCR) proporcionó una nueva vía para el análisis y detección de virus en plantas.

La PCR es un método muy eficiente y específico para la amplificación *in vitro* de muestras de ADN (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986). Esta tecnología se ha aplicado con éxito en el estudio y diagnóstico de varios patógenos virales de ADN (Rybcki y Hughes, 1990; Pasamontes *et al.*, 1991; Soler *et al.*, 1991). Sin embargo, la mayor parte de los virus de plantas considerados de gran importancia por su efecto en el rendimiento poseen un genoma de ARN (Mattwes, 1991). Varios métodos desarrollados para determinar este tipo de patógenos combinan la reacción de transcripción

reversa (RT), donde un cDNA es sintetizado a partir de un ARN molde y luego amplificado por PCR (RT-PCR) (Vunsh *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1991; Korschineck *et al.*, 1991; Langeveld *et al.*, 1991; Nicolas y Laliberte, 1991; Robertson *et al.*, 1991).

Un protocolo típico de RT-PCR consiste en la extracción de ácidos nucleicos, diseño y síntesis de cebadores específicos, transcripción reversa del ARN (síntesis del cDNA), amplificación del fragmento de ácido nucleico deseado con la ayuda de un termociclador y visualización mediante electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados.

IV 3.2.2 Material

Hojas de las variedades Mora y Torrenta analizadas durante los ensayos epidemiológicos de diagnóstico mediante DAS-ELISA fueron conservadas a -20 °C y empleadas en los ensayos de estandarización de un protocolo de detección mediante RT-PCR. También se emplearon tubérculos dormantes de la variedad Mora, de ellos se tomó material de los ojos para realizar los ensayos.

IV 3.2.3 Metodología

Se ensayaron dos protocolos de amplificación de ácidos nucleicos básicos, realizándose distintas modificaciones en los diferentes ensayos de estandarización. El protocolo 1 basado en la técnica de detección por inmunocaptura y amplificación de ácidos nucleicos (IC-RT-PCR) y el protocolo 2 basado en la técnica de amplificación de ácidos nucleicos sobre extractos de plantas (RT-PCR). Los virus para los cuales estas técnicas fueron ajustadas son los que aparecen en la tabla 13, donde se refleja además las parejas de cebadores específicos empleados para cada uno de ellos en los ensayos.

El **protocolo 1** se inicia con un paso de inmunocaptura idéntico al que se realiza en un ensayo de DAS-ELISA. Así, los microtubos son *tapizados* con la inmunoglobulina (IgG) correspondiente al virus que se va a detectar en una

dilución 1:300 en tampón carbonato pH 9,6.⁵ Añadimos 100 μ l de esta disolución a cada tubo e incubados durante 2h a 37° C.

Una modificación en este paso inicial se ensaya cuando en lugar de detectar un único virus, se desea realizar una detección múltiple. En este caso, una mezcla de IgG de aquellos virus que se deseen detectar se preparan tal y como señalamos anteriormente, diluidos 1:300 en tampón carbonato⁵ pH 9,6 y 100 μ l de la mezcla son añadidos a los microtubos (ensayo III, ver ANEXO III).

Las inmunoglobulinas (IgGs) empleadas en los ensayos fueron las mismas que se emplearon en los ensayos de diagnóstico mediante DAS-ELISA de este trabajo, suministradas por el Dpto. de Virología del Centro Internacional de la Papa.

Transcurrido el tiempo de incubación los tubos de PCR fueron lavados 3 veces con PBS-Tween⁶, este paso debe realizarse con especial cuidado para evitar contaminaciones.

Las muestras a analizar son homogeneizadas en bolsas con 300-500 μ l de tampón de extracción ELISA⁷ estéril. Se añadieron 100 μ l de este homogeneizado a los microtubos se incubaron a 4° C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se procedió nuevamente a un lavado con PBS-Tween⁶, extremando nuevamente las precauciones para evitar las posibles contaminaciones.

A continuación se preparó la mezcla de RT-PCR⁸ y 80 μ l de dicha mezcla fueron añadidos a los tubos de PCR, los cuales fueron transferidos al termociclador para que la reacción de retrotranscripción y amplificación se sucediera según el programa establecido (ensayo I y II, ver ANEXO III).

El **protocolo 2** se llevó a cabo sin el paso inicial de inmunocaptura. Las muestras a analizar fueron homogeneizadas en el tampón de extracción ELISA⁷, dos diluciones de ese extracto fueron ensayadas: 1:25 y 1:50. Además se realizó un ensayo de detección múltiple con este mismo protocolo, empleándose diluciones del extracto de: 1:50 y 1:100.

En todos los casos los fragmentos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1 % en TBE⁹. Para la visualización de los fragmentos con luz ultravioleta en un transiluminador, el gel es teñido con bromuro de etidio¹⁰ 1µg/ml durante 15 minutos aproximadamente.

En el ANEXO III se esquematizan los distintos ensayos, así como se destacan las variaciones realizadas en los programas de PCR ensayados.

VIRUS	SECUENCIA DEL CEBADOR	LOCALIZACIÓN	FRAGMENTO ESPERADO	REFERENCIA
PVX	P5': tga cac aac aca ggc caca g P3': ggc agc att cat ttc agc ttc	Cápside protéica: P5':5664-5683 nt P3':6225-6205 nt	562 bp	SKryabui <i>et al.</i> , 1988
PVS ₁	P5': cct caa aaa ggc aca att caa c P3' aat ctc agc gcc aag cat c	Cápside protéica (Ac.#Y15613):	683 bp	Mataušek <i>et al.</i> , 2000
PVS ₂	P5': tgg cga aca ccg agc aaa tg P3': atg atc gag tcc aag ggc act g	Cápside protéica (Ac.#Y15613):	187 bp	Mataušek <i>et al.</i> , 2000
PLRV	P5': cgc gct aac aga gtt cag cc P3': gca atg ggg gtc caa ctc at	Cápside protéica: P5': 3670-3689 P3': 4005-3986	336 bp	Singh <i>et al.</i> , 1995
PVA	P5': gtt gga gaa ttc aag atc ctg g P3': ttt ctc tgc cac ctc atc g	Gen codificante de la P1	255 bp	Singh and Singh, 1998
PVY	P5': aaa tga cac aat tga tgc agg ag P3': taa aag tag tac agg aaa agc ca	Capside protéica	800bp	Blanco-Urgoitie <i>et al.</i> , 1996

Tabla 13. Descripción de los cebadores empleados en los métodos de diagnóstico. Se describe ubicación del cebador en el genoma, tamaño del fragmento esperado para cada virus, así como la referencia a los autores.

IV. 3.2.4 Resultados y discusión

Ensayo I: Protocolo IC-RT-PCR simple

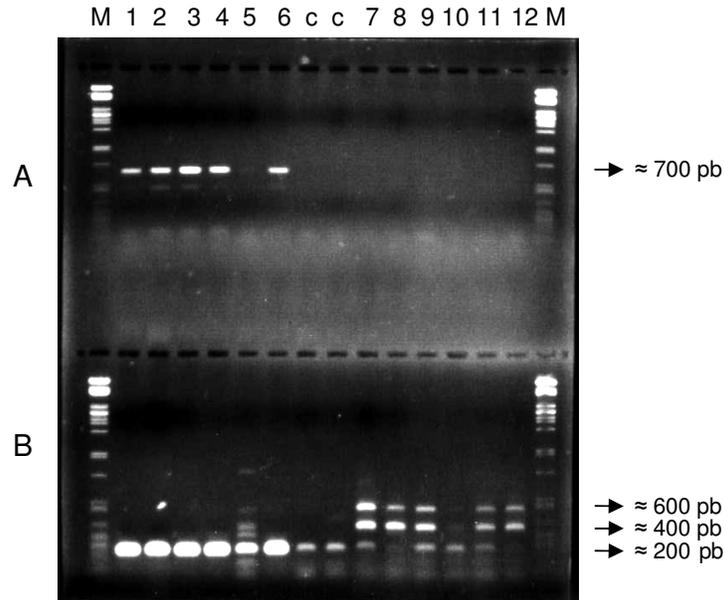


Fig. 41. Detección de PVS mediante IC-RT-PCR. Temperatura de anillamiento 55° C. (A) Amplificación de fragmentos de aproximadamente 700 pb con los cebadores PVS₁ en las líneas 1, 2, 3, 4 y 6, hojas de la var. Tormenta. (B) Amplificación de fragmentos de aproximadamente 200 pb, líneas 1, 2, 3, 4 y 6, hojas de la var. Tormenta, y fragmentos de 200 pb a 600 pb, líneas 5, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, correspondiente a muestras de hojas (línea 5) y de tubérculos (resto de líneas) de la var. Mora. C: Control negativo. M = Marcador λ Pst I.

En la figura 41 se muestran los resultados obtenidos de la amplificación con los dos cebadores para PVS mostrados en la tabla 9. Observamos que para la detección de PVS con la combinación de oligos (1) (PVS₁, Tabla 13) se obtuvo un tamaño de fragmento esperado (entorno a 700 pb), si bien las muestras amplificadas fueron aquellas de la variedad Tormenta, no amplificando las muestras de la variedad Mora.

Para la combinación de oligos (2) de PVS (PVS₂, Tabla 13) observamos que además del tamaño de banda esperado (en torno a 200 pb) se obtuvieron múltiplos de las mismas, para las muestras de hojas y tubérculos de la var.

Mora (Fig. 41; líneas 5, 7, 8, 9, 10, 11 y 12), mientras que para las muestras de la var. Tormenta se obtuvo un único fragmento del tamaño esperado (Fig.41; Líneas 1, 2, 3, 4 y 6).

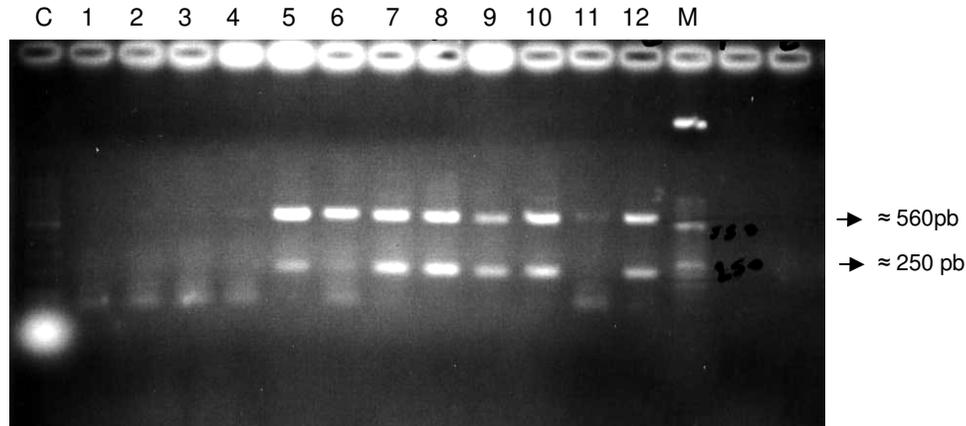


Fig. 42. Detección de PVX mediante IC-RT-PCR. Temperatura de anillamiento de 55° C. Fragmentos amplificados de aproximadamente 560 pb y 250 pb , líneas: 5 (hoja), 7, 8, 9, 10 y 12 (tubérculos) var. Mora. Línea 6 (hoja, var. Tormenta). M: Lader Promega, 50 pb.

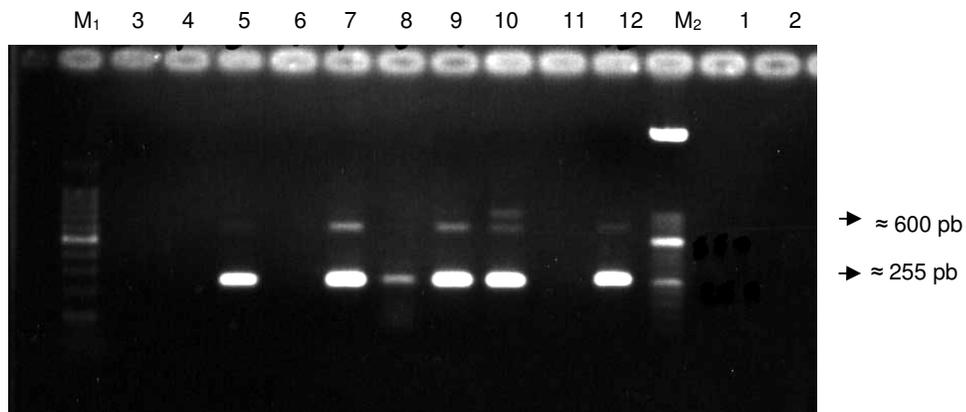


Fig. 43. Detección de PVA mediante IC-RT-PCR. Temperatura de anillamiento de 55° C. Fragmentos amplificados del tamaño esperado (255 pb) en líneas 5 (hojas), 7, 8, 9, 10, 12 (tubérculos) var. Mora. Fragmentos de 600 bp en líneas 7, 9, 10 y 11 (tubérculos, var. Mora). Líneas no amplificadas corresponden a muestras de la var. Tormenta. M₁: Marcador λ Pst I, M₂: Lader Promega, 50 pb.

En la figura 42 se muestran los resultados de la amplificación mediante la técnica de IC-RT-PCR con los cebadores para PVX y con los cebadores para PVA en la figura 43. Observamos que para PVX (Fig. 42) además del tamaño de

banda esperado (entorno a 560 pb) se obtuvieron fragmentos de menor de tamaño (250 pb), siendo las muestras amplificadas aquellas pertenecientes a la var. Mora (líneas: 5; hoja; 7, 8, 9, 10 y 12; tubérculos), y no detectándose amplificación en las muestras de la var. Torrenta (Línea 6).

Resultados similares observamos con la amplificación para PVA (Fig. 43), detectándose el tamaño de fragmento esperado (aproximadamente 255 pb) en todas las muestras de la var. Mora (líneas: 5; hoja; 7, 8, 9, 10 y 12; tubérculos), si bien en algunas de ellas también se obtuvieron fragmentos múltiples de las mismas (líneas 7, 9, 10 y 11; tubérculos). No observándose amplificación en las muestras de la var. Torrenta.

La duplicidad de fragmentos observada para los cebadores con PVS₂, PVX y PVA nos lleva a considerar que la temperatura de anillamiento para estos cebadores fuese demasiado baja permitiendo la unión inespecífica a otras regiones del genoma vírico y dando lugar por consiguiente a esta duplicidad de fragmentos.

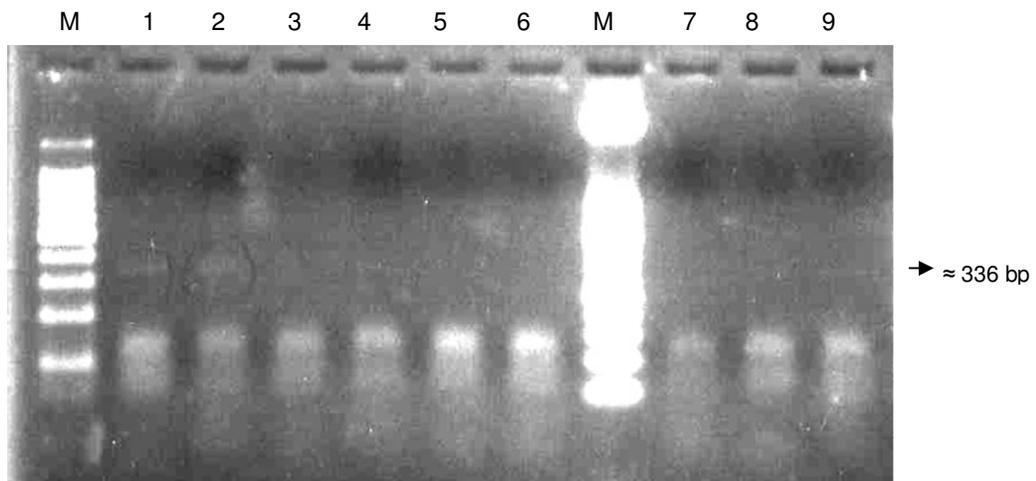


Fig. 44. Detección de PLRV mediante IC-RT-PCR. Temperatura de anillamiento de 55°C. Tamaño del fragmento amplificado de aproximadamente 336 pb, líneas 1 y 2 (hojas, var. Torrenta). M: Marcador λ Pst I.

Sin embargo, la duplicidad de bandas no se observa cuando se realiza la técnica de IC-RT-PCR con los cebadores para PLRV, observándose la amplificación de las muestras 1 y 2 (var. Torrenta) con un tamaño de banda esperado (entorno a 336 pb, Fig. 44).

Los resultados ponen de manifiesto en primera instancia la eficiencia del método de Inmuncaptura y el hecho de que la reacción de transcripción se lleve a cabo sin la ruptura química o térmica de los viriones inmovilizados, paso requerido en otros protocolos (Jansen *et al.*, 1990; Wetzel *et al.*, 1992). Por otro lado, es de destacar el alto grado tanto de especificidad como de sensibilidad del método, la cual está en el rango de los métodos basados en RT-PCR (Vunsh *et al.*, 1990; Korschineck *et al.*, 1991; De Haan *et al.*, 1991; Wetzel *et al.*, 1991; Borja y Ponz, 1992; Wetzel *et al.*, 1992). Trabajos referentes a la comparación entre la técnica DAS-ELISA y PCR demuestran que la sensibilidad de ésta última está muy por encima, permitiendo la detección de virus en baja concentración, como pueda ser el caso de la detección de virus en tubérculos dormantes (Singh *et al.*, 1999; Souza-Díaz *et al.*, 1999; Varveri, 2000; Nie y Singh, 2001). Además, la posibilidad de aplicar esta técnica a distintos tipos de material, tanto hojas como tubérculos, su fiabilidad para la identificación de diferentes patógenos virales y la facilidad de automatización, hace que pueda ser empleada de manera rutinaria, y por tanto, integrada como técnica de diagnóstico en los programas de certificación de semillas (Nolasco *et al.*, 1993).

Habría que señalar las diferencias observadas entre los resultados obtenidos para las seis primeras muestras mediante la técnica de DAS-ELISA y los resultados obtenidos por IC-RT-PCR. En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos tras la técnica de DAS-ELISA para las seis muestras en cuestión. Cuando comparamos estos resultados con los obtenidos por IC-RTR-PCR (Figs. 41, 42, 43 y 44) observamos una cierta correlación entre ellos, reflejándose la mayor diferencia en los resultados referentes a PVA. Este virus fue detectado mediante DAS-ELISA en las cinco primeras muestras, si bien únicamente obtuvimos amplificación en la muestra 5. Esto nos lleva a plantearnos que los cebadores empleados para PVA han de ser revisados, si bien un abordaje más interesante sería llevar a cabo un estudio de caracterización de las especies virales presentes en estas variedades, lo que permitiría disponer de pruebas tanto serológicas como moleculares mucho más específicas.

Es sabido que la diversidad mostrada en algunos virus está íntimamente ligada a las características del hospedante. De manera que, la selección de ciertas progenies virales está relacionada con la capacidad de adaptación de éstas al hospedante, el cual ha sufrido cambios genéticos durante la domesticación y a lo largo de las sucesivas adaptaciones a nuevos hábitos y labores de manejo (García-Arenal *et al.*, 2001). Recordemos que se considera que estas variedades se instalaron en las islas tras la conquista y desde entonces han sufrido un proceso de selección durante la adaptación al agro canario, durante este proceso se ha producido paralelamente una selección de las progenies virales que mejor se han adaptado a las nuevas características del hospedante, el cual se ha adaptado a unas latitudes, clima, condiciones edáficas, etc diferentes a las de origen.

MUESTRAS	MATERIAL	VIRUS DETECTADOS MEDIANTE DAS-ELISA
1	Hojas, var. Torrenta	PVA, PVS, PLRV
2	Hojas, var. Torrenta	PVA, PVS, PLRV
3	Hojas, var. Torrenta	PVA, PVS
4	Hojas, var. Torrenta	PVA, PVS
5	Hojas, var. Mora	PVX, PVA, PVS
6	Hojas, var. Torrenta	PVLR, PVS

Tabla 14. Virus detectados mediante la técnica de DAS-ELISA en 6 de las muestras empleadas en los ensayos de IC-RT-PCR y de RT-PCR.

Ensayo II: Protocolo IC-RT-PCR

Como comentados en los resultados del ensayo I, una de las posibles causas de la obtención de duplicidad de bandas podía deberse a la temperatura de anillamiento empleada, lo que nos llevó a plantearnos este ensayo II en el que realizamos el mismo protocolo de detección, una IC-RT-PCR, pero variando la temperatura de anillamiento a 60° C.

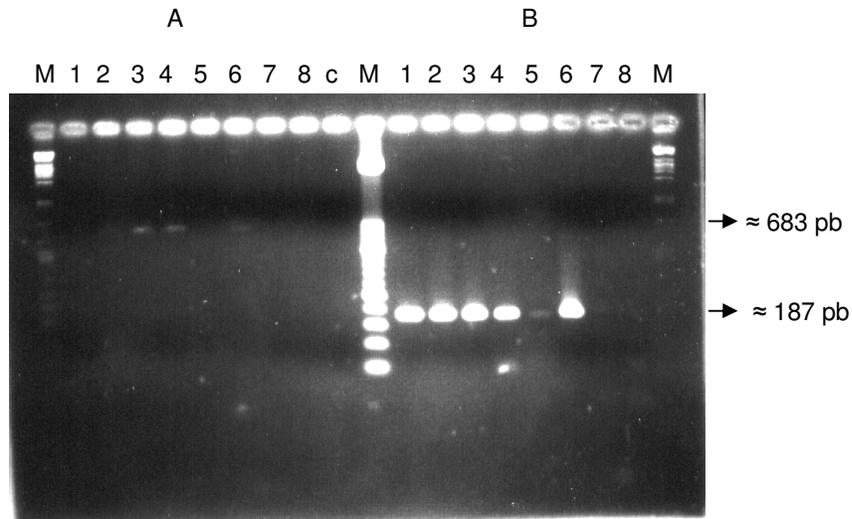


Fig. 45. Detección de PVS mediante IC-RT-PCR. Temperatura de anillamiento de 60° C. (A) Amplificación de fragmentos de 683 pb con los cebadores PVS₁ en las líneas 3, 4 y 6, hojas var. Torrenta. (B) Amplificación de fragmentos de 187 pb con los cebadores PVS₂ en las líneas 1, 2, 3, 4, y 6, hojas var. Torrenta. M: Marcador λ Pst I; C: control negativo.

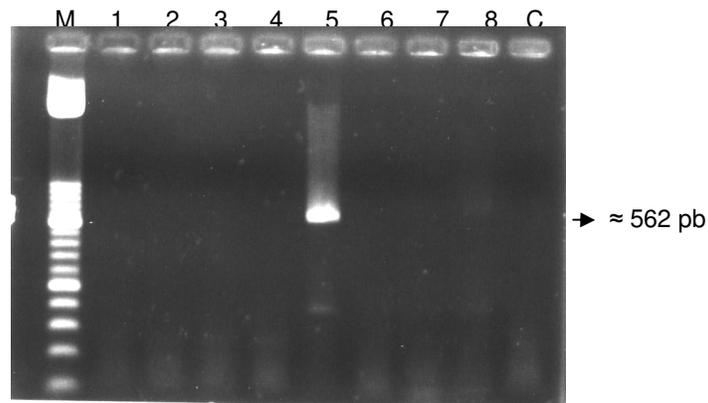


Fig. 46. Detección de PVX mediante IC-RT-PCR. Temperatura de anillamiento de 60° C. Amplificación de fragmento de 562 pb con los cebadores PVX en la línea 5 hojas var. Mora. M: Lader Promega, 50 pb. C: Control negativo.

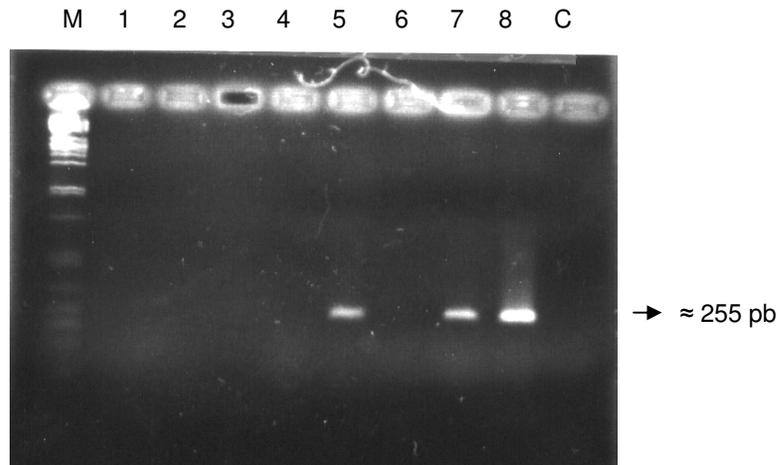


Fig. 47. Detección de PVA mediante IC-RT-PCR. Temperatura de anillamiento de 60° C. Amplificación de fragmento de 255 pb con los cebadores PVA en las líneas 5, 7 y 8 hojas y tubérculo var. Mora. M: Marcador λ Pst I C. Control negativo

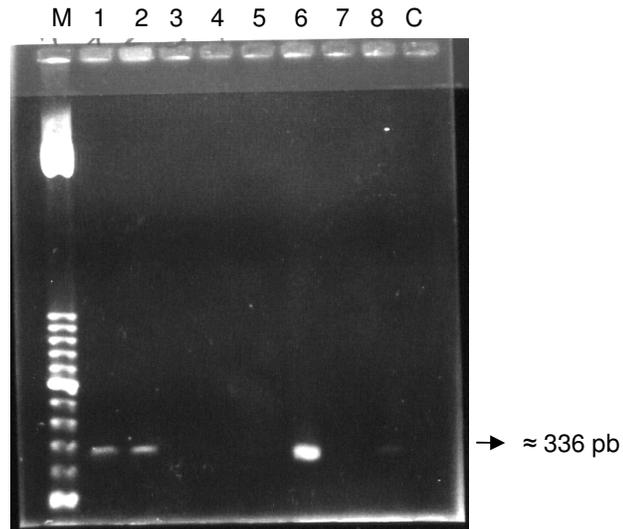


Fig. 48. Detección de PLRV mediante IC-RT-PCR. Temperatura de anillamiento de 60° C. Amplificación de fragmento de 336 pb con los cebadores PLRV en las líneas 1, 2, y 6, hojas var. Tormenta. Marcador: Lader Promega, 50 pb C: Control negativo

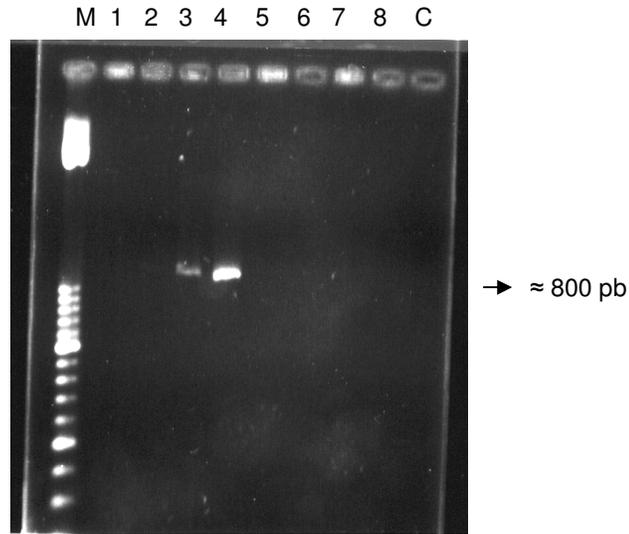


Fig. 49. Detección de PVY mediante IC-RT-PCR. Temperatura de anillamiento de 60° C. Amplificación de fragmento de 800 pb con los cebadores PLRV en las líneas 3 y 4, hojas var. Torrenta. Marcador: Lader Promega, 50 pb. C: Control negativo.

En las figuras 45 a 49 se muestran los resultados de la detección de virus mediante la técnica de IC-RT-PCR, empleando una temperatura de anillamiento durante la reacción de PCR de 60° C para las distintas parejas de cebadores ensayadas: PVS₁, PVS₂, PVX, PVA, PLRV y PVY.

En la figura. 45 observamos los resultados de la detección de PVS mediante IC-RT-PCR empleando una temperatura de anillamiento de 60° C. Vemos la amplificación de fragmentos de 683 pb con los cebadores PVS₁ en las líneas 3, 4 y 6, hojas var. Torrenta y amplificación de fragmentos de 187 pb con los cebadores PVS₂ en las líneas 1, 2, 3, 4, y 6, hojas var. Torrenta.

Los resultados de la detección de PVX lo vemos en la figura 46. Se detectó amplificación de fragmento de 562 pb con los cebadores PVX en la línea 5 hojas var. Mora. No detectándose la presencia de este virus mediante ésta técnica y bajo estas condiciones en las muestras de tubérculos de esta misma variedad ni en las muestras de hojas de la variedad Torrenta.

Respecto a la detección de PVA (Fig. 47), observamos fragmentos de 255 pb en las líneas 5, 7 y 8 hojas y tubérculo var. Mora, no mostrándose amplificación en las muestras de la var. Torrenta.

En cuanto a la detección de PLRV (Fig. 48) se obtuvieron fragmentos de 336 pb en las líneas 1, 2, y 6, correspondientes a muestras de hojas de la var. Torrenta. No observándose amplificación de fragmentos en las muestras de la var. Mora.

Finalmente, y respecto a los resultados de la detección de PVY (Fig. 49), detectamos fragmentos de 800 pb con los cebadores PLRV en las líneas 3 y 4, correspondientes a muestras de hojas de la var. Torrenta, no observándose detección de este virus mediante esta técnica y en estas condiciones en las muestras de la var. Mora

Observamos que la modificación de la temperatura de anillamiento da lugar a bandas definidas y fragmentos de los tamaños esperados para todas las muestras analizadas. Así mismo, se pone de manifiesto las diferencias entre los cebadores PVS₁ y PVS₂, que amplifican las muestras de la variedad Torrenta y no de la variedad Mora.

Destacar la correlación existente entre los análisis de DAS-ELISA y los resultados de IC-RT-PCR de las muestras para la detección de PVX, PLRV y PVS; pero no así para PVA y PVY. Este último no fue detectado por DAS-ELISA en ninguna de las muestras analizadas, mientras que por IC-RT-PCR da lugar a un producto de amplificación de aproximadamente 800 pb en las muestras foliares de la var. Torrenta (muestras 3 y 4). Por su parte, PVA fue detectado por DAS-ELISA en las muestras 1, 2, 3, 4 (var. Torrenta) y 5 (var. Mora), mientras que mediante IC-RT-PCR fue detectado en las muestras 5, 7 y 8 (var. Mora).

Observamos pues que las principales diferencias entre los resultados obtenidos por la técnica de DAS-ELISA y la de IC-RT-PCR para las mismas muestras se da para los virus PVY y PVA, ambos miembros del grupo de los *Potyvirus*, uno de los grupos de virus de mayor importancia en el cultivo de la papa por su fuerte efecto en el rendimiento y en consecuencia por las pérdidas económicas que pueda llegar a ocasionar.

Si bien es cierto que la región Andina constituye el centro de origen, así como de domesticación de la mayoría de los cultivares de papa (Hawkes, 1990), muchos, si no la mayoría de los *Potyvirus* que afectan a este cultivo pueden haberse originado en ese mismo lugar y diseminarse mediante germoplasma contaminado durante el proceso de propagación de este cultivo al resto de países (Salazar, 1971; Jones, 1981; Stevenson *et al.*, 2001). De modo que la aparición de nuevas razas virales está asociada al proceso de selección que las variedades de papas originadas en Perú debieron sufrir para adaptarse a las nuevas zonas de cultivo.

Considerando la antigüedad de estas variedades canarias y tras los resultados obtenidos en estos análisis cabría pensar que estas diferencias en la detección de PVY y PVA puedan estar relacionada con variaciones presentes en estos virus acaecidas durante ese proceso de adaptación paralela de las papas antiguas a nuestro entorno Canario. Bajo esta premisa se plantea la necesidad de realizar un estudio de caracterización molecular de las especies virales que las afectan, no sólo como herramienta para desarrollar y establecer las técnicas de diagnóstico adecuadas, sino también como contribución a los estudios que se puedan llevar a cabo sobre la relación patógeno-hospedante, así como estudios filogenéticos de los virus.

En nuestro caso, vemos como la adición de una mezcla cebadores para cinco virus seleccionados nos permite la detección simultánea de hasta 3 virus. Recordemos que esta muestra, por la técnica de DAS-ELISA reveló la presencia de tan solo PLRV y PVS (Tabla, 14), por lo que la técnica de detección múltiple ensayada revela que no parece existir ningún tipo de interacción entre las parejas de cebadores seleccionadas, permitiendo además la detección de PVX, el cual no fue detectado mediante DAS-ELISA en esta misma muestra, pero sí detectados mediante RT-PCR simple.

La transición de IC-RT-PCR simple a una IC-RT-PCR múltiple requiere ciertas consideraciones. En primer lugar, en el paso de inmunocaptura, pues hay que tener en cuenta que deben de emplearse tantas inmunoglobulinas como virus se deseen detectar, tal y como se realizó en este ensayo. De esta manera se lleva a cabo un tapizado múltiple de los microtubos de PCR, lo que pudiera implicar que algunas IgGs se vean favorecidas en el paso inicial de inmunocaptura, o incluso la unión de la IgG con su antígeno sea más fuerte para unos virus que otros y por tanto la reacción de amplificación posterior revele la presencia de unos virus y no otros. En segundo lugar, una RT-PCR múltiple requiere la reoptimización de la concentración de ciertos reactivos. Un incremento de Mg^{2+} , dNTPs y de polimerasas, así como un reajuste en la concentración de cebadores y la proporción de cada par de cebadores son algunas de las variables que afectan de un modo significativo en una PCR múltiple (Edwards y Gibbs, 1995).

Sin embargo, observamos que en nuestros ensayos y respecto al paso inicial de inmunocaptura, las IgG se han empleado a la misma relación que en una IC-RT-PCR simple, añadiéndose como única variación el empleo de una mezcla de ellas.

Respecto a la reacción en sí de RT-PCR, el primer paso que requeriría un reajuste es la concentración de reactivos en el paso de la RT. Incrementar como mínimo dos veces la concentración de dNTPs para la síntesis de cDNA fue necesario para una RT-PCR duplex (Singh *et al.*, 2000). Pero cuando llevamos a cabo una IC-RT-PCR múltiple no parece que sea imprescindible una modificación en los reactivos de reacción. La figura 50 muestra como con la misma mezcla de reacción empleada en una IC-RT-PCR simple a la que

únicamente se han añadido tantas parejas de cebadores como agentes patógenos se desee detectar se consigue la amplificación de hasta tres virus de manera simultánea sobre una muestra (Fig. 50 B).

Relacionado también con el éxito de la reacción de RT, se considera que para una baja concentración de muestra puede ser necesario una alta concentración de cebadores antisentido (Singh *et al.*, 2000), lo que implicaría el empleo de un eficiente protocolo de extracción de ARN, que garantice una adecuada reacción de retrotranscripción (RT). Dado que en este protocolo la extracción de ácidos nucleicos se obvia y por tanto, la estandarización del mismo, habría que considerar otros factores como puedan ser los cebadores empleados y las posibles interferencias entre ellos como variables a analizar en el proceso de estandarizar este tipo de protocolos. La utilización de un cebador degenerado en la RT sirve para minimizar el número de cebadores antisentido en la reacción de RT (Saade *et al.*, 2000). Por otro lado, el uso de un oligo deoxiribosilimidina, como cebador común para aquellos virus que poseen ARNs poliadenilados en su extremo 3', constituyen modificaciones que han sido ensayadas en protocolos de RT-PCR múltiple y que podrían ser analizados para un IC-RT-PCR múltiple (Nie y Singh, 2000).

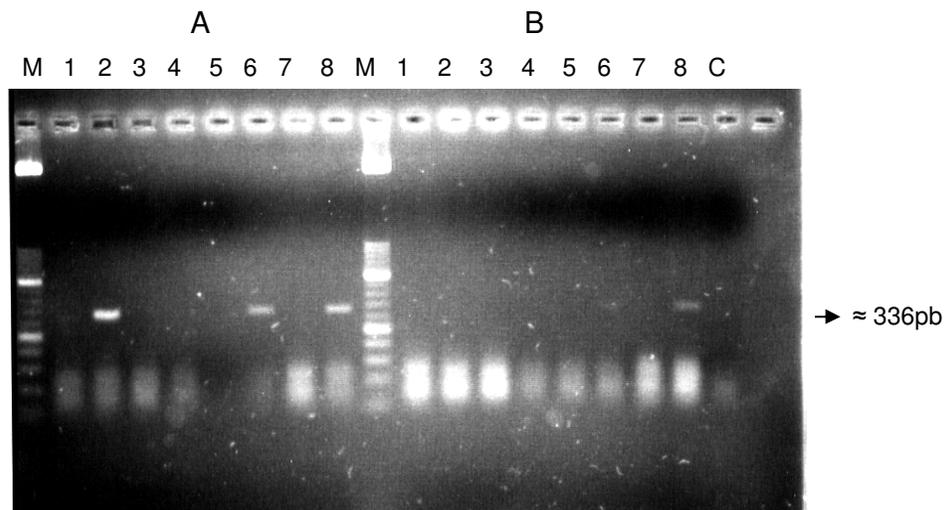
Ensayo IV: Protocolo RT-PCR simple

Fig. 51. Detección de PLRV mediante RT-PCR en extractos crudos de plantas. (A) Muestras diluidas 1: 25 (B) Muestras diluidas 1:50 . Líneas 1,2,3,4,y 6, hojas var. Torrenta; Líneas 5 (hojas), 7 y 8 (tubérculos) var. Mora. M: Marcador: Lader Promega, 50 pb; C: Control negativo.

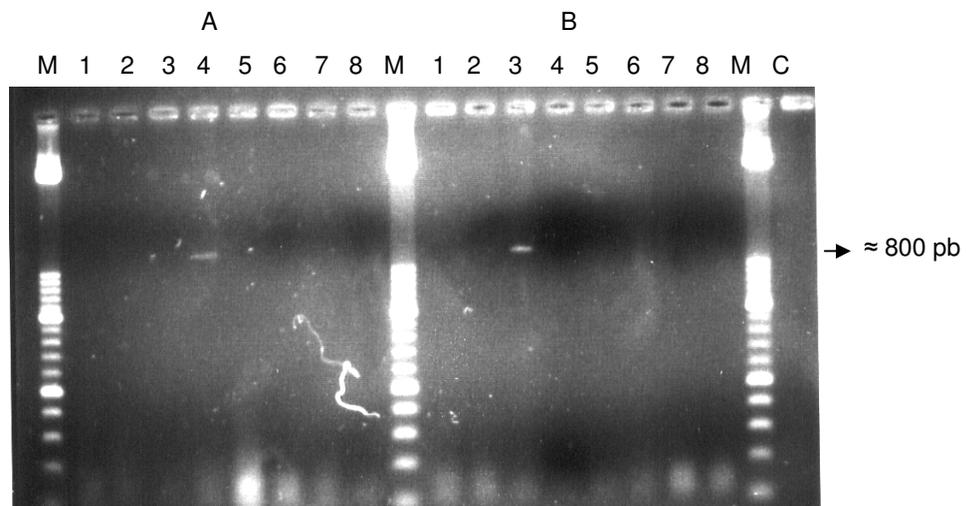


Fig. 52. Detección de PVY mediante RT-PCR sobre extractos crudos de plantas. (A) Muestras diluidas 1: 25 (B) Muestras diluidas 1:50 . Líneas 1,2,3,4,y 6, hojas var. Torrenta; Líneas 5 (hojas), 7 y 8 (tubérculos) var. Mora. M: Marcador: Lader Promega, 50 pb; C: Control negativo.

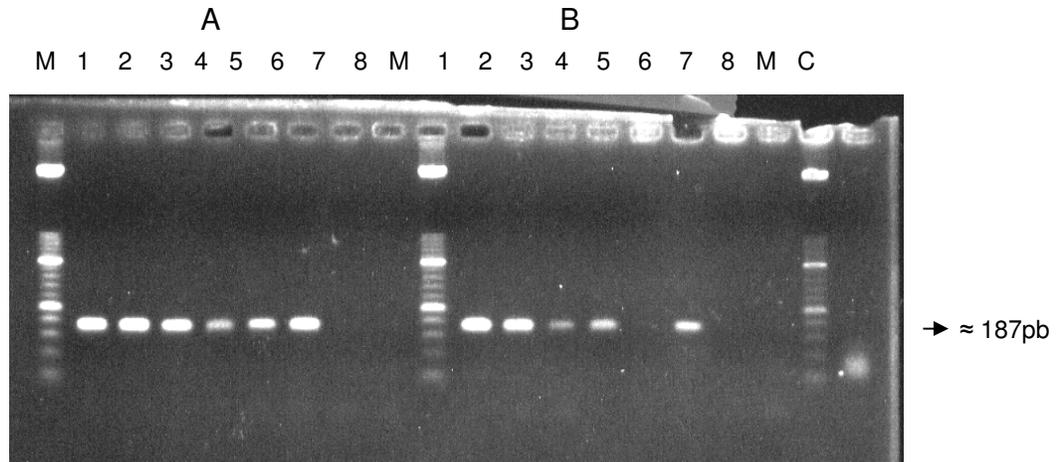


Fig. 53. Detección de PVS mediante RT-PCR empleando la pareja de cebadores PVS₁ sobre extractos crudos de plantas. (A) Muestras diluidas 1: 25 (B) Muestras diluidas 1:50 . Líneas 1,2,3,4,y 6, hojas var. Tormenta; Líneas 5 (hojas), 7 y 8 (tubérculos) var. Mora. M: Lader Promega, 50 pb; C: Control negativo.

En las figuras 51, 52 y 53 se muestran los resultados obtenidos de la detección de PVS, PVY y PLRV mediante RT-PCR sobre jugos de plantas en dos diluciones: 1:25 (A); y 1:50 (B). De manera general observamos que se obtienen fragmentos amplificados de la longitud esperada para las muestras de ambas diluciones, si bien se observa mejores resultados en las muestras diluidas 1:25 para la detección de los tres virus.

Los resultados obtenidos de este ensayo ponen de manifiesto como la detección de virus puede llevarse a cabo sobre muestras diluidas, lo que implicaría que es posible la detección de virus en bajas concentraciones y además nos permite no tener que llevar a cabo un protocolo específico de extracción de ácido nucleicos. Recordemos que en la extracción de ácidos nucleicos en plantas hay que prestar especial atención a los polifenoles, que pueden interferir en el proceso (John, 1992; Singh y Singh, 1996; Wah y Symons, 1997) pues estos compuestos son inhibidores de la RT-PCR (Singh *et al.*, 1998). Sin embargo, un amplio abanico de estrategias se han empleado con la finalidad de minimizar o reducir la actividad fenólica en los extractos, y entre ellas nos encontramos con la utilización de distintos compuestos en el protocolo de extracción, ej: polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico, 2-mercaptoetanol, sulfito de sodio, dodecyl sulfato (SDS), etc. (Rowhani *et al.*,

1993; Wah y Symons, 1997). En plantas herbáceas, por ejemplo, la adición de PVP (John, 1992; Koonjul *et al.*, 1999), tampón fosfato salino (PBS) (Barbara *et al.*, 1995) y la inclusión de ácido cítrico (Singh *et al.*, 1998) han contribuido a la inhibición de fenoles presentes en los extractos de plantas.

Otra estrategia empleada para minimizar inhibidores de PCR es el empleo de un protocolo de RT-PCR que involucra una inmunocaptura de los virus (Wetzel *et al.*, 1992; Nolasco *et al.*, 1993), tal y como se ha realizado en los ensayos anteriores y reflejando excelentes resultados. Esta técnica presenta la ventaja de no requerir un protocolo previo de extracción de ácidos nucleicos, pues solo se realiza una purificación parcial del virus a detectar mediante anticuerpos adheridos a una soporte sólido (paso inicial de un ELISA).

Sin embargo, esta técnica de detección de virus sobre extractos de plantas además de presentar la ventaja de no implicar un protocolo de extracción de ácidos nucleicos, nos permite realizar una detección directa sin el empleo de IgG como en el caso de la IC-RT-PCR, suponiendo ello en primer lugar un ahorro económico, y en segundo lugar, la posibilidad de llevar a cabo un protocolo de detección en un tiempo menor al requerido por una IC-RT-PCR, el cual involucra un paso de incubación con los IgG de al menos tres horas y por tanto minimizar los riesgos de contaminación en los proceso de lavados llevados a cabo en este protocolo.

Este tipo de estrategias facilita en gran medida la posibilidad de aplicar estos protocolos a los programas de certificación de semillas, por la sencillez de los mismos, el ahorro económico, en consumo de tiempo y la posibilidad de aplicarlos simultáneamente a un elevado número de muestras.

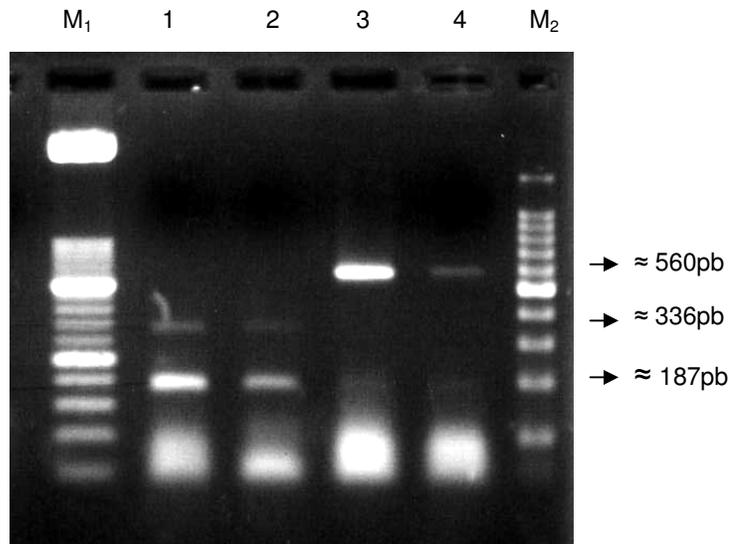
Ensayo V: Protocolo RT-PCR múltiple

Fig. 54. Detección simultánea de PVX, PVA, PLRV y PVS mediante RT-PCR múltiple sobre jugos de plantas en dos diluciones: 1:50 y 1:100. Línea 1: muestra 1 diluida 1: 50; línea 2: muestra 1 diluida 1:100, línea 3: muestra 5 diluida 1:50, línea 2: muestra 5 diluida 1:100. M_1 : Lader Promega. M_2 Marcador λ Pst I.

Cuando un protocolo de RT-PCR sobre extracto de plantas en diferentes diluciones se aplica para la detección simultánea de varios patógenos virales, se observa que permite al menos la detección simultánea de dos de los virus presentes en las muestras analizadas (Tabla 14), tal y como se refleja en la figura 54. Así como, la dilución de las muestras a 1: 50 parece dar mejores resultados, fragmentos más nítidos, que aquellas diluidas a 1:100.

Para la detección simultánea de varios virus se realiza una RT-PCR múltiple del modo que hemos descrito y que se diferencia de la RT-PCR simple en que en lugar de emplear una única pareja de cebadores, es necesario contar con tantas parejas de cebadores como patógenos diferentes buscásemos detectar.

La técnica de PCR múltiple fue desarrollada por primera vez en 1988 por Chamberlain y colaboradores (Chamberlain *et al.*, 1988), pero no fue introducida para la detección de patógenos en humanos y detección de virus

en plantas hasta mediados de los noventa (Chrisan, 1994; Bariana *et al.*, 1994). La PCR múltiple al permitir amplificar más de una secuencia a la vez en una reacción única supone un ahorro de tiempo y costos (Nemchinov *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1996; Sharman *et al.*, 2000).

Varios estudios se han llevado a cabo para determinar que factores afectan a la amplificación de secuencias en una multiplex-PCR (Chamberlain y Chamberlain, 1994; Henegariu *et al.*, 1997). Sin embargo, respecto a las variables para diseñar una multiplex-RT-PCR habría que considerar, aspectos relacionados con la reacción de retrotranscripción (RT), además de aquellos relacionados con la amplificación (PCR). Entre las variables a considerar nos encontramos con la calidad y cantidad de cDNA generado en la reacción de retrotranscripción (Singh *et al.*, 2000), la interacción de los cebadores con secuencias del virus no deseadas, el papel de los cebadores degenerado, etc. (Sharman *et al.*, 2000).

En lo que respecta al diseño de cebadores útiles en RT-PCR múltiple hay que considerar la especificidad del cebador, la compatibilidad de la T_m y más importante el tamaño de los fragmentos amplificados. Los fragmentos amplificados deben tener un tamaño suficiente como para poder ser separados en un gel de electroforesis de un modo eficiente (Nie y Singh, 2001). Bajo estos criterios fueron seleccionados y analizados los cebadores empleados en estos ensayos. Así, los tamaños de los fragmentos amplificados se encuentran en un rango de 200 pb a aproximadamente 800 pb, tamaños que fácilmente pueden ser visualizados en un gel de electroforesis. Además, todos ellos muestran una temperatura de anillamiento en el mismo rango, lo que facilita la posibilidad de que con un mismo programa de PCR se pueda llevar a cabo la amplificación simultánea de varios virus de acuerdo con las distintas parejas de cebadores. Observamos que si bien la temperatura de anillamiento teórica calculada para los cebadores empleados era de 55° C, los resultados obtenidos en el ensayo I reflejaron que, con esta temperatura se obtenían fragmentos de tamaños múltiples a los esperados, quedando determinado en el ensayo II la temperatura óptima de anillamiento para estos cebadores en 60° C.

Al mismo tiempo, para reducir las amplificaciones inespecíficas, las interacciones entre los diferentes pares de cebadores deben ser minimizadas (Chamberlin y Chamberlin 1994; Sharman *et al.*, 2000; Nie y Singh 2001. En nuestro caso, la selección de los cebadores, como los ensayos de inmunocaptura RT-PCR simple mostraron la eficiencia de los cebadores, recordemos que se obtuvieron en todos los ensayos los tamaños de banda esperados, poniéndose de manifiesto la especificidad de los mismos.

CAPÍTULO V
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

V. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

V.1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa tiene una plasticidad adaptativa que permite su cultivo en ambientes, tipos de suelo y temperaturas sumamente diversas. Esto ha permitido su cultivo en las islas desde el siglo XVI, manteniéndose hasta la actualidad como uno de los principales cultivos junto con el plátano y el tomate (Gil, 1997).

El paso del tiempo desde el origen de su cultivo en las islas hasta la actualidad, y el escaso intercambio de material con otras zonas productoras ha permitido la adaptación y evolución hacia ecotipos propios, variedades posiblemente con un potencial productivo alto, no solo entendido en términos de rentabilidad sino como germoplasma adaptado a un clima particular, y con muchas características de interés como el alto contenido de antocianinas.

Hemos de considerar además la carga de patógenos sistémicos en esta especie vegetal, la cuál está vinculada a la multiplicación vegetativa de este cultivo; especialmente de hongos y bacterias, como por ejemplo la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) y la sarna negra provocada por el hongo *Synchytrium endobioticum*. Las enfermedades fúngicas o bacterianas generadas por esta característica reproductiva tienen un control viable ajustando pautas de manejo y de desinfección del material de partida. Sin embargo, algo más complejo es el caso de los virus.

Los virus son patógenos muy difíciles de eliminar por parte del agricultor, necesita de largos y costosos programas de saneamiento, que implica etapas de extracción de meristemos, laboriosas etapas de diagnóstico y de adaptación del material a campo. Así, el establecimiento de programas de producción de semillas de alto rendimiento implica la conjunción de la mejora genética de los ecotipos regionales y un estricto control sanitario.

En este escenario debemos destacar la evolución paralela que probablemente hayan sufrido los virus en estos cultivos canarios, tal y como señalábamos en el apartado de resultados y discusión del capítulo IV. En este sentido, la búsqueda de variabilidad en especies virales constituye una fuente

inagotable de recursos para un mejor conocimiento de la interacción entre una planta y sus patógenos; esto nos lleva a realizar un estudio más conciso y caracterizar las especies virales que hemos detectado tras el empleo de las técnicas de diagnóstico rutinarias.

V.2 MATERIAL

Hojas de la variedad Torrenta y Mora conservadas en congelación a -20 °C, así como ojos de tubérculo de la variedad Mora fueron empleados en la estandarización de los protocolos de IC-RT-PCR y de RT-PCR. Del resultado de estos ensayos se seleccionaron aquellos fragmentos que mostraban una longitud distinta a la esperada, así como aquellos que manifestaron controversia en los resultados.

Los fragmentos seleccionados de los diferentes geles de electroforesis se muestran en el ANEXO IV, así como en la tabla 11 se muestran el nombre asignado a cada uno de los fragmentos seleccionados.

Destacar que el gel de electroforesis 2 no es resultado de los ensayos de estandarización de los protocolos de detección mediante IC-RT-PCR o RT-PCR. Este gel de electroforesis es el resultado de un ensayo inicial de IC-RT-PCR en el que se emplearon anticuerpo monoclonal anti-potyvirus (Agdia), y una pareja de cebadores degenerados para el grupo *Potyvirus*, denominados: M4-T (p3'): 5'- gtt ttc cca gtc acg ac (t₁₄)-3'; y Sprimer (p5'): 5'- ggx aay aay agy ggx caz cc -3'; donde X= a,g,c, ó t; y= T ó C, Z= a ó g (Chen, et al., 2002); y al que denominamos como cebador PVY deg.

<i>GEL DE ELECTROFORESIS</i>	<i>CEBADOR</i>	<i>FRAGMENTOS SELECCIONADOS</i>	<i>TAMAÑO FRAGMENTOS</i>
Gel 1	PVY (Tabla 10, Cap. IV)	4- PVY- esp	800 bp
Gel 2	PVY deg.(Chen <i>et al</i> , 2002)	1- Poty	450 bp
		2-Poty	1400 bp
		4-Poty	450 bp
		5-Poty	450 bp
Gel 3	PVS ₁ (Tabla 10, Cap. IV)	3-PVS-1	700 bp
	PVS ₂ (Tabla 10, Cap. IV)	12-PVS-2	400-600 bp
Gel 4	PVX (Tabla 10, Cap. IV)	5- Potex	560 bp

Tabla 15. Fragmentos seleccionados de cada uno de los geles de electroforesis referidos en el ANEXO IV. Se especifica además la pareja de cebadores empleada en cada caso y el tamaño aproximado de los fragmentos seleccionados.

V.3 METODOLOGÍA

Los fragmentos seleccionados, tal y como señalamos en el apartado de material, fueron clonados en el plásmido TOPO-TA en bacterias *E. Coli* según instrucciones del fabricante. Posteriormente las bacterias transformadas fueron seleccionadas.

Se realizó una extracción de ADN, el cual fue digerido con enzimas de restricción a fin de constatar si el tamaño del fragmento liberado se corresponde al del fragmento inicialmente amplificado. A continuación, el DNA fue secuenciado con la colaboración del servicio de secuenciación del Centro Internacional de Investigación Oncológica (CNIO, Madrid).

Destacar que los fragmentos seleccionados del gel 2 correspondientes a 2-Poty y 6-Poty para clonar, fueron extraídos del gel de electroforesis empleando el KIT: geneclean Turbo (Q-Biogene)

En la siguiente figura se representa de un modo gráfico los pasos seguidos en la metodología:

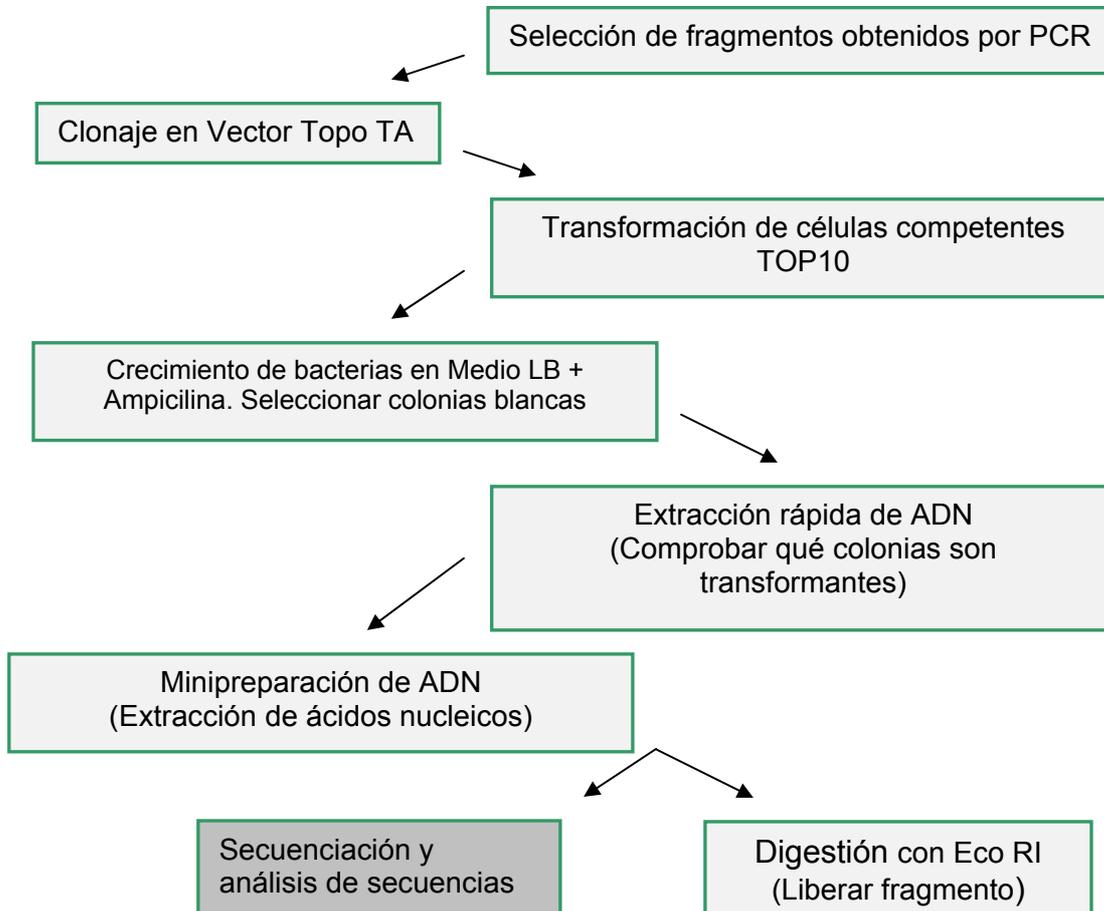


Fig. 55. Representación esquemática del proceso seguido para la clonación y secuenciación de los fragmentos seleccionados

➤ *Clonaje en vector TOPO TA y transformación de células competentes*

Para realizar el clonaje se siguieron las instrucciones del manual TOPO TA Cloning de Invitrogen Versión P 051302/25-0184. Las células competentes a transformar fueron las TOP 10, de Invitrogen catálogo K-4500-01 (ver ANEXO V).

➤ *Extracción rápida de DNA*

De las colonias crecidas tras la incubación durante toda la noche obtenemos colonias blancas y colonias azules, según sean o no

transformantes. Para comprobar qué colonias son portadoras de nuestro inserto se lleva a cabo una selección de las colonias, a las que por un método de lisis se les realiza una extracción de ácidos nucleicos. Tras correr en un gel de electroforesis en las colonias transformadas se observó una banda de mayor tamaño. Consideramos que las colonias de las que se han realizado esta extracción son transformantes y por tanto seleccionadas (Ver ANEXO VI). A continuación, se prepara medio LB (Luria-Bertani) (4 ml) con Ampicilina (8 µl), y las colonias seleccionadas son picadas y puestas a crecer en este nuevo medio en condición de agitación y a 37° C.

➤ *Minipreparación de DNA*

Para la extracción de ácidos nucleicos de las minicolonias seguimos el protocolo: QUIAprep Spin Miniperp Kit para microcentrífuga, del manual QUIAprep Miniprep Handbook de QUIAGEN. Este protocolo está diseñado para la purificación de 20 µg de DNA plasmídico con una elevada cantidad de copias a partir de 1-5 ml de medio de cultivo de *E. coli* en LB tras incubación durante toda la noche (Ver NEXO VII).

➤ *Digestión con ECO RI*

El plásmido empleado en este protocolo está diseñado para liberar el inserto tras la digestión con la enzima EcoR I, cuyos sitios de restricción flanquean al inserto clonado. Para llevar a cabo la digestión se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Mezcla de reacción 1x

3µl de tampón de enzima + 1µl enzima + 24 µl de agua destilada estéril
+ 2 µl de DNA.

Condiciones de reacción: 37°C por 2 horas.

Como señalamos anteriormente. Los fragmentos seleccionados fueron secuenciados en colaboración con Centro Internacional de Investigación Oncológica (CNIO, Madrid). Las secuencias obtenidas son las que aparecen en el anexo VIII. Para el análisis de secuencias se realizó un BLAST con la base de datos del NCBI.

V.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a.- Resultados minipreparación de DNA:

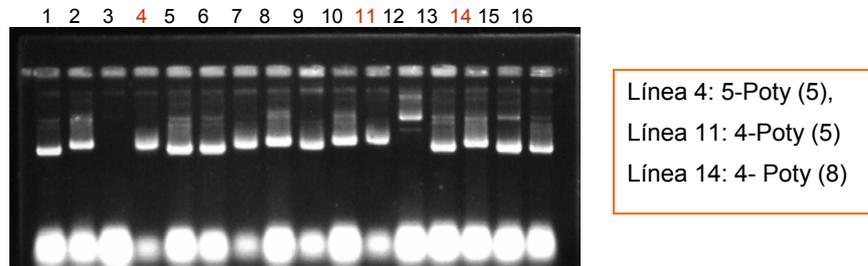


Fig. 56. Selección de colonias transformantes. En las líneas de los extremos se coloca el plásmido sin inserto y en las centrales las colonias evaluadas. Las líneas marcadas en rojo indican las colonias seleccionadas y potencialmente portadoras del inserto, y que quedan identificadas en el cuadro adjunto.

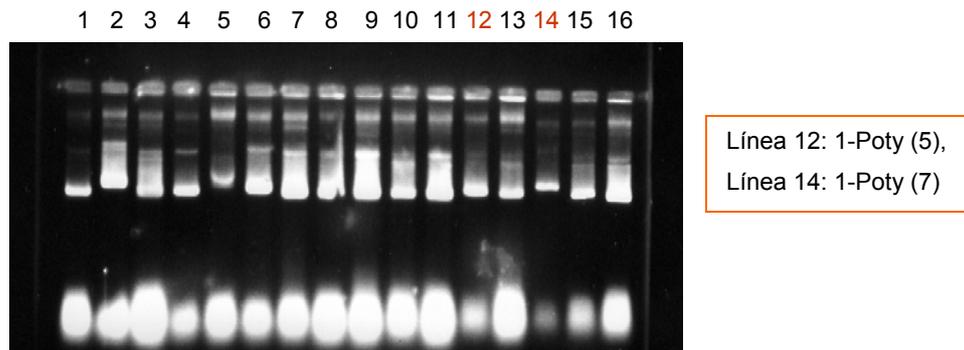


Fig. 57. Selección de colonias transformantes. En las líneas de los extremos se coloca el plásmido sin inserto y en las centrales las colonias evaluadas. Las líneas marcadas en rojo indican las colonias seleccionadas y potencialmente portadoras del inserto, y que quedan identificadas en el cuadro adjunto.

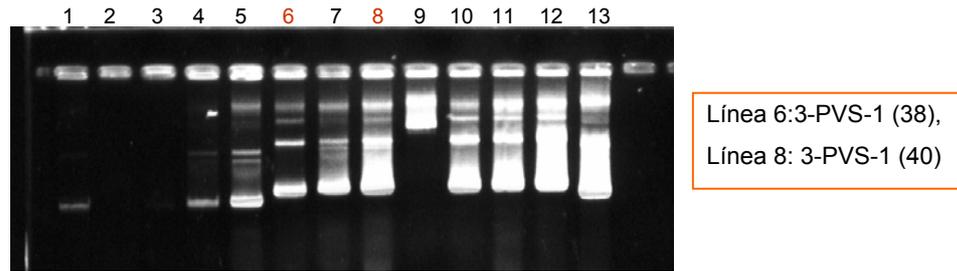


Fig. 58. Selección de colonias transformantes. En las líneas de los extremos se coloca el plásmido sin inserto y en las centrales las colonias evaluadas. Las líneas marcadas en rojo indican las colonias seleccionadas y potencialmente portadoras del inserto, y que quedan identificadas en el cuadro adjunto.

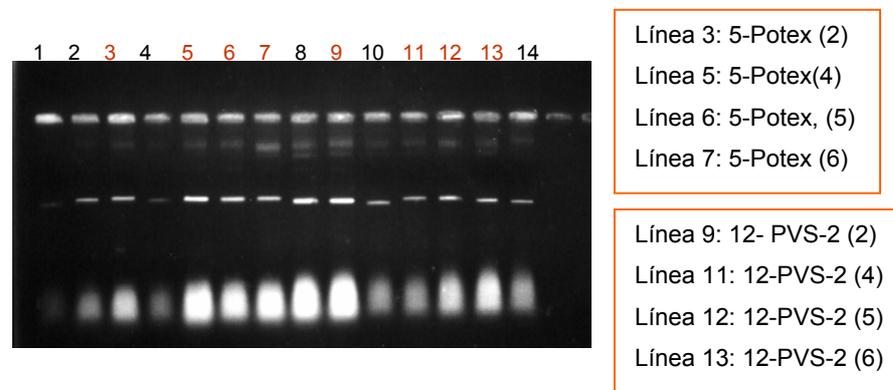


Fig. 59. Selección de colonias transformantes. En las líneas de los extremos se coloca el plásmido sin inserto y en las centrales las colonias evaluadas. Las líneas marcadas en rojo indican las colonias seleccionadas y potencialmente portadoras del inserto, y que quedan identificadas en el cuadro adjunto.

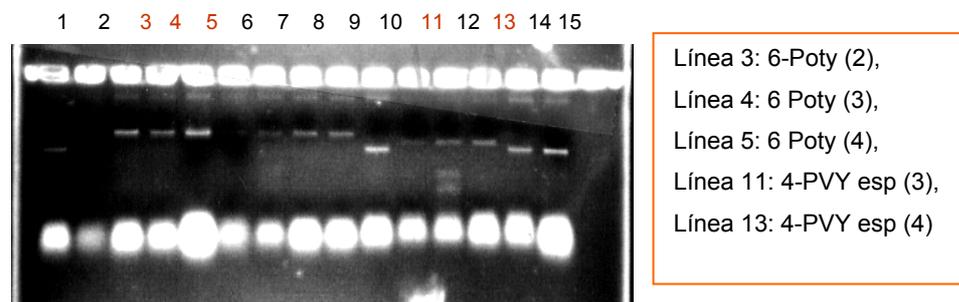


Fig. 60. Selección de colonias transformantes. En las líneas de los extremos se coloca el plásmido sin inserto y en las centrales las colonias evaluadas. Las líneas marcadas en rojo indican las colonias seleccionadas y potencialmente portadoras del inserto, y que quedan identificadas en el cuadro adjunto.

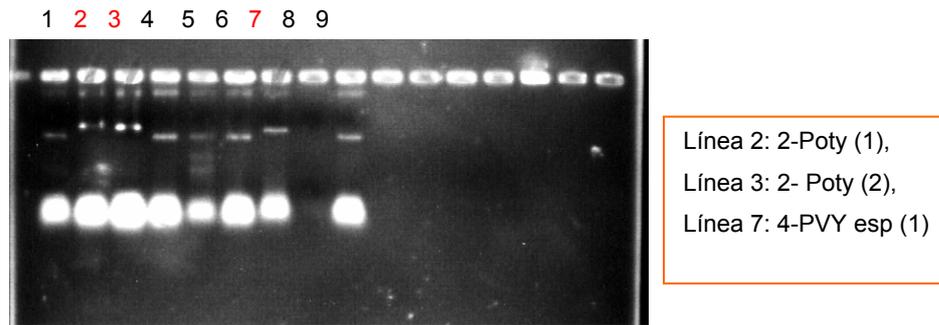


Fig. 61. Selección de colonias transformantes. En las líneas de los extremos se coloca el plásmido sin inserto y en las centrales las colonias evaluadas. Las líneas marcadas en rojo indican las colonias seleccionadas y potencialmente portadoras del inserto, y que quedan identificadas en el cuadro adjunto.

En la figura 56 a la 61 se muestran los resultados obtenidos tras la transformación de bacterias *E.Coli*. Recordemos que aquellas colonias que no portan el inserto desarrollan una coloración azul, mientras que aquellas que se muestran de color blanco, son las potencialmente portadoras del inserto. De estas colonias se realizó una extracción de ácidos y se evaluó electroforéticamente en un gel de agarosa la altura de la migración de los ácidos nucleicos. Observamos que aquellas colonias transformantes que potencialmente llevan el inserto quedan retrasadas en la migración respecto de aquellas que no lo portan. Los resultados mostrados en estas figuras reflejan un alto número de colonias transformadas, poniendo de manifiesto la eficiencia del protocolo empleado.

Las colonias transformantes seleccionadas son transferidas a un medio de crecimiento para aumentar de este modo la población.

b.- Resultados digestión con Eco RI

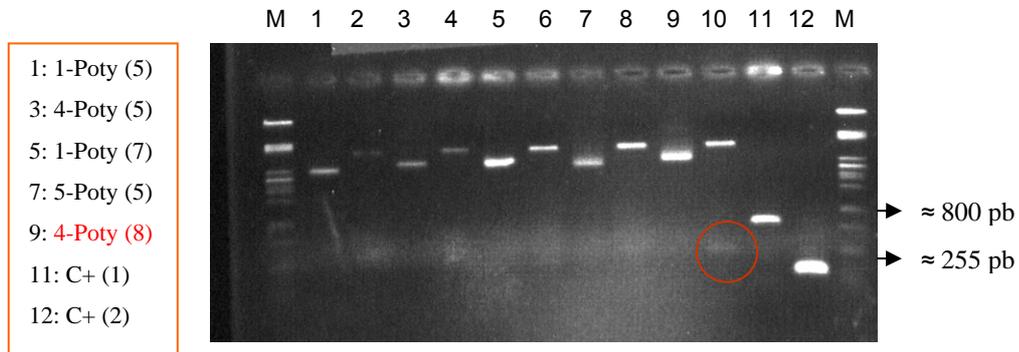


Fig. 62. Digestión con Eco RI de los clones seleccionados. Cada par de líneas lleva el clon sin digerir y el clon digerido con la enzima de restricción. En el cuadro adjunto se especifican los clones para cada par de líneas. C+ (1) Control de planta infectada con PVY; C+ (2) Control de planta infectada con PVA. M: Marcador λ PstI

Observamos que tras la digestión con Eco RI se obtienen dos tamaños de banda correspondientes al fragmento sin linearizar y al fragmento linearizado. Detectamos un fragmento correspondiente al clon 4-Poty (8) con un tamaño de banda comprendido entre los 800 y los 250 pb de los controles.

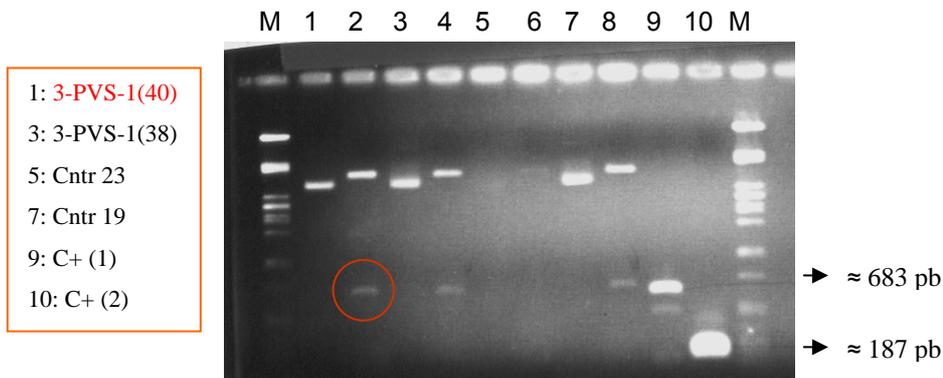


Fig. 63. Digestión con Eco RI de los clones seleccionados. Cada par de líneas lleva el clon sin digerir y el clon digerido con la enzima de restricción. En el cuadro adjunto se especifican los clones para cada par de líneas. C+ (1) Control de planta infectada con PVS y amplificada con los cebadores PVS1; C+ (2) Control de planta infectada con PVS y amplificada con los cebadores PVS2. M: Marcador λ PstI

En la fig. 63 se muestra el resultado de la digestión con Eco RI de los clones especificados en el cuadro adjunto. Observamos que tras el tratamiento con la enzima de restricción se obtienen dos tamaños de banda correspondientes al fragmento sin linearizar y al fragmento linearizado. Detectamos un fragmento correspondiente al clon 3-PVS-1 (40) con un tamaño de banda correspondiente a los 683 pb de uno de los controles

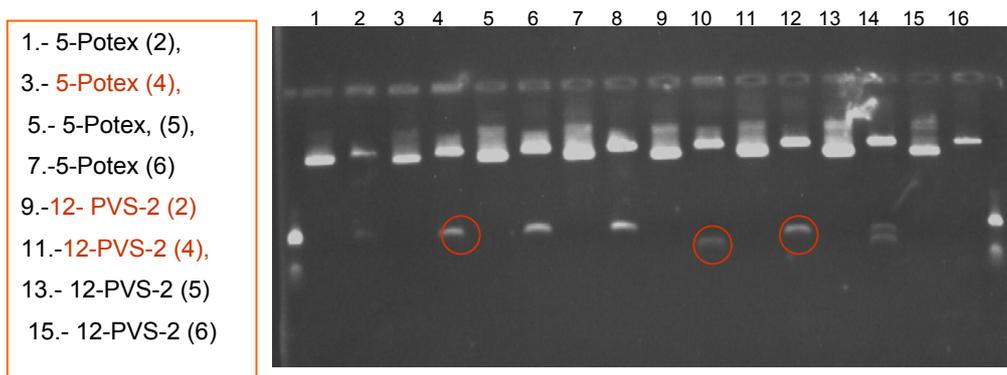


Fig. 64. Digestión con Eco RI de los clones seleccionados. Cada par de líneas lleva el clon sin digerir y el clon digerido con la enzima de restricción. En el cuadro adjunto se especifican los clones para cada par de líneas y de color rojo los seleccionados para secuenciar.

En la fig 64 se muestra el resultado de la digestión con Eco RI de los clones especificados en el cuadro adjunto. Observamos que los clones seleccionados tras ser liberado el inserto son: 5- Potex-4; 12-PVS- 2(2); 12-PVS-2 (4).

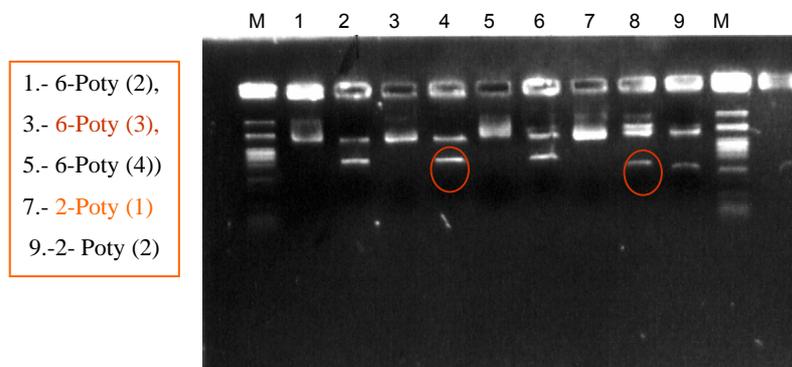


Fig. 65. Digestión con Eco RI de los clones seleccionados. Cada par de líneas lleva el clon sin digerir y el clon digerido con la enzima de restricción. En el cuadro adjunto se especifican los clones para cada par de líneas.

En la figura 65 se muestra el resultado de la digestión con Eco RI de los clones especificados en el cuadro adjunto. Observamos que los clones seleccionados tras ser liberado el inserto son: 6-Poty (3); 2-Poty (1).

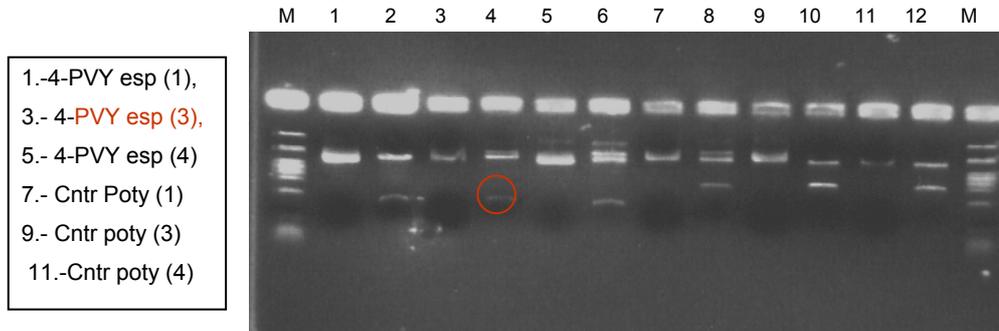


Fig. 66. Digestión con Eco RI de los clones seleccionados. Cada par de líneas lleva el clon sin digerir y el clon digerido con la enzima de restricción. En el cuadro adjunto se especifican los clones para cada par de líneas. M: Marcador λ PstI.

En la fig 66 se muestra el resultado de la digestión con Eco RI de los clones especificados en el cuadro adjunto. Observamos que el clon seleccionado tras ser liberado el inserto es 4-PVY esp 3.

A fin de poder realizar un adecuado seguimiento en la discusión de los resultados en el anexo IX se muestra un cuadro resumen con la identificación de los clones analizados, tras la selección de las colonias y realizar la digestión con ECO RI. Con estas secuencias se realizó un Blast en la base de datos del NCBI, así como una comparación a nivel de alfa-aminoácidos. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 16

Observamos en la tabla de resultados un secuencia parcial de 441 nt correspondiente al clon 12-pvs-2(4), que solapa con parte de la secuencia codificante de la cápside proteica (CP) de *Carlavirus*. Así mismo solapa en 310 nt con la secuencia parcial del clon 12-pvs-2(2). Ambos clones fueron amplificados con la misma pareja de cebadores PVS₂ diseñado a partir de la cápside proteica de la Ac. #Y15613 (Mataušek *et al.*, 2000) Los análisis de secuencia de nucleótidos revelan la identidad con *Carlavirus*, sin embargo el análisis de secuencia de aminoácidos muestra tan solo un 79% de identidad

con PVS. Estos análisis nos lleva a considerar que la secuencia del clon amplificado no se corresponda con la del virus PVS tal y como se esperaba y que podría tratarse de otro *Carlavirus*. O bien, podríamos plantearnos, según la hipótesis propuesta en el capítulo anterior, que la variabilidad y adaptación conjunta que puede haberse producido en el proceso de aclimatación de estas variedades, podría llevarnos a estar ante una nueva variante de PVS (García-Arenal et al; 2001).

Respecto al clon 3-pvs-1(40) obtenemos una secuencia de 686 nt que se corresponde con la secuencia de la cápside proteica de las Ac. #Y15613 (Mataušek *et al*; 2000). El análisis de la secuencia de aminoácidos nos revela homología con la secuencia parcial de la cápside proteica de los *Carlavirus* y nos arroja un 98% de identidad en aminoácidos con PVS Ac. #D00461.

El clon 4-PVY-esp (3) muestra un tamaño de secuencia de 878 nt. Recordemos que este clon fue amplificado con la pareja de cebadores empleada por Blanco-Urgoite y colaboradores (1996) y que representa la cápside proteica. La secuencia de nucleótidos amplificada se encuentra incluida en la secuencia de 1802 nt del clon 6-poty (3). El análisis de secuencia de aminoácidos revela la identificación inequívoca de PVY raza N.

Para los clones 4-Poty(5) y 4-Poty(8) obtenemos 448 nt y 446 nt respectivamente. Ambos clones fueron amplificados con los cebadores diseñados por Chen y colaboradores (2001) para la detección de Potyvirus denominados M4T y Sprimer. El análisis de secuencia de aminoácidos revela que se trata de la secuencia parcial de ORF6 de *Carlavirus*, mostrando un 79% de identidad en aminoácidos con PVS, sin embargo no se identifica el virus y podría tratarse de otro *Carlavirus*.

Con la misma pareja de cebadores obtenemos los clones 2-poty(1) y 6-poty(3). El primero de ellos consta de 1352 nt, entre los que se encuentra un marco abierto de lectura de 393 nt. El análisis de secuencia de aminoácidos indica homología con la cápside proteica de Nepovirus, arrojando un 28% de identidad. Por su parte, la secuencia de 1802 nt del clon 6-poty muestra un fragmento solapante con el clon 4-poty esp y se identifica igualmente en la secuencia de aminoácidos con PVY raza N

Por último, y respecto al clon 5-Potex, tenemos una secuencia de 563 nt que se corresponde con la secuencia nucleotídica codificante de la cápside proteica (Skryabui *et al.*, 1988). El análisis de secuencia de aminoácidos reveló que nos encontramos en un 100% de identidad ante PVX. La identificación a nivel de raza se logró mediante la comparación de la secuencia obtenida en un banco de datos con todas las secuencias existentes, además se realizaron patrones de restricción virtuales utilizando la aplicación informática MacVector 8.02.

Los resultados obtenidos tras estos análisis de secuencias nos revelan la identidad de PVX y PVY raza N. Sin embargo, observamos que con la pareja de cebadores de Chen y colaboradores (2002) para la identificación de *Potyvirus*, identificamos clones relacionados con *Carlavirus* (4-Poty). Sin embargo con la misma pareja de cebadores identificamos un clon con un 28 % de homología con *Nepovirus* (2-Poty(1)) y un clon (6-poty(3)) que se identifica con *Potyvirus*, en concreto con PVY raza N, poniéndose así de manifiesto la variabilidad en las especies virales presentes en estas variedades antiguas de papa y sugiriendo la necesidad de realizar estudios de caracterización en profundidad, que permitan identificar de un modo claro y certero las especies virales presentes en las variedades de papa antiguas de Tenerife. Este tipo de estudios además permitiría establecer de un modo claro relaciones entre patógenos y sus hospedantes, además de poder correlacionar la sintomatología observada en campo con la presencia de determinados agentes virales.

<i>NOMBRE CLON</i>	<i>DATOS DE SECUENCIA</i>	<i>CONCLUSIONES</i>
12-pvs2(4) 12-pvs2 (2)	441 nt de CP de <i>Carlavirus</i> solapa con 310 nt de 12-pvs2-2	Secuencia parcial de CP de <i>Carlavirus</i> , 79% idéntico a PVS en aa, no se identifica el virus. Podría ser otro <i>Carlavirus</i>
3-pvs-1	686 nt	Sec parcial de CP de <i>Carlavirus</i> , 98% idéntico en aa a PVS D00461
4-poty(5) 4-poty(8)	448 nt 446 nt	Sec parcial de ORF6 de <i>Carlavirus</i> , 79% idéntico a PVS en aa, No se identifica el virus, podría ser otro <i>Carlavirus</i> .
2-poty(1)	1352 nt, con ORF de 393 nt	Blast indica homología de sec de aa con CP de <i>Nepovirus</i> , 28% identidades en blast
6-poty(3)	Secuencia fto. de 1802 bp solapante con Poty-esp3	Identificación inequívoca de PVY, raza N
4-PVY-esp(3)	Secuencia con cebadores rest PVY, incluida en 6-poty(3)	Identificación inequívoca de PVY, raza N
5-potex (4)	563 nt	Es PVX en un 100%

Tabla 16. Resumen de los resultados obtenidos tras realizar los análisis de secuencias de los clones seleccionados

CAPÍTULO VI

TERMOTERAPIA Y CULTIVO DE MERISTEMOS

VI. TERMOTERAPIA Y CULTIVO DE MERISTEMOS

VI.1. LA TERMOTERAPIA. GENERALIDADES.

Los tratamientos de termoterapia han demostrado ser muy útiles en la eliminación de virus vegetales. Durante el proceso, las plantas son sometidas a temperaturas en torno a los 35-40° C (Dodds *et al.*, 1990). Los trabajos llevados a cabo con diferentes especies vegetales portadoras de virus han demostrado que el tratamiento con termoterapia da lugar a una reducción en la concentración de partículas vírica (Kassanis, 1957; Quak, 1977). Como es lógico, este procedimiento ha sido empleado en papa para eliminar los virus que afectan a este cultivo (Lizárraga *et al.*, 1991).

Existen diferentes hipótesis para explicar las bondades de la termoterapia. Una de ellas apunta a que la disminución de la concentración vírica se debe principalmente al efecto negativo de las altas temperaturas en los procesos de multiplicación del virus, pues se crean competencia por los sitios de síntesis de ácidos nucleicos y enzimas entre las proteínas víricas y la propia célula infectada, siendo los de esta última los que se ven favorecidos (Espinoza *et al.*, 1992). Otra de las explicaciones es que, a elevadas temperaturas la unión de las subunidades peptídicas de las proteínas responsables de proteger el ácido nucleico vírico no se produce y por tanto, se generan fisuras o huecos que facilitan el acceso de las nucleasas del huésped y en consecuencia, la inactivación del virus y una paulatina disminución en la concentración de partículas víricas e incluso su eliminación (Espinoza *et al.*, 1992). Una tercera hipótesis argumentaría una combinación de ambas hipótesis.

La termoterapia aplicada a temperaturas de aproximadamente unos 37° C es efectiva para la erradicación de un gran número de virus, sin embargo, por ejemplo en papa, no elimina el viroide PSTVd (Salazar *et al.*, 1985). Éste es un viroide de ARN con una estructura de cadena sencilla muy enrollado que dificulta el acceso a las nucleasas. Por el contrario, la multiplicación de este viroide en los tejidos vegetales es favorecida por las elevadas temperaturas (Sanger y Ramm, 1975). Sin embargo, a bajas temperaturas se produce una reducción en la concentración del viroide (Lizárraga *et al.*, 1980). En un

experimento llevado a cabo con diferentes variedades de papas sometidas a 8° C durante 4 meses y tras escindirles el domo apical, se observó que aproximadamente un 30% de las plantas regeneradas estaban libres de PSTVd (Lizárraga *et al.*, 1982).

En concreto, y en lo que a la papa se refiere, la termoterapia aplicada a la planta entera, así como a tubérculos brotados, seguido del cultivo de meristemas, ha sido empleada con éxito como proceso estándar en la erradicación de muchos virus de papa (Stayce-Smith y Mellor, 1970; Pennazio y Redolfi, 1973). El procedimiento más ampliamente empleado y con el que se han obtenido los mejores resultados ha sido someter a plantas decapitadas a los rangos de temperaturas de 36° C/16 h y 30° C/8 h bajo luz continua de 5000 lux y durante cuatro semanas. Este tratamiento puede ser también aplicado a vitroplántulas, en este caso segmentos uninodales son cultivados en un medio de crecimiento y tras 7-10 días en condiciones normales de crecimiento son sometidos a los rangos de temperatura antes mencionados (Espinoza *et al.*, 1992).

Como alternativa a la termoterapia está el empleo de sustancias con actividad antivírica, o quimioterapia. Sólo unos pocos compuestos con propiedades antivirales han sido descubiertos. Para su empleo es necesario conocer primero el virus que tiene la planta a fin de aplicar la dosis adecuada y en segundo lugar, evaluar la tolerancia de las plantas tratadas a estos compuestos. Los compuestos más usados son: Virazole (también denominado ribavirina) y vidarabina (PieriK, 1990; George, 1993).

En papa se ha empleado el análogo de un nucleósido, virazole, conocido por su amplio espectro frente a virus del tipo ADN como ARN, sin embargo, ha mostrado resultados variables cuando se aplica a plantas de papa por aspersión o mediante cultivo hidropónico seguido del cultivo de meristemas. La adición de 100 mg/l de virazole al medio de cultivo ha dado lugar a la erradicación de PVS, PVX y PVY; pero no de PLRV (Griffths, 1990).

Aunque los problemas de variabilidad genética de plantas tratadas con un antiviral no han sido documentados, la tendencia es a no ser empleados salvo excepciones o en ensayos de laboratorio.

VI.2 EL CULTIVO DE MERISTEMOS. GENERALIDADES.

Si bien el empleo de elevadas temperaturas ha demostrado ser un procedimiento que permite en cierta medida la eliminación de virus de muchas especies, sólo llega a ser muy eficiente para desarrollar plantas libres de virus cuando se emplea en combinación con el cultivo de meristemos (PieriK, 1990).

El meristemo es el punto de crecimiento activo en los brotes. Está compuesto por un conjunto de células que se caracterizan por su estado de división activa, están rodeados por primordios foliares que no han establecido contacto con los haces vasculares de la planta. Esta situación dificulta el acceso de las partículas víricas a las células meristemáticas (PieriK, 1990).

La eliminación de virus por escisión y cultivo de meristemos en medios artificiales es un método relativamente antiguo. Fue aplicado por primera vez para la erradicación de virus por Morel y Martin (1952) para obtener dalias libres de virus a partir de meristemos de plantas infectadas. Estos mismos investigadores lograron obtener plantas libres de virus a partir de cultivo de meristemos de seis variedades de papa (Morel y Martin, 1955). Estos trabajos permitieron el desarrollo del cultivo de meristemos y su aplicación a la obtención de plantas libres de virus (Kassanis, 1957), especialmente en plantas con un elevado valor comercial, ejemplo de ello son los trabajos de Morel (1960, 1965) para la obtención de plantas del género *Cymbidium* (orquídeas) libre de virus.

La técnica de cultivo de meristemos aplicada a la obtención de plantas libres de virus está basada en la particularidad de que no todas las células de una planta enferma están infectadas con virus. Los tejidos meristemáticos de brotes y ápices de una planta infectada suelen estar libres de virus (Walkey *et al.*, 1977; Lizárraga *et al.*, 1991; Faccioli y Colombanni, 1996). La razón para este hecho no está del todo clara, si bien varias hipótesis se proponen para justificar este hecho. Entre ellas encontramos que la invasión viral en los tejidos meristemáticos puede estar limitada por la distancia celular, dada la ausencia de haces vasculares en esta zona la diseminación de los virus se puede ver limitada, especialmente para aquellos virus restringidos al floema como el PLRV (Mathews, 1991). Se ha propuesto también la existencia de

algún mecanismo de silenciamiento del RNA viral generado en las células meristemáticas (Van Kammen, 1997; Baulcome, 1999). Otra de las hipótesis sugeridas considera que al estar la multiplicación de los virus supeditada a la actividad metabólica de la planta hospedadora y si tenemos en consideración la alta actividad y especificidad metabólica de las células meristemáticas, se podría explicar por qué los virus son incapaces de tomar el control de la maquinaria biosintética del hospedador. Esto sería consistente con los trabajos que sugieren que la alta concentración de auxinas presente en los tejidos meristemáticos inhibe la multiplicación de los virus al favorecer la de la planta (Espinoza *et al.*, 1992).

La técnica de cultivo de meristemas es laboriosa y requiere precisión, por lo que es preciso realizar un periodo de adiestramiento a fin de optimizar tanto el delicado proceso de escisión del tejido meristemático, como la formulación de un medio de cultivo adecuado para cada especie. El tamaño de los explantos aislados es muy pequeño, en torno a 0,1-0,2 mm de diámetro y 0,1-0,5 mm de altura, y siendo necesario el uso de microscopio estereoscópico. Se recomienda dejar uno o dos primordios foliares en el explanto, pues de esta manera se aumenta las posibilidades de supervivencia de los meristemas en cultivo (Conci y Nome, 1991; Pérez Francés, 2004). Tras el aislamiento del meristemo en condiciones asépticas, es posible su desarrollo en un medio de cultivo artificial pudiendo llegar a obtenerse plantas enteras.

El desarrollo de un meristemo *in vitro* es similar al desarrollo natural de la planta. Las células meristemáticas se dividen y la diferenciación de los tejidos tiene lugar siempre que el medio artificial aporte los nutrientes necesarios para que tenga lugar el desarrollo (Espinoza *et al.*, 1992).

VI.3 MATERIAL

Se parte de vitroplántulas establecidas y desarrolladas *in vitro*. Segmentos uninodales de las mismas son sembrados sobre un medio de establecimiento y mantenidos en la cámara de crecimiento por 10 días.

Transcurrido este tiempo son transferidas a la cámara de termoterapia donde permanecen un mes.

Tras el tratamiento de termoterapia, los meristemas apicales y axilares son aislados con la ayuda de un microscopio binocular y son sembrados en el medio. Una vez iniciado el desarrollo de nuevas plántulas a partir de estos meristemas son transferidas a un medio de crecimiento.

VI.4 METODOLOGÍA

A fin de determinar el rango de temperaturas para un tratamiento efectivo en nuestras variedades, se realizó un ensayo previo donde se evaluó la resistencia y viabilidad de los explantos una vez sometidos a dos rangos de temperatura diferentes. Para ello, 24 explantos uninodales de cada una de las variedades fueron sometidos a 34° C/16 h y 32° C/8 h durante cuatro semanas. Este rango de temperatura es el que se emplea generalmente en la bibliografía consultada sobre protocolos de saneamiento en papa. Por otro lado, y atendiendo a la fuerte carga vírica de nuestro material, diseñamos un segundo régimen de temperatura más agresivo, para ello consultamos bibliografía referente a tratamientos empleados en el saneamiento de otras especies, el protocolo propuesto fue de 34° C /16 h y 38° C/8 h que es el rango de temperatura que se emplea normalmente en el protocolo de saneamiento de las variedades de *I. batata* L. (Lizárraga *et al.*, 1992).

Se evaluó el porcentaje de supervivencia observado en las variedades en estudio bajo el efecto de las altas temperaturas, transcurridos 30 días de tratamiento.

Una vez quedó establecido que el rango de temperatura con el que se obtiene un mayor porcentaje de supervivencia para nuestro material es el de 34° C/16 h; 32° C/8 h, se vuelve a repetir la experiencia. En este caso, un total de 48 explantos por entrada son sometidos al tratamiento de termoterapia. Se evaluó el porcentaje de desarrollo, al que denominamos como % D, referido a los explantos que se desarrollan bajo estas condiciones, el porcentaje de explantos no desarrollados por efecto de las temperaturas, denominado como % NoD y el porcentaje de explantos contaminados (% C).

Para realizar la siembra de meristemos, las yemas axilares y apicales de las plántulas tratadas con termoterapia fueron aisladas. Entorno a unos 100 meristemos, entre apicales y axilares, se aislaron por entrada y posteriormente transferidos al medio de desarrollo.

Tanto meristemos apicales como axilares se diseccionan con la ayuda de un microscopio binocular, los foliolos que rodean al punto de crecimiento se van desprendiendo con la ayuda de un bisturí hasta que sólo quede el ápice con algunos primordios foliares (normalmente no más de 2). Entonces el ápice es escindido, con uno o dos primordios foliares y transferido a un medio de cultivo, el cuál, en nuestro caso, se compone de las sales MS (Murashige and Skoog, 1962), enriquecido con 2,5 % de sacarosa, 0,1 mg/l de Ácido giberélico, 0,04 mg/l de Kinetina y gelificado con 0,6 % de agar (Espinoza *et al.*, 1992).

Transcurrido aproximadamente un mes de cultivo, los meristemos ya mostraban un ligero desarrollo y entonces fueron transferidos a un medio MS idéntico al empleado durante la fase de establecimiento (Capítulo III, Apto. III.1.2.3.). Durante el tiempo que duró el desarrollo de los meristemos se evaluó el porcentaje de meristemos desarrollados (% D), el porcentaje de meristemos no desarrollados (% NoD) y el porcentaje de contaminación en el cultivo (% C).

Una vez las plántulas alcanzan aproximadamente unos 5 cm de longitud, éstas son sometidas a un protocolo de micropropagación *in vitro*, de modo que a partir de cada plántula desarrollada de un meristemo, con entorno a 4 a 5 nudos por plántula, obtengamos tres explantos. Uno de ellos se destinó, una vez se desarrolló como vitroplántula, para los análisis serológicos (Test DAS-ELISA), y los otros fueron empleados en un protocolo de micropropagación para su conservación *in vitro*.

VI. 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.5.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL TRATAMIENTO DE TERMOTERAPIA

Respecto a los resultados obtenidos en los ensayos previos de termoterapia observamos que la var. Tormenta no sobrevivió a los rangos de temperatura máximos, en cambio un 60 % de supervivencia se obtuvo en aquellos explantos sometido a 34° C/16 h y 32° C/8 h. Las variedades Mora y Borralla tuvieron un comportamiento similar. Aproximadamente el 50 % de las plántulas sometidas al tratamiento con temperaturas más elevadas (34° C /16 h y 38° C/8 h) no mostraron crecimiento, y aquellas que se desarrollaron dieron lugar a plántulas muy endebles, con tallos muy finos y con síntomas de necrosamiento. En cambio, las sometidas a 34° C/16 h y 32° C/8 h observamos más de un 80 % de supervivencia en las dos variedades.

Estos resultados nos llevaron a considerar el rango de temperaturas de 34° C/16 h y 32° C/8 h como tratamiento adecuado para ensayar en un protocolo de saneamiento en las variedades en estudio, en lugar del alto porcentaje de supervivencia observado en las mismas.

Sin embargo, la eficacia de este tratamiento de termoterapia se puso a prueba, tal y como señalamos en el Apartado Método (VI.4), cuando tras su segunda aplicación se evaluaron las siguientes variables: el porcentaje de desarrollo (% D), referido a los explantos que se desarrollan de modo adecuado bajo estas condiciones, el porcentaje de explantos no desarrollados (% NoD) y el porcentaje de explantos que mostraron algún signo de contaminación (% C).

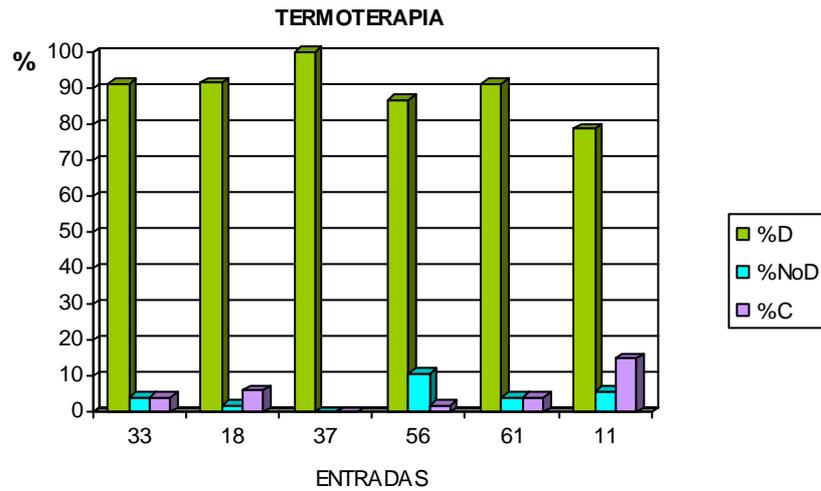


Fig. 67. Representación gráfica de los valores medios obtenidos para las variables: porcentaje de desarrollo (%D), porcentaje de explantos no desarrollados y porcentaje de explantos contaminados (%C) durante el tratamiento de Termoterapia ($34^{\circ}\text{C}/16\text{ h}$ y $32^{\circ}\text{C}/8\text{ h}$) transcurridos 30 días.

Como podemos observar, para todas las entradas analizadas el porcentaje de explantos desarrollados bajo estas condiciones ($34^{\circ}\text{C}/16\text{ h}$ y $32^{\circ}\text{C}/8\text{ h}$), estuvo por encima de un 80 %, salvo para la entrada 11 (var. Torrenta) que fue de un 78 %. Los máximos valores de esta variable los mostró las plántulas de la entrada 37 (var. Mora) con un 100 % de plántulas desarrolladas en las citadas condiciones (Fig. 67).

Destacamos que el porcentaje de explantos no desarrollados siempre estuvo por debajo de un 10 % para todas las entradas analizadas (Fig. 67), siendo la entrada 56 (var. Mora) la que presentó los valores más altos entre ellas (10,86 %).

Respecto a la variable porcentaje de contaminación del cultivo (Fig. 67), también observamos valores por debajo del 10 % para todas las entradas, salvo para la entrada 11 (var. Torrenta) en la que el porcentaje de contaminados fue del 15,15 %. Por este motivo, consideramos que para esta variedad, los valores de explantos desarrollados están algo desdibujados y por tanto han de tomarse con cautela.

Podemos considerar que las variedades en estudio se muestran tolerantes a los rangos de temperaturas a los que se han visto sometidos, pues

para todas las entradas los porcentajes de explantos desarrollados estuvieron por encima del 75 %, sin diferencias destacables en el comportamiento entre ellas, si bien podemos resaltar la entrada 37 con respecto al resto, pues fue la que mostró un 100 % de explantos desarrollados.

VI.5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL CULTIVO DE MERISTEMOS Y ANÁLISIS DAS-ELISA

A lo largo de los aproximadamente 60 días que transcurren desde el inicio del cultivo de meristemo hasta que se forma una plántula se evaluó el porcentaje de meristemos desarrollados (% D), el porcentaje de meristemos no desarrollados (% NoD) y el porcentaje de cultivos contaminados (% C). En la siguiente gráfica (Fig. 68) se muestran los resultados obtenidos para estas variables en cada una de las entradas.

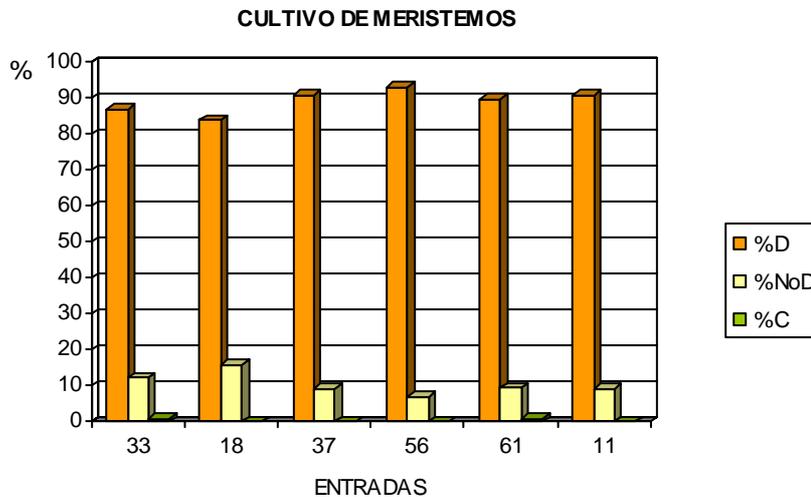


Fig. 68. Representación gráfica de las variables: porcentaje de desarrollo (%D), porcentaje de explantos no desarrollados (%NoD) y porcentaje de explantos contaminados (%C) durante el Cultivo de Meristemos para todas las entradas en estudio

Los resultados de la figura 68 muestran unos valores porcentajes de explantos desarrollados siempre por encima del 80 % para todas las entradas, presentándose el valor más alto para la entrada 56 (var. Mora) con un 93,06 %

de meristemos desarrollados, mientras que el valor más bajo lo mostró la entrada 18 (var. Borralla) con un 83,9 %. Recordemos que el tamaño de los explantos aislados es muy pequeño y que al dejar uno o dos primordios foliares para aumentar las posibilidades de supervivencia de los meristemos en cultivo, puede estar relacionado con los elevados porcentajes de explantos desarrollados durante el ensayo (Conci y Nome, 1991; Pérez Francés, 2004).

Respecto al porcentaje de explantos no desarrollados (Fig. 68), éste fue de entorno a un 10 % para las entradas 11, 61 (var. Torrenta) y 37 (var. Mora), mientras que las entradas 33 y 18 (var. Borralla) mostraron valores algo superior, siendo esta última la que presentó el valor más altos (16,03 %).

Por otro lado, los porcentajes de contaminación fueron nulos para las entradas 37, 56 (var. Mora) y 18 (var. Borralla) y tan solo de un 0,8 % para las entradas 33 (var. Borralla) y 61 (var. Torrenta).

Estos resultados ponen de manifiesto por un lado, que el medio de cultivo seleccionado para el desarrollo de meristemos en las variedades en estudio parece ser adecuado, pues el porcentaje de eficiencia en el desarrollo de explantos sobre este medio de cultivo es siempre superior al 80% (Fig. 68), observándose al final del proceso plántulas enraizadas y con hasta 3 yemas por brote (Fig.69). Por otro lado, el porcentaje de cultivos contaminados es reflejo de la asepsia que se tiene durante el proceso de aislamiento y siembra del meristemo con lo que podemos considerar también como eficiente el procedimiento y manejo de la técnica de aislamiento.

Así, tras el aislamiento del meristemo y su siembra en el medio de cultivo seleccionado, tiene lugar el desarrollo de los mismos a las dos semanas de cultivo (Fig. 69), observándose los primeros foliolos. La transferencia de los meristemos inicialmente desarrollados y en este estadio al medio de cultivo empleado durante la fase de establecimiento da lugar el desarrollo normal de las plántulas, obteniéndose tras seis semanas de cultivos vitroplántulas enraizadas y con hasta tres nudos por plántula.

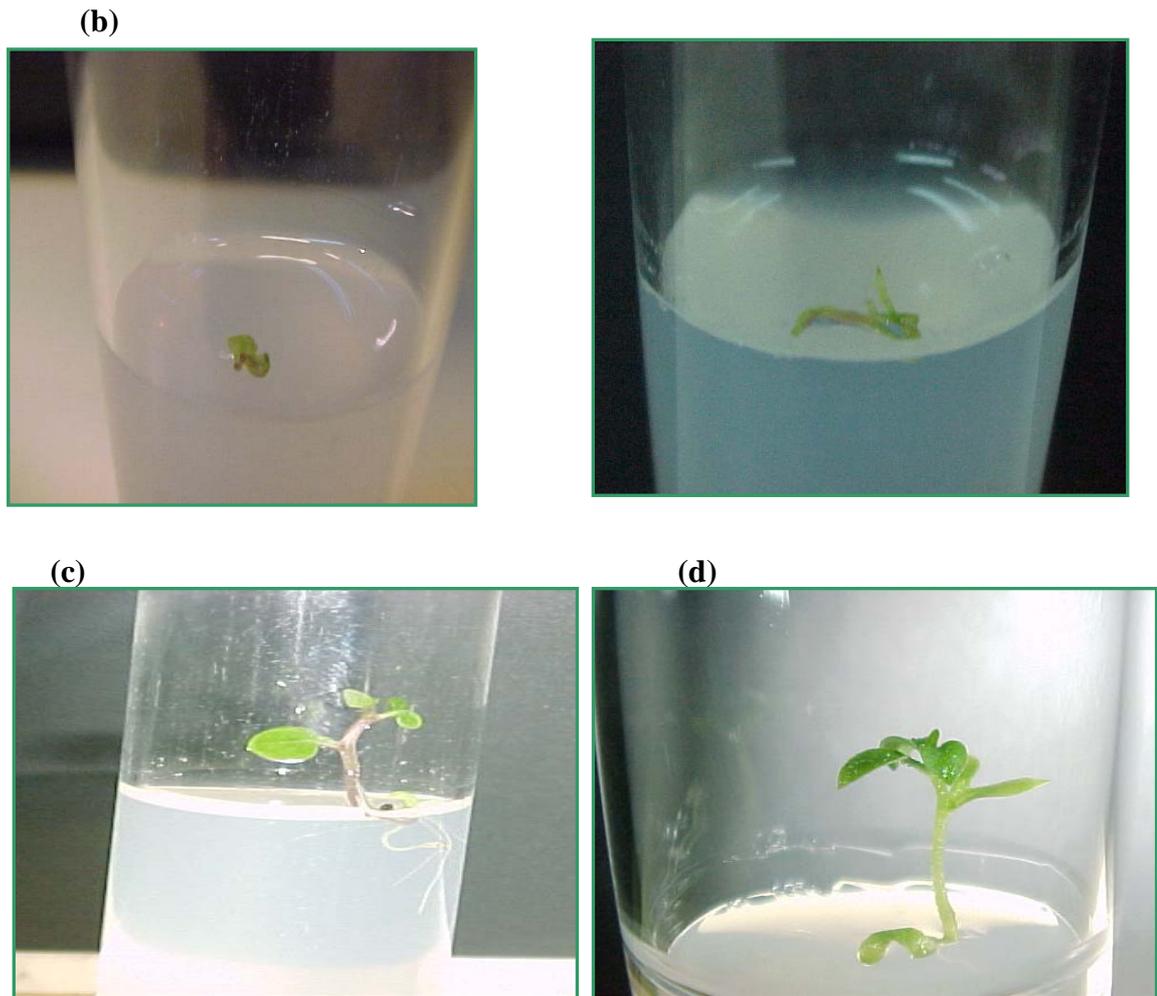


Fig. 69. Distintas fases en el desarrollo de un meristemo a plántula de la variedad Borralla. Transcurridas dos y tres semanas de cultivo respectivamente (a y b). Transcurridos 6 semanas de cultivo (c y d).

Una vez las plántulas se desarrollaron *in vitro*, se obtuvieron tres réplicas, tal y como señalamos en el Apartado de Metodología. Una de ellas fue empleada en los análisis serológicos para determinar la eficiencia en la erradicación de virus de la acción combinada de las técnicas de termoterapia y cultivo de meristemos.

Las vitroplantulas fueron analizadas mediante DAS-ELISA. Tras la lectura en el espectrofotómetro de la absorbancia a 405 nm se determinó los porcentajes de plantas sanas (% S) y los porcentajes de plantas con virus (% C) (Fig. 70), así como el porcentaje de incidencia de los virus que aparecían en aquellas plántulas que no resultaron saneadas (Fig. 71, 72, 73).

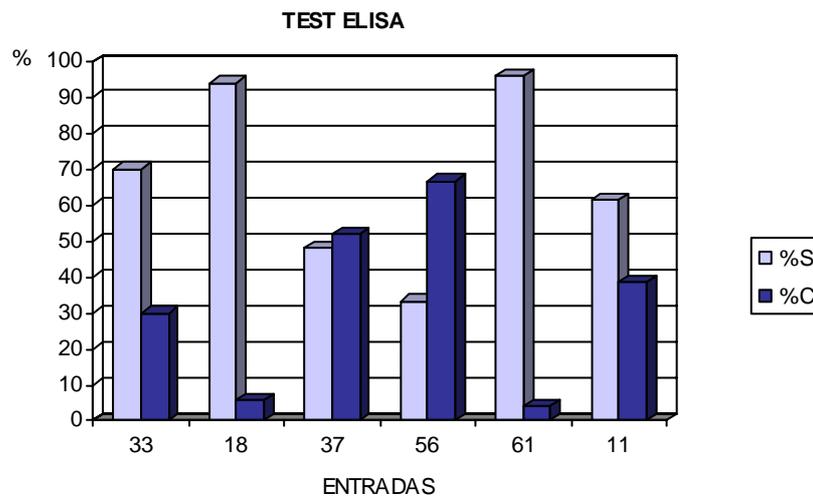


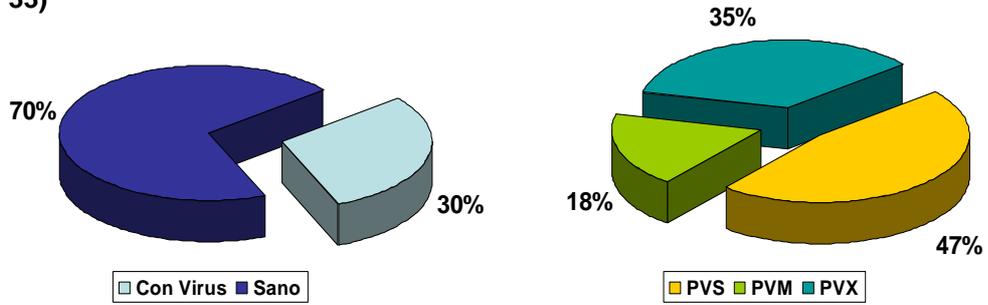
Fig. 70. Representación gráfica de las variables: porcentajes de plantas sanas (%S) y porcentajes de plantas con virus (%C), tras la aplicar termoterapia y cultivo de meristemos a las entradas de cada una de las variedades en estudio.

De los resultados obtenidos se refleja que los valores más altos de porcentaje de plantas sanas los encontramos en las entradas 18 (var. Borralla) y 61 (var. Torrenta), con un 94,1 % y 96 % respectivamente; seguidos por las entradas 33 (var. Borralla) y 11 (var. Torrenta) con un 70 % y 61,53 % respectivamente. Sin embargo, los porcentajes de plantas sanas más bajos los muestran las dos entradas (37 y 56) de la variedad Mora, con un 48 % y 33,3 % respectivamente (Fig. 70).

Estas diferencias en el comportamiento de las variedades las podemos relacionar con la carga vírica presente inicialmente en las mismas. Si retomamos los resultados de los análisis serológicos realizados inicialmente, observamos que la var. Torrenta se mostraba con un menor número de especies virales, junto con la variedad Borralla, sin embargo, la var. Mora mostraba mayor cantidad de especies virales, estando afectada en un 100 % de las muestras analizadas con PVX, PVS y PVA. Este hecho nos llevaría a plantearnos la necesidad de realizar una repetición del tratamiento en aquellas variedades con una alta carga vírica. Pues con los resultados que se reflejan en la figura 70, observamos que un tratamiento combinado de

termoterapia y cultivo de meristemos en variedades con una carga viral fuerte no parece ser eficiente.

**Var. Borralla
(Ent. 33)**



**Var. Borralla
(Ent. 18)**

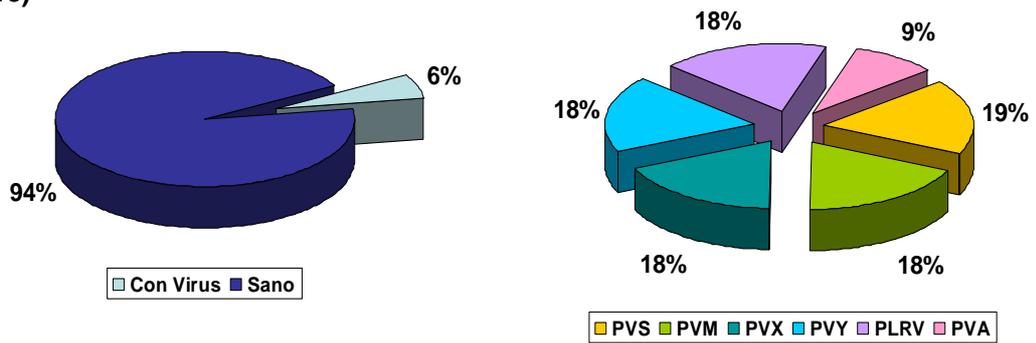
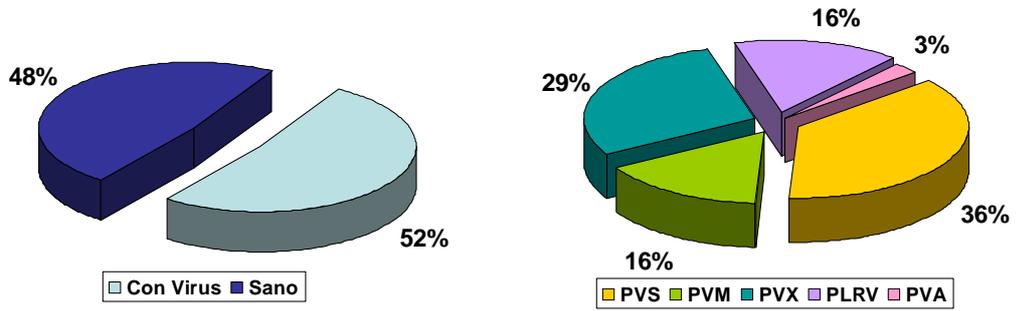


Fig. 71. Representación gráfica de la incidencia de virus en plantas no saneadas por entrada de la var. Borralla

Var. Mora
(Ent. 37)



Var. Mora
(Ent. 56)

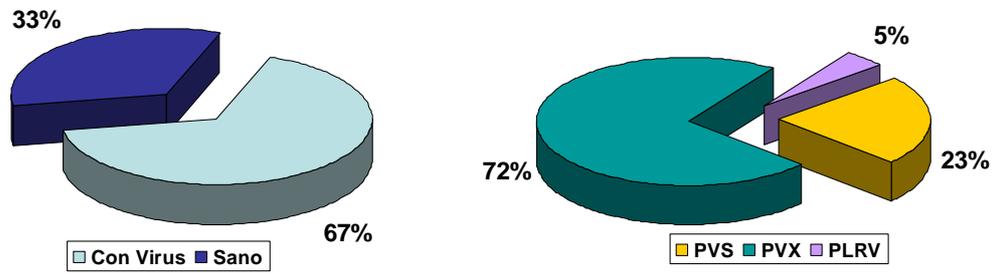
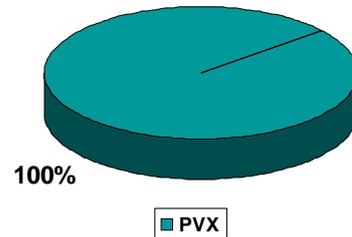
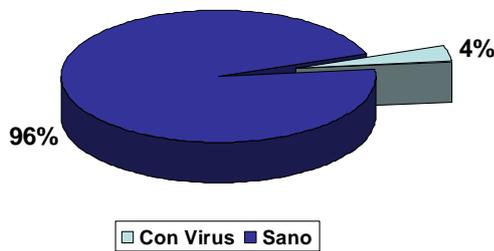


Fig. 72. Representación gráfica de la incidencia de virus en plantas no saneadas por entrada de la var. Mora.

**Var. Tormenta
(Ent. 61)**



**Var. Tormenta
(Ent. 11)**

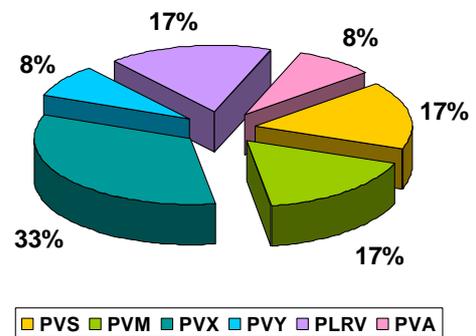
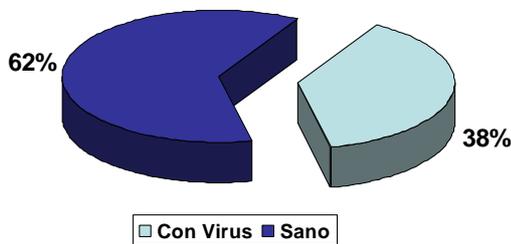


Fig. 73. Representación gráfica de la incidencia de virus en plantas no saneadas por de la variedad Tormenta.

Cuando analizamos la incidencia de los virus presentes entre las plantas no saneadas por cada entrada, nos encontramos que de las plantas no saneadas en la entrada 33 (var. Borralla), un 47 % de ellas presentan el virus S, un 35 % el virus X y un 18 % el virus M. Mientras que de las plantas no saneadas de la entrada 18 de esta misma variedad se presentan en el mismo porcentaje los virus X, Y, S, LR y M, todos ellos en un porcentaje entorno a un 18 % (Fig. 71).

Respecto a las entradas de la variedad Mora, observamos que las plantas no saneadas de la entrada 37 mostraron en un 36 % el virus S y en un 29 % el virus X, mientras que las plantas no saneadas de la entrada 56 mostraron 72% el virus X y un 23 % el virus S. Ambos virus se encontraron en un 100 % de las muestras analizadas al inicio del proceso (Fig. 72).

En lo que a las entradas de la variedad Tormenta se refiere (Fig. 73) observamos que de las plantas no saneadas de la entrada 61, todas se encontraban infectadas con el virus X (100 %), mientras que de las no saneadas de la entrada 11 el mayor porcentaje también corresponde al virus X (33 %).

Como podemos observar, en todas las entradas analizadas un porcentaje de las plantas sometidas a termoterapia y cultivo de meristemos mostraron los virus PVX, PVS y PVM tras el tratamiento. Estos virus se transmiten por contacto, especialmente PVX y PVS. Esta forma de transmisión supondría que durante el proceso de aislamiento de meristemos, la contaminación de los utensilios con jugo de la planta sea suficiente para que el virus persista.

Por otro lado, algunos complejos sintomatológicos parecen ser causados por la asociación de virus M con virus S y X, y la mayoría de las variedades de papa infectadas por PVM también contienen PVS (Howard y Wainwright, 1960). De hecho, en relación al virus M se han llegado a citar hasta cuatro razas en este virus, sin embargo se presentan aún confusión a este respecto dada la tendencia de este virus a presentarse asociado con los virus S y X. Así, en algunas variedades de papa ciertas manifestaciones atribuidas a este virus son en realidad causadas por un complejo de virus, especialmente M-S ("mosaico enrollado de las hojas" (leaf rolling mosaic), "mosaico intervenal" (intervenal mosaic)) y X (Fernández, 1995).

Esta asociación de los virus PVS y PVX que se transmiten por contacto, con PVM, justifican la presencia de este último de manera mayoritaria en las plantas no saneadas durante el proceso junto con los virus antes mencionados.

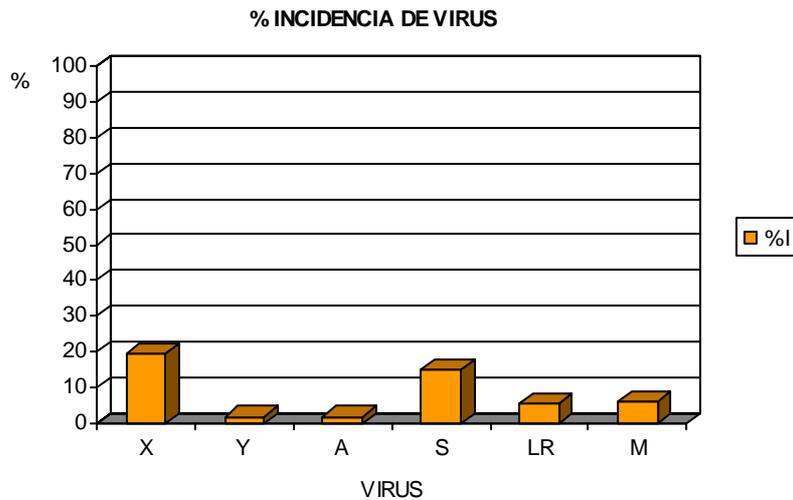


Fig. 74. Porcentaje de incidencia de virus en el total de plantas no saneadas

Así, cuando evaluamos de manera general la presencia de virus en las plantas no saneadas (Fig.74) observamos que en torno a un 20% de ellas portaban aún el virus X, un 15% el virus S, y en porcentajes menores los virus M y LR, seguidos por los virus A e Y.

Con estos resultados podemos concluir que, si bien el procedimiento empleado para el saneamiento de variedades de papa puede presentar algunas limitaciones, principalmente en el paso relacionado con el aislamiento de meristemos, parece ser una técnica muy efectiva para la erradicación de virus, principalmente en las variedades Borralla y Torrenta. Sin embargo, en la variedad Mora, con una carga vírica tan alta podría ser necesario un segundo paso por termoterapia y posterior aislamiento y cultivo de meristemos.

Hemos de considerar que obtener plantas libres de virus es un proceso costoso y que requiere de mucho tiempo. Normalmente se emplea el cultivo de meristemos sin la aplicación de termoterapia como estrategia para reducir el periodo de tiempo requerido en el procedimiento, sin embargo, el tratamiento previo con termoterapia, si bien implica requerimientos de tiempo, puede llevar a aumentar la eficiencia del proceso (Ravnikar *et al.*; 1994). En nuestro caso, dada la carga vírica mostrada por nuestras variedades

optamos por emplear la técnica combinada de termoterapia y cultivo de meristemos de cara a obtener una mejor eficiencia del proceso. Por otro lado, existe varios trabajos realizados en papa en los que se muestran que, de manera general, para la erradicación de virus en papa es más efectivo llevar a cabo el cultivo de meristemos en combinación con un tratamiento con termoterapia (Stace-Smith y Mellor, 1970; Pennazio y Redolfi, 1973), aplicándose este tipo de tratamiento en los principales centros de investigación en papa.

Hemos de considerar que si bien el procedimiento parece ser adecuado para la erradicación de virus en las tres variedades en estudio, habría que considerar la posibilidad de realizar un segundo paso por termoterapia y posterior cultivo de meristemos, especialmente con aquellas entradas de la variedad Mora que mostraron una mayor carga vírica.

Hemos de hacer referencia a la sensibilidad de la técnica de DAS-ELISA que se emplea de manera rutinaria para el control fitosanitario dentro de los programas de certificación de semilla (Golmizare y Panta, 1997; Roca *et al.*; 2000) Trabajos relacionados con la comparación entre la técnica DAS-ELISA y PCR demuestran que la sensibilidad de ésta última está muy por encima, permitiendo la detección de virus a muy baja concentración (Souza-Díaz *et al.*, 1999; Nie y Singh, 2001), mientras que bajas concentraciones virales no son detectadas mediante la técnica de DAS-ELISA. Habría que considerar, además, que es posible aplicar los protocolos basados en la PCR sobre distintos tipos de material. Su fiabilidad para la identificación de diferentes patógenos virales y facilidad de automatización permiten que puedan ser empleados de manera rutinaria, y por tanto, integrados en los protocolos de diagnóstico (Nolasco *et al.*, 1993).

La posibilidad de poder realizar detecciones múltiples, tal y como se muestra en los resultados de los ensayos realizados durante la detección múltiple mediante RT-PCR (Capítulo III, apto. IV.3.3.2) se muestra como una herramienta muy útil en este tipo de procedimiento.

Teniendo en cuenta la sensibilidad de la técnica empleada para el análisis del material sometido al tratamiento de termoterapia y cultivo de meristemos, hemos de considerar que es necesario durante el proceso de

aclimatación de estas variedades realizar nuevamente dichos test a fin de garantizar el estatus fitosanitario el material antes de su paso definitivo a campo.

CAPÍTULO VII
CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

MICROPROPAGACIÓN:

- ✚ Respecto a los protocolos de esterilización ensayados consideramos que el protocolo E1 parece más adecuado. Si bien habría que destacar que la eficiencia del protocolo de esterilización está directamente relacionado con el estatus fitosanitario del material de partida.
- ✚ Consideramos que el Medio1 ensayado durante la fase de establecimiento *in vitro* a partir de brotes de tubérculos parece adecuado, observándose el desarrollo vigoroso de los brotes para las tres variedades en estudio y la formación espontánea de raíces.
- ✚ La diferente procedencia del material no parece influir en el comportamiento de la variedad durante su establecimiento *in vitro*.
- ✚ El empleo de un medio de cultivo durante la fase de multiplicación suplementado con giberelina induce un aumento en el número de nuevas yemas de manera general, frente al empleo de un medio de cultivo carente de reguladores de crecimiento.
- ✚ El empleo de una fase en medio líquido durante la multiplicación es beneficioso al aumentar el número de plantas que se pueden conseguir.

DIAGNÓSTICO

- ✚ En la variedad Mora se detectaron tres de los virus analizados: PVX, PVA y PVS, en prácticamente el 100% de las muestras analizadas, si bien alguna de las plantas analizadas mostraron además PVM o PLRV.
- ✚ En la variedad Torrenta se detectaron también tres de los virus en mayor porcentaje: PVS, PLRV y PVA, sin alcanzar el 100% de las muestras analizadas como en el caso de la variedad Mora.

- ✚ En la variedad Borralla tan solo el PVA se detectó en el 100% de las muestras analizadas, encontrándose el resto de los virus en unos porcentajes muy inferiores al observado en las otras variedades.
- ✚ Respecto a los resultados de IC-RT-PCR consideramos que los resultados obtenidos en el ensayo II, donde se emplea una temperatura de anillamiento de 60° C permite la amplificación de fragmentos de la longitud esperada para los virus analizados, evitándose duplicidad de bandas.
- ✚ Se pone de manifiesto la mayor sensibilidad de la técnica de IC-RT-PCR frente a la de DAS-ELISA, observándose diferencias en lo que a la detección de PVA y PVY se refiere, ambos detectados mediante IC-RT-PCR y no mediante DAS-ELISA.
- ✚ El empleo de una IC-RT-PCR múltiple permitió la detección simultánea de hasta 3 virus sobre una misma muestra: PVX, PLRV y PVS; no existiendo ningún tipo de interacción entre las parejas de cebadores empleadas.
- ✚ Fue posible la amplificación por RT-PCR directamente a partir de extracto de planta, permitiendo un diagnóstico rápido, económico y fiable.
- ✚ La detección simultánea de virus mediante una RT-PCR permitió la detección simultánea de al menos 2 virus.

IDENTIFICACIÓN:

- ✚ Los resultados obtenidos tras los análisis de secuencias nos revelan la identidad de PVX y PVY raza N. Además identificamos patógenos virales relacionados con *Carlavirus* (4-Poty) y con *Nepovirus* (2-Poty(1) poniéndose así de manifiesto la diversidad de especies virales presentes en estas variedades antiguas de papa, si bien nuestros resultados sugieren la necesidad de realizar estudios de caracterización en profundidad, que permitan el desarrollo de protocolos específico para

las especies virales presentes en las variedades de papa antiguas de Canarias.

TERMOTERAPIA Y CULTIVO DE MERISTEMOS

- ✚ El tratamiento de termoterapia de 34° C/16h y 32° C/8h durante 30 días se muestra ser efectivo.
- ✚ Las variedades en estudio se muestran tolerantes a estos rangos de temperatura, observándose un porcentaje de explantos desarrollados siempre por encima de un 75% para todas las variedades en estudio.
- ✚ El medio de cultivo seleccionado para el desarrollo de meristemas en las variedades en estudio se mostró adecuado, con un porcentaje de eficiencia en el desarrollo de explantos superior al 80%, observándose al final del proceso plántulas enraizadas y con hasta 3 yemas por brote.
- ✚ Por otro lado, el porcentaje de cultivos contaminados es reflejo de la asepsia que se tiene durante el proceso de aislamiento y siembra del meristemo con lo que podemos considerar también como eficiente el procedimiento y manejo de la técnica de aislamiento.
- ✚ Los valores más altos de porcentaje de plantas sanas para los virus estudiados los encontramos en las entradas 18 (var. Borralla) y 61 (var. Torrenta), con un 94,1 % y 96 % respectivamente; seguidos por las entradas 33 (var. Borralla) y 11 (var. Torrenta) con un 70 % y 61,53 % respectivamente. Sin embargo, los porcentajes de plantas sanas para los virus estudiados más bajos los muestran las dos entradas (37 y 56) de la variedad Mora, con un 48 % y 33,3 % respectivamente.
- ✚ Cuando evaluamos de manera general la presencia de virus en las plantas no saneadas observamos que en torno a un 20% de ellas portaban aún el virus X, un 15% el virus S, y en porcentajes menores los virus M y LR, seguidos por los virus A e Y.

ANEXOS

ANEXO 0**ANÁLISIS DAFO PRESENTADO EN EL PIC INTERREG IIB CANARIAS - AZORES - MADEIRA.**

DEBILIDADES	FORTALEZAS
<ul style="list-style-type: none"> - Escasa superficie agrícola utilizable. Orografía no propicia y altos costes preparación explotaciones por mayor esfuerzo en abancalamientos, traslado de tierra y coste del suelo. - Condiciones extremas por alto riesgo de sequía (crónica) y vientos huracanados. - Escasez y mala calidad del agua con sistemas de distribución de agua obsoletos, baja capacidad de almacenamiento, falta de redes de riego colectivas con agua a presión, escaso telecontrol y automatización de las redes y falta de infraestructura de apoyo. Mejores condiciones en la agricultura de costa, con relevantes mejoras en la última década. - Estructura deficiente de las explotaciones agrarias: <ul style="list-style-type: none"> • En general, pequeña dimensión y excesiva parcelación. • Estructura de la propiedad muy fragmentada • Sistema de riego obsoleto. Mejores condiciones en la agricultura de costa. • Escasa mecanización. • Elevado envejecimiento de la población agraria. • Falta de formación técnica y empresarial. • Predominio de la agricultura a tiempo parcial. • Escasa integración. • Costes elevados de producción. <p>Todo ello lleva a una baja productividad aparente del trabajo y a un reducido tamaño económico de las explotaciones, de modo que la actividad genera escasa rentabilidad.</p> - Bajo nivel de asociacionismo. Escasa organización de la asistencia técnica en la producción y de otros servicios de apoyo. Deficiencias en infraestructuras de apoyo. Escasez de técnicos especializados. Falta de viveros de material vegetal certificado. Dependencia del exterior en la adquisición de insumos (fuerte dependencia tecnológica). - <u>Escaso desarrollo de la agricultura ecológica.</u> 	<ul style="list-style-type: none"> - Clima subtropical adecuado para el cultivo de gran variedad de productos. - Mejoras en el sistema de riego y conciencia en el ahorro de agua. - <u>Exención de determinadas enfermedades y plagas y baja incidencia de otras.</u> - <u>Producciones de alta calidad organoléptica.</u> - <u>Implantación de sistemas de calidad para algunas producciones (no integrados).</u> - Capacidad de producir fuera de temporada. - Existencia de recursos fitogenéticos para programas de selección y mejora, como parte de la enorme biodiversidad de la Región. - <u>Existencia de una infraestructura de investigación agraria desarrollada.</u> - Posibilidades de cultivos biológicos a bajo coste. - Alejamiento del mercado local de otras producciones. Existencia de barreras de entrada.

<ul style="list-style-type: none"> - En el mercado interior, atomización en la comercialización con reducida presencia de canales regulares y estables de comercialización. Mercado estrecho y frágil ante la importación de producción exterior. - Alejamiento de los mercados de consumos para algunas producciones. - Escasa industrialización e integración intersectorial (fuerte extraversion de la industria local) sin que se generalicen sistemas integrales de control de calidad y trazabilidad. - <u>Escasa implicación del sector en los programas de I+D y aislamiento científico por la orientación de la producción.</u> 	
---	--

AMENAZAS	OPORTUNIDADES
<ul style="list-style-type: none"> - <u>Orientación de la producción hacia una excesiva concentración en cultivos y fuertemente dependiente de mercados exteriores.</u> - <u>Elevada presión sobre el uso de los factores productivos de uso intensivo en el sector (agua, tierra y mano de obra) en relación con otras actividades (urbanización, sector turístico, industria) de mayor rentabilidad económica.</u> - <u>Liberalización de mercados y presión competitiva de zonas de cultivo con igual o mejor orientación en la producción, condiciones climáticas y costes de producción.</u> - <u>Rápidos cambios tecnológicos y elevada resistencia al cambio.</u> - <u>Reducción del aislamiento geográfico y su importancia en la extensión de plagas. Frágil ecosistema.</u> - Empeoramiento de las condiciones de los suelos y de los recursos hídricos por el uso intensivo de la tierra (fertilizantes y plaguicidas) y sobreexplotación del acuífero. - <u>Daños en la biodiversidad por introducción de especies foráneas.</u> - <u>Desaparición de las variedades agrícolas tradicionales.</u> - <u>Desruralización del territorio: degradación de suelos por abandono, desertización, reducción de la dispersión en el poblamiento, concentración de la actividad económica</u> 	<ul style="list-style-type: none"> - Condiciones especiales de apoyo a la agricultura canaria en el marco de la PAC y del régimen especial de integración de las islas en la UE, que paliar en parte los mayores costes de producción de la agricultura local. - <u>Mayor demanda de los consumidores por el conocimiento de la trazabilidad, el origen de los productos, su cercanía y la frescura.</u> - <u>Mayor demanda de productos ecológicos.</u> - Desarrollo de instrumentos especiales de apoyo a la comercialización de productos de mercado interior. - <u>Posibilidades de diversificación de la oferta agraria con la introducción de nuevas variedades y sistemas de cultivo alternativos (ecológicos) y aumento de determinadas producciones (viña, plantas y flores, determinadas hortalizas, ganadería).</u> - <u>Posibilidades de desarrollo de material vegetal propio de producción sobre la base de los recursos fitogenéticos existentes.</u> - Existencia de productos de calidad capaces de obtener Denominaciones de Origen o Indicaciones Geográficas Protegidas. - <u>Apoyo comunitario al desarrollo de acciones de protección de la biodiversidad, de instrumentos empresariales de gestión medioambiental y de agricultura sostenible.</u>

Tomado de entre otros documentos del Plan Director de Actuaciones para el Desarrollo Sostenible del Medio Rural en las Medianías de Canarias (CAGPA, 2000). En negrita, los elementos de clara vinculación con el análisis DAFO presentado en el PIC Interreg IIIB Canarias – Azores – Madeira.

ANEXO I**TAMPONES PARA DAS-ELISA*****(1) Tampón carbonato pH 9.6:***

Carbonato sódico	1,59 g
Bicarbonato sódico	2,93 g
Azida sódica	0,2 g

Agregar agua hasta 1 litro

(2) PBS (Fosfato Buffer salino) pH 7.4

Cloruro de sodio	8,0g
Di-hidrógeno fosfato de potasio	0,2g
Hidrógeno fosfato de sodio doce hidratado	2,9g
Cloruro de potasio	0,2g
Azida sódica	0.2g

Agregar agua destilada hasta completar un litro.

PBS-Tween: añadir 0.5 ml Tween 20 ® al buffer PBS

(3) Tampón de extracción:

PBS-Tween
2% PVP-40
1% Albúmina de huevo

(4) Tampón sustrato:

Dietanolamina	97ml
Agua Regular pH 9.8	800 ml
Azida sódica	0,2 g
Agregar agua destilada hasta completar 1 litro	

ANEXO II**TAMPONES Y MEZCLA DE REACCIÓN PARA IC-RT-PCR*****(5) Tampón carbonato pH 9.6:***

Carbonato sódico	1,59 g
Bicarbonato sódico	2,93 g
Azida sódica	0,2 g

Agregar agua hasta 1 litro

(6) PBS (Fosfato Buffer salino) pH 7.4

Cloruro de sodio	8,0g
Di-hidrógeno fosfato de potasio	0,2g
Hidrógeno fosfato de sodio doce hidratado	2,9g
Cloruro de potasio	0,2g
Azida sódica	0.2g

Agregar agua destilada hasta completar un litro.

PBS-Tween: añadir 0.5 ml Tween 20 ® al buffer PBS

(7) Tampón extracción ELISA

	<u>100 ml</u>	<u>Conc. final</u>
Tris HCL 1M, pH 8,3	50 ml	0,5 M
Cloruro sódico 5M	3 ml	150 mM
Tween 20 ®	50 µl	0,05%
Polivinilpirrolidona-40	2 g	2%
Polietilenglicol (6000)	1 g	1%
Azida sódica	20 mg	3 mM

Agregar agua destilada hasta 100 ml

(8) Mezcla de PCR

	<u>Cantidad (µl)</u>	<u>Concentración final</u>
MgCl ₂ (50 mM)	3,2	2 mM
dNTPs (10 mM)	1 (x4)	0,125 mM cada uno
10x buffer PCR	8	1x
HPRI 20U/µl	0,25	5 U en total
Taq Pol 1U/µl	2	2 U en total
MuLV 50U/µl	0,5	25 U en total
Primer P3' 10µM	1	0,125 µM
Primer P5' 10µM	1	0,125µM
Agua estéril	63,05	
Volumen final	80	

(9) Tampón Tris-borato 5X:

Tris-HCL	108g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA 0,5 M (pH 8.0)	20 ml

Agregar agua hasta 1 litro

(10) Bromuro de etidio

Bromuro de etidio	0,1 g
Agua	10 ml
Agitar hasta su total disolución	

Guardar a 4° C y oscuridad.

ANEXO III**ENSAYOS DE ESTANDARIZACIÓN PARA LOS PROTOCOLOS DE IC-RT-PCR Y RT-PCR**

ENSAYO I	
Protocolo	IC-RT-PCR simple
IgG:	Anti-PVS; anti PVX; Anti-PVA, Anti-PLRV (CIP)
Cebadores	PVS ₁ ; PVS ₂ ; PVA, PVX; PLRV (Tabla 12)
Programa	RT: 42°C (30m), 94°C (5m) ; PCR: 94°C (30 s), 55°C (1m), 72°C (1m) , 30 ciclos; extensión a 72°C (5m)

ENSAYO II	
Protocolo	IC-RT-PCR simple
IgG:	Anti-PVS; anti PVX; Anti-PVA, Anti-PLRV, anti-PVY (CIP)
Cebadores	PVS ₁ ; PVS ₂ ; PVA, PVX; PLRV, PVY específico(Tabla 12)
Programa	RT: 42°C (30m), 94°C (5m) ; PCR: 94°C (30 s), 60°C (30s), 72°C (30s) , 30 ciclos; extensión a 72°C (5m)

ENSAYO III	
Protocolo	IC-RT-PCR multiple
IgG:	Anti-PVS; anti PVX; Anti-PVA, Anti-PLRV, anti-PVY (CIP)*
Cebadores	PVS ₂ ; PVA, PVX; PLRV, PVY específico(Tabla 12)
Programa	RT: 42°C (30m), 94°C (5m) ; PCR: 94°C (45 s), 60°C (30s), 72°C (30s) , 35 ciclos; extensión a 72°C (5m)**

*El tapizado de los tubos se realiza con una mezcla de todas las IgG, a la misma relación y en una dilución de 1:300.

**Mezcla de PCR: En la mezcla de PCR únicamente se añade el cebador antisentido para cada uno de los virus a detectar y se lleva a cabo la reacción de RT (42°C, 30 min). Transcurrida la reacción se para en hielo y se añade la mezcla de cebadores con sentido a cada uno de los tubos y se realiza la reacción de PCR.

<i>ENSAYO IV</i>	
Protocolo	RT-PCR simple*
Cebadores	PVS ₁ ; PLRV, PVY (Tabla 12)
Programa	RT: 42°C (30m), 94°C (5m) ; PCR: 94°C (30 s), 60°C (30s), 72°C (30s) , 30 ciclos; extensión a 72°C (5m)**

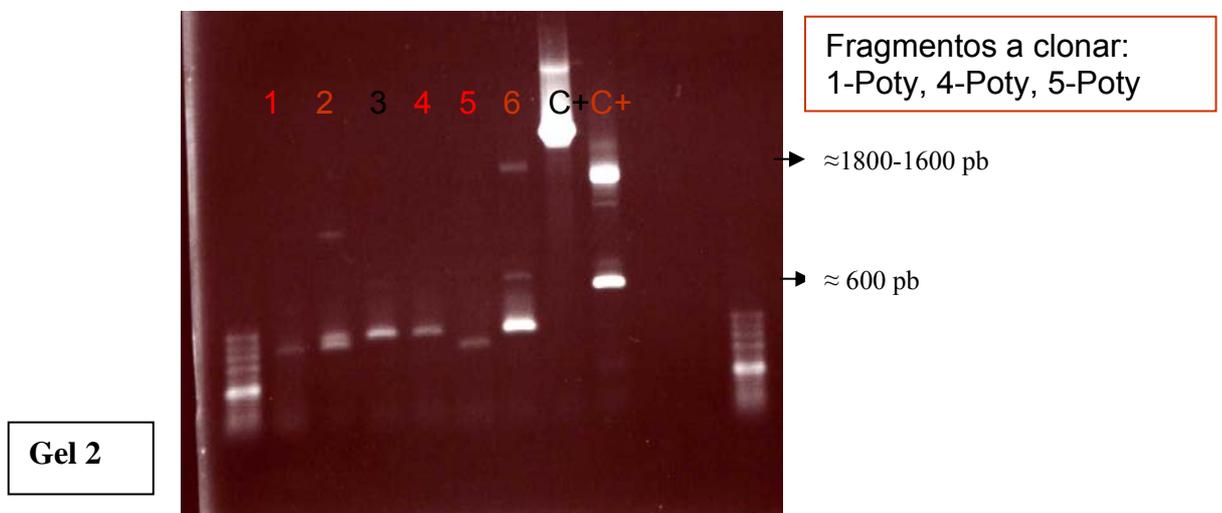
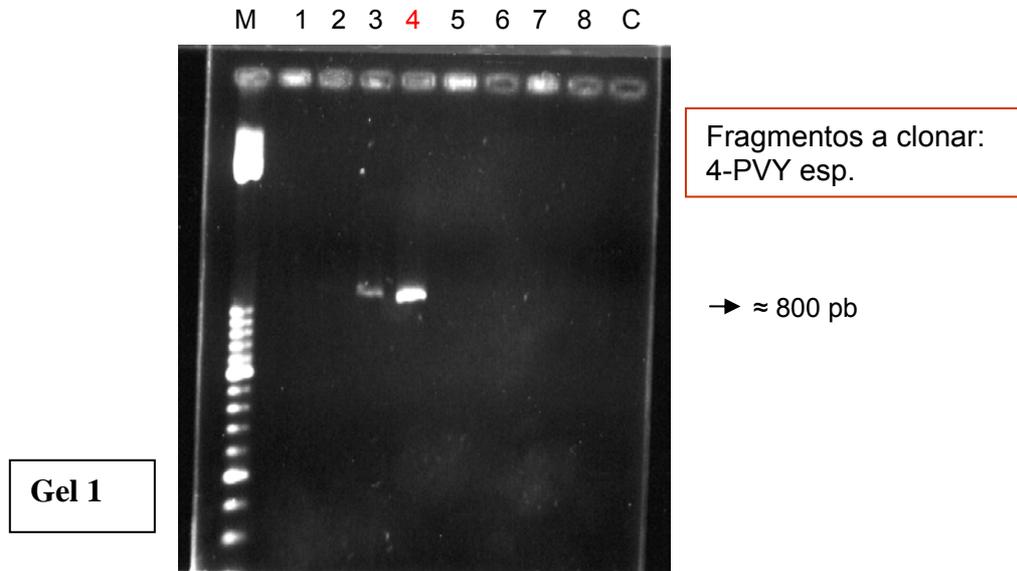
*Muestras son maceradas en tampón de extracción ELISA, y dos diluciones son ensayadas: 1:25 y 1:50

<i>ENSAYO IV</i>	
Protocolo	RT-PCR múltiple*
Cebadores	PVS ₂ ; PVA; PVX; PLRV (Tabla 12)
Programa	RT: 42°C (30m) para en hielo y añadir P5', 94°C (5m) ; PCR: 94°C (45 s), 60°C (30s), 72°C (30s) , 35 ciclos; extensión a 72°C (5m)**

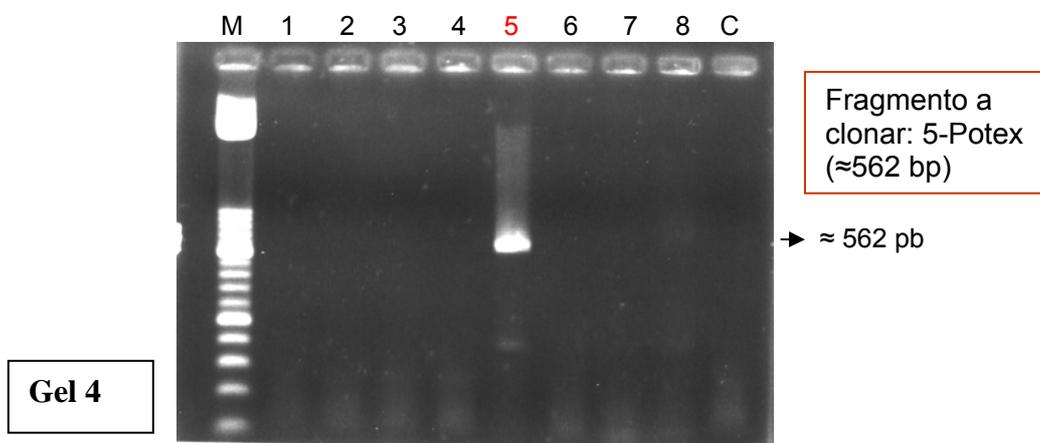
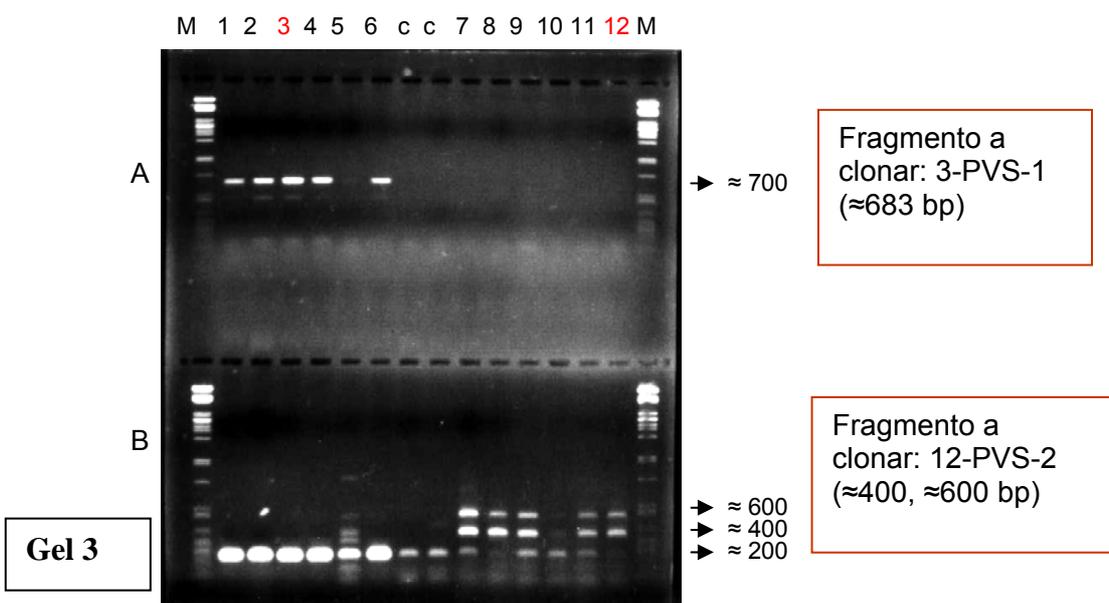
*Muestras son maceradas en tampón de extracción ELISA, y dos diluciones son ensayadas: 1:50 y 1:100

ANEXO IV

SELECCIÓN DE FRAGMENTOS



Fragmentos a clonar:
2-Poty, 6-Poty,
Gel de electroforesis y tomar bandas del
gel para clonar: KIT: geneclean Turbo (Q-
Biogene)



ANEXO V

PROTOCOLO PARA EL CLONAJE EN VECTOR TOPO TA Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Para llevar a cabo la transformación hay que tener previamente preparado:

- Un baño a 42 °C
- Atemperar el medio SOC
- Calentar las placas de LB-Ampicilina durante 30 min. y añadir 40 μ l de X-gal (40 mg/ml)
- Mantener en hielo células competentes por cada transformación.

1.- Preparación de la reacción de clonaje:

Reacción de PCR	2 μ l
Agua estéril	2 μ l
PCR-TOPO Vector.....	1 μ l
Volumen final.....	5 μ l

2.- Mezclar e incubar a temperatura ambiente por un tiempo de 5 min.

3.- Centrifugar y mantener en hielo.

4.- Añadir 2 μ l de la reacción de clonaje a 25 μ l de células competentes. Mezclar suavemente e incubar en hielo por un tiempo de 30 min.

5.- Dar un choque térmico de 30 segundos a 42° C y sin agitación a las células competentes e incubar posteriormente en hielo por un tiempo de 2 min..

6.- Añadir 100 μ l de medio SOC previamente atemperado y mezclar gentilmente. Incubar a 37° C durante 30 min para la selección con Ampicilina y mantener luego en hielo.

7.- Extender todo el volumen de cada transformación en una placa (LB + Amp) e incubar toda la noche.

ANEXO VI**EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE BACTERIAS****➤ Solución de lisis:**

Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA pH 8.0	10 mM
NaOH	100mM
SDS	1%

➤ Solución B

HCl 1N	300 µl
Colorante de muestras	500 µl
(Ficoll 400 30%, EDTA pH 8.0 40 mM, BPB 0,2%, Xilencianol 0,2%)	

- 1.- Repartir 40 µl de solución de lisis por tubo eppendorf.
- 2.- Recoger la colonia de la placa con un palillo y resuspender en la interfase contra la pared del tubo.
- 3.- Mantener a temperatura ambiente durante 15'
- 4.- Añadir 8 µl de la solución B (si la solución queda de color verde añadir solución de lisis hasta neutralizar y que quede color azul).
- 5.- Incubar a -80° C durante 20'.
- 6.- Centrifugar 5' a 4° C y pasar los tubos a hielo.
- 7.- Cargar las muestras inmediatamente en un gel de electroforesis.

ANEXO VII**PROTOCOLO PARA PREPARAR MINIPREPS**

- 1.- Centrifugar 2 ml del medio de cultivo LB para el enriquecimiento de las colonias a baja velocidad durante 10 min.
- 2.- Eliminar el sobrenadante y resuspender en 250 µl de la solución P1, mezclar suavemente.
- 3.- Añadir 250 µl de la solución P2, mezclar invirtiendo el tubo.
- 4.- Añadir 350 µl de la solución N3 y mezclar suave invirtiendo el tubo.
- 5.- centrifugar 10 min. a 13.000 rpm. Recoger el sobrenadante y añadirlo a la columna Quiaprep.
- 6.- Centrifugar 1 min. y desechar.
- 7.- Lavar la columna con 0.75 ml de la solución PE y centrifugar nuevamente por 1 min. y desechar el líquido.
- 8.- Volver a centrifugar por 1 min. para eliminar los restos de la solución PE en la columna.
- 9.- Añadir 30 µl de agua destilada estéril, centrifugar durante 1 min. y guardar a -20° C.

ANEXO VIII**SECUENCIA DE LOS FRAGMENTOS CLONADOS****4-PVY esp-3:**

TAAAAGTAGTACAGGAAAAGCCAAAATACTTACTGCAAACATAAATATCTATATATCGTCCG
GAAAGACACTACAATCACATGTTCTTCACTCCAAGTAGAGTATGCATACTTGGAGAAACATC
CTCGGTGGTGTGCCTCTCTGTGTTTTCTCTTGTGTACTAATGCCACCATCCAATCCGAAAA
GTCGAGATTGAGCTGATTTTTAAAGCCGCGGCCTTCATTTGAATGTGCGCCTCTCTAGCCCTC
ACTGGTGTCCGTGATGTAACCTCATAAAAAGTCAAAGCATAGCGAGCCAAACTTCCATCGCG
CAGATTACGAACTAAACCATATCGTGGCATATATGGTTCCTTTTTGTTGCGCATTCTATAT
ACGCTTCTGCAACATCTGAGAAATGTGCCATGATTTGCCTAAGTGTGGTTTTGCATTCTCA
ACGATTGGTTTCAGTGGGTATTCGACTTGTTCATCTCCATCCATCATAACCCAAACTCCATT
GATATTTGGCGAGGTTCCATTTTCAATGCACCAAACCATAAGCCCATTTCATCACAGTTGGCA
TTTCAATTTCTCCTATGTCGTATGCAAGTTGTACTGCTTCATACCATGTATCAAAGTGTGAT
TGAGTTGCTCGAGTATTTGAGATGTCAATTTGCTGTGGAGCATACTCGAGTAAGTGTTC
AATTTAGTACAGTTGCACCCTTGCTCTTGGGCATTCTCATTTTGGACGTGATAGCTTTAATTC
GTGGCACAGTGTGAGTTCCAGATGTTCCAACATTCACGTCCTTTTCCTTTCTTGTGAGA
TTTGGTTGAATGCTACCTTGCTCTTGTGTTTTGCATCTTTCTTAGTGCTTCCTCCTGCATCAAT
TGTGTCATTT

2-poty-1

GTTTTCCAGTCACGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAACTAAAAGCTTCA
GTAAGAACTAATAAAAAGTCCGTCCATCAGCCCAATGCTCACAGAACTCCAAGTAGTGAAAGT
CAGAGGAGCTTATCATACGATAAAACAGGTTTAGAAAACCAATAGGACCAACAAACCTGTC
AGAAACAACGTCCTTACTAGGGTTTTGCCAACCCACAAAAGCCAATAAATTCTCCACCAC
GTGTGAGGGGATCATTAAAACACTTTCATCTGGTGTGGATTTACTCCCGGGTATCAATTCC
AGGGTCCATGATCTATTGGGTTTGTGTCAAATTGACATCAGCCTAGTTCTTGAAAGTTCTGT
ATCGTCGAACCTTCACTTCCAACGCCAAATTTACATAAATTTGGAAATCAGCATGCGTGCCT
TCCTGAGGTTTATTACCTCCCCGTGTTTCATCTCGGGCCCCATCCAATCTAAGTTGCCAAAC
TTCGATCTTGGGTACAGAAGGTGTTATAACACATACCTTTAGACTTGTGCGCCAAACGTTT
ACGTTAACCAATGCCCCAGGGGAATATTTACCTTTACTACATTGACTTAACCCCGTGTGAA
GCGGGGTGCTCATATCTAACAAAAAGCACCAAGTTTTTACTGAGCCAGGGGACGGCAGC
CCACCCTAGAGAAAGCCTATTACTCAGCACGTAGTTCGTTTTTATCGAGGGGAACCATAGTC
CTCTATCCCAAGTGGGAACTCTACAGACATCAATTACCGATTTTACGGAACCAAAGTGGTA
TCACACAAATGTGTGAGTTTTGATGCTGTGTAAAAGAAAACAAAAATAAAGCATAACTCC
AATCAATTAAGACCAGAGGTTCTCAACAAATTTAGCAGACTGGCTTGTTGACAACCAGATCC
CGTTACTCTCAACGGGATGAAAGAACATCTACACTGGTCCAATACTTCTACCGTAGCACGCG
AATCCCGGAAGAACACGAATAGATATGCATATGCTACTAAAAGCAGCAGTAGCATCTATAAT
CATCTCCACATATTGTTCTTCAGTATCACGTGCCACCATTGAAGCAACACCAGAATGATCAC
CCACTGTCAAGGGTATCACCACCTTCTTTGTAATGGGGCTGCGGCTGTGCGTTCCTCCAAA
ATAAAACCACGATTTGCGGCATATTTCAAATTTGGTACGAAATAAAACGCGGCCCGCTAA
GCTAGACAATGCCACCACTTACACCAAATCGCACTATTAACCTCAACTGAACCTTTGAAAA
AGGCACAACCTGTTGAGTATGTAGTGGAATGGGTTGCCGCTATTATTGCC

4-poty8:

```
GTTTTCCCAGTCACGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATGCTAAAATATTTTAAAAACATAT
TTTCTTTATAGTTGCACACTTATATATTATTTAAGTTTTATGCGAAACTCTGACCTTGCACC
ATGGGTGGTATCACCTCAGTTACTCCAACCCTGAATGAAAGTCACTACTTTATAATTTTGAC
TAATGCCTGGACGGCATGTTCTATTATCACACTTAGAATTACAAATAGGTGGATAGACACGA
TAACATCGCCAGCATCGCCCAATGCTGCGGGCCCTCCGCTTACGAGCGTAAGTGGAACGACC
CCCAGAACTGGACCAGCGCTTAGGCTTATTATATTTACACAAACTTCAACTGGCAAAACAT
ATCCCAGTCGATGGACACACAACAATAACATAGCTAAACGGTCTGCCTTCATCGGTTGCCCA
CTGTTATTGCC
```

4-poty5:

```
GTTTTCCCAGTCACGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATGCTAAAATATTTTAAAAACAT
ATTTTCTTTATAGTTGCACACTTATATATTATTTAAGTTTTATGCGAAACTCTGACCTTGCAC
CCATGGGTGGTATCACCTCAGTTACTCCAACCCTGAATGAAAGTCACTACTTTATAATTTTG
ACTAATGCCTGGACGGCATGTTCTATTATCACACTTAGAATTACAAATAGGTGGATAGACAC
GATAACATCGCCAGCATCGCCCAATGCTGCGGGCCCTCCGCTTACGAGCGTAAGTGGAACGA
CCCCCAGAACTGGACCAGCGCTTAGGCTTATTATATTTACACAAACTTCAACTGGCAAAAC
ATATCCCAGTCGATGGACACACAACAATAACATAGCTAAACGATCTGCCTTCATCGGCTGCC
CGCTATTATTCCC
```

6-poty-3:

GGTAATAACAGCGGACAACCTTCTACCGTTGTGGATAATTCTCTCATGGTTGTCCTTGCTAT
GCATTACGCTCTCATTAAAGGAGGGCGTTGAGTTTGAAGAAATCGACAGCACGTGTGTATTCT
TTGTTAATGGTGATGACTTATTGATTGCTGTGAATCCGGAGAAAGAGAGCATTCTCGATAGA
ATGTCACAACATTTCTCGGATCTTGGTTTGAACATGATTTTTTCATCGAGAACAAGAAGGAA
AGAGGAATTGTGGTTCATGTCCCACAGAGGCCTGTTAATCGAGGGCATGTACGTGCCAAAGC
TTGAAGAAGAGAGAATTGTATCCATTCTGCAATGGGATAGAGCTGATCTGCCAGAGCATAGA
TTAGAAGCAATTTGTGCAGCAATGATAGAATCCTGGGGTTATTTTAAGTTAACGCACCAAAT
CAGGAGATTCTACTCATGGTTGTTGCAACAGCAACCTTTTTCAACGATAGCGCAAGAAGGAA
AAGCTCCATACATAGCGAGCATGGCATTGAAGAAGCTGTACATGGATAGGACAGTAGATGAG
GAGGAAC TGAAGCTTTCCTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAATTTGAGTGCAGTAC
TTATGAAGTGCACCATCAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAAGATG
CAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTC AACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAAT
GTTGGAACATCTGGAAC TCACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAAT
GCCAAGAGCAAGGGTGCNACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTATGCTCCANAGC
AAATTGRNMTCTCAANTACTCGAGCAACTCANTCACAGTTTGATACMTGGTATGAAGCAGTA
CNACTTGCATACGACATAGGAGAAAATGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTG
GTGCATTGAAAATGGAACCTCGCCAAATATCAATGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATG
ACAAGTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAACCAACACTTAGGCAAATC
ATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAGGAACCATA
TATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTTG
ACTTTTATGAAGTTACATCACGGACACCAGTGAGGGCTAGAGAGGCGCACATTCAAATGAAG
GCCGCAGCTTTAAAATCAGCTCAATCTCGACTTTTCGGATTGGATGGTGGCATTAGTACACA
AGAGGAAAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTTTCTCCAAGTATGCATACTCTACTTG
GAGTGAAGAACATGTGATTGTAGTGTCTTTCGGACGATATATAGATATTTATGTTTGCAGT
AAGTATTTTGGCTTTTCCTGTACTACTTTTATCGTAATTAATAATCGTTTGAATATTACTGG
CAGATAGGGGTGGTGTAGCGATTCCGTCGTTGCAGTGACCTTAGCTGTGCTTTCTGTATTAT
TATGTTTGTATAAAAAGTGCCGGGTTGTTGTTGTTGTTGGCTGATCTATCGATTAGGTGATGTT
GCGATTCGTCGTAGCAGTGA CTATGTCTGGATTTAGTTACTTGGGTGATGCTGTGATTCTGT
CATAGCAGTGGCTGTAACTTCAATCAGGAGACAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCGTGACTGGGAA
AAC

3-pvs-1:

TAATCTCAGCGCCAAGCATCCCTCCAGTGTACTCAACATTAGTGTGGCCAATCGCTCATTT
 CTGTTGACTTGTCAATTGCCGTACTCTTGTGGGCATTGTGAGCTATTGTTTCCTCAGGTGT
 GGGCCTGCGTATGAGCCCCCTCTACGGGCTGGACTGCAGCCCCATTAGTCACATAATCGAATG
 TGTCAAATGCGGCGAAGCGTGCATTCCATTGAAATCCCATCGCCTGCCAATCCGAAGGTGGC
 CTATTCTGGACTAGCATGTAATTCCACACGACTGGAGCATAACAGCCTGCACACTTTTCTCAA
 TCCCGCGCGATTCTTCATGATTGCAATGATCGAGTCCAAGGGCACTGCGCCTGTTGGGAACT
 CCACAGTTCCCTGCTGGATCTAGATAAACAGAGCTACTCACGCTTGCACACATGATCACCCT
 TTCAGTATGACTCCTGCAACGTGCTCTGTGGGAACCCCGAGTCCAGCGATGTCAGCAGTGAT
 TTGTGCCATTTGCTCGGTGTTCCGCATGTTGTTGGACACAGATCGGATTTCCATCTTGAACA
 GCTCATCGATTGAAAACCGCGAGTATGGATTCTCCGGATTCTCCGCATCTCAGGGGTCGGC
 TCTAGCGAGGGTCTACCCATCTCAAAGAGATGTTGCTCAATGTTGAATTGTGCCTTTTGA
 GGA

12-pvs2-2:

TGGCGAACACCGAGCAAATGGCGAAGATCACATCAGACATCTCCGGCCTGGGCGTACCTACT
 GAGGAGGTTGCGGCCGTGATACTCAAGGTTGTCATCATGTGTGCTAATGTGAGCAGCTCCAT
 TTACCTGGATCCATCGGGGAGCGTGGAATTTGAAGGGGGCGCGGTACCTACCGACGCCATTG
 TGGCTATCATGAAGAATGTGGGGCTCAGAAAGGTTGTAGATTATATGCCCCGGTTGTGTGG
 AACTGTATGCTGGTTAAGCAGCAGCCACCATCAGATTGGCAGTGCCCTTGGACTCGATCAT

12-pvs2-4:

ATGATCGAGTCCAAGGGCACTGTGGGCTATGGTCTCCAACCTTGGTTGGCATTCTGATCAGAC
 CTTCTACTGGCTGTATAGCCGAGTATTTGTCACATAATCGAACGTGTCAAAGGCTGCGTAC
 CTAGCTTCATACGGAAAACCCATGGCCTGCCAATCTGATGGTGGCTGCTGCTTAACCAGCAT
 ACAGTTCCACACAACCGGGGCATATAATCTACAAACCTTTCTGAGCCCCACATTTTCATGA
 TAGCCACAATGGCGTTCGGTAGGTACCGCGCCCCCTTCAAATTCACGCTCCCCGATGGATCC
 AGGTAAATGGAGCTGCTCACATTAGCACACATGATGACAACCTTGAGTATCACGGCCGCGAC
 CTCCTCAGTAGGTACGCCAGGCCGGAGATGTCTGATGTGATCTTCGCCATTTGCTCGGTGT
 TCGCCA

5-potex4:

GGCAGCATTCAATTCAGCTTCAGACGGTGGCCGGATAAGCCCCTCTTTGGGCATGATGGCAG
CTGGGTTAGTGACTCCATTGAAGAAGTCGAATGCAGCGAATTTGTGCTCAGGCTTGAAACCT
TGTGCTTGCCAGTTAGCAGGTGGACTGTTGTTAGTCAACATCCAGTTCCATAACCACTGGGGC
ATACTTCATGCAAAATTGCCTAAGTGTGCACACCTCTTTGATCGCCGCTGCCAGTCTGGCTC
TGCTGATGCCATTGGAATAGGGACCTGTATCTATCATTTCTGTTTGGGCAGATGAGCCCACA
TCAGCACAATGTCTGACTAAGTCCCAAGCAGCCTGTGCCATAGTGTCTGTGGGCACCTTCAT
GTCCTTCCAAATAGCCTCAATCTTGCTGAGGTCCTCATTTGTTGCAACGGCATTGCTGGCTA
CTATAGCACGGGCTGTACTAAAGAAATCCCCATCCGGGATGGTGAACAGTCCTGAAGCTGTG
GCAGGAGTTGCGCCTGCAGTTTTCTGGTAGTTGAGGTAGTTGACCCTGTGGCCTGTGTTGT
GCTA

ANEXO IX**TABLA RESÚMEN RESULTADOS DE CLONES SELECCIONADOS**

<i>GEL DE ELECTROFORESIS</i>	<i>BANDAS SELECCIONADAS</i>	<i>MINIS DE COLONIAS</i>	<i>CLONES SELECCIONADOS</i>
GEL 1	4-PVY-esp.	4-PVY-esp (1), (3), (4)	4-PVY esp (3)
GEL 2	1-poty	1-poty (5), (7)	2-poty (1)
	2-poty	2-poty (1), (2)	
	4-poty	4-poty (5), (8)	4-poty (8)
	5-poty	5-poty (5)	
	6-poty	6-poty (2), (3), (4)	6-poty (3)
GEL 3	3-PVS-1	3-PVS-1 (38), (40)	3-PVS-1 (40)
	12-PVS-2	12-PVS-2 (2), (4), (5), (6)	12-PVS-2 (2); 12-PVS-2 (4)
GEL 4	5-potex	5-potex (2), (4), (5), (6)	5-potex (4)

ANEXO TABLAS

Tabla 1. Variación a nivel mundial en los últimos 5 años del cultivo de la papa. (Fuente: <http://faostat.fao.org>).

Tabla 2. Superficie cultivada en los principales países europeos, junto a los rendimientos y producción para el año 2004. (Fuente: <http://faostat.fao.org>).

Tabla 3. Ranking: de rendimiento de la papa para el año 2004. (Fuente: <http://faostat.fao.org>).

Tabla 4. Superficie cultivada en diversos países, junto a la producción y el rendimiento para el año 2004 (Fuente: <http://faostat.fao.org>).

Tabla 5. Importancia de la papa en Canarias. Datos referidos hasta el 2004. Servicio de estadística de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias.

Tabla 6. Mapa de Cultivo por Islas en Hectáreas. Datos referidos hasta el 2004. Servicio de estadística de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias.

Tabla 7. Superficie de Cultivo en la Isla de Tenerife por Hectáreas. Datos referidos hasta el 2004. Servicio de estadística de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias.

Tabla 8. Entradas en estudio por cada una de las tres variedades y localidad de recolección de cada una de ellas.

Tabla 9. Composición de la solución de sales propuesta por Murasige & Skoog (1962).

Tabla 10. Porcentajes de contaminación y porcentajes de éxito observados en las dos entradas analizadas de cada variedad para el protocolo E1.

Tabla 11. Virus conocidos que afectan al cultivo de la papa. Basado en el sistema de Berger (1994). Tomado de Singh, 1999.

Tabla 12. Virus más importantes que afectan al cultivo de la papa

Tabla 13. Descripción de los cebadores empleados en los métodos de diagnóstico. Se describe ubicación del fragmento, así como el tamaño del fragmento esperado para cada virus

Tabla 14. Virus detectados mediante la técnica de DAS-ELISA en 6 de las muestras empleadas en los ensayos de IC-RT-PCR y de RT-PCR.

Tabla 15. Fragmentos seleccionados de cada uno de los gels de electroforesis referidos en el ANEXO IV. Se especifica además la pareja de cebadores empleada en cada caso y el tamaño aproximado de los fragmentos seleccionados.

Tabla 16. Resumen de los resultados obtenidos tras realizar los análisis de secuencias de los clones seleccionados

ANEXO FIGURAS

Fig. 1. Vasija periodo Chimu- Inca. (Hawkes, 1990).

Fig. 2. La papa en Perú hacia finales del siglo XVI tal y como recoge F.G. Poma de Ayala en “*Nueva Crónica y Buen Gobierno*”. (Rousselle *et al.*, 1999)

Fig. 3 Partes de una planta tipo de papa (Alonso, 1996).

Fig. 4. Partes de un tubérculo de papa. W.J. Hooker (1980).

Fig. 5. Tubérculos de la variedad Mora.

Fig.6. Tubérculos de la variedad Borralla.

Fig. 7. Tubérculos de la variedad Tormenta.

Fig. 8 Desecador conectado a la bomba de vacío.

Fig. 9. Esquema de los protocolos de esterilización E1 y E2 ensayados durante la fase de establecimiento del cultivo *in vitro*.

Fig. 10. Autoclave vertical Selecta Autotester (Mod. 437-G).

Fig. 11 Esquema de la composición de los medios de cultivo ensayados durante la fase de establecimiento del cultivo *in vitro*.

Fig. 12. Cabina de flujo laminar y utensilios de siembra.

Fig. 13. Condiciones de incubación de los cultivos en la cámara de crecimiento.

Fig. 14 Cámara de Cultivo.

Fig. 15. Porcentaje de contaminación para las tres variedades en estudio con los protocolos de esterilización E1 y E2

Fig.16 Comparación de los porcentajes de contaminación para el protocolo de esterilización E1 obtenidos en los ensayos de esterilización (1 y 2) para las variedades en estudio.

Fig.17 Representación de los valores medios de las variables número de nudos (n° nds), distancia entre nudos (Dy) y longitud total del explanto ($Long$) junto con sus desviaciones estándar para las tres variedades en cada uno de los medios ensayados durante la fase de establecimiento (Medio 1 y Medio 2).

Fig. 18. Representación gráfica de los valores medios de las variables número de nudos (n° nds), distancia entre nudos y longitud total del explanto junto con las desviaciones estándar en

los dos medios de cultivos ensayados durante la fase de establecimiento (Medio 1 y Medio 2) para cada una de las variedades en estudio.

Fig. 19 Representación gráfica de los valores medios de las variables número de nudos (n° nds), distancia entre nudos y longitud total del explanto junto con las desviaciones estándar para las entradas de cada una de las variedades en estudio durante la fase de establecimiento.

Fig. 20. (A) Cultivo en medio líquido bajo la condición de agitación (B) Cultivo en medio líquido bajo la condición estática.

Fig. 21. Representación de los valores medios de las variables número de nudos (n° nds), distancia entre nudos y longitud total del explanto (junto con las desviaciones estándar) para las tres variedades en cada uno de los medios de multiplicación ensayados durante la fase de multiplicación (Medio 1 y Medio 2)

Fig. 22. Representación gráfica de los valores medios de las variables número de nudos (n° nds), distancia entre nudos y longitud total del explanto junto con las desviaciones estándar para las tres variedades en cada una de las condiciones ensayadas (Agitación y no agitación) durante la fase de multiplicación.

Fig. 23. Comparación de la respuesta de cada una de las variedades en las dos condiciones de cultivo durante la fase de multiplicación (a) Agitación (B) No Agitación.

Fig. 24. Comparación de la respuesta de cada una de las variables en los cuatro medios de cultivo ensayados durante la fase de multiplicación.

Fig. 25 a) Áfido adulto, forma alada, *Myzus persicae*; b) Áfidos, Colonia áptera de *M. persicae*. (Fuente: Barbagallo *et al*; 1998).

Fig. 26. (a) Crecimiento erguido y clorosis. (b) Enrollado de foliolos (c) Enrollado en la base de los foliolos. Fuente: Trabajo campo del GBVa.

Fig.27. Fotografía a microscopio electrónico de las partículas isométricas de PLRV. (Fuente: <http://www.dpvweb.net>).

Fig. 28. Distintos grados de severidad causados por PVY. (a) Clorosis marginal y ligero fruncimiento. (b) Reducción foliar, clorosis marginal y moderado fruncimiento. (c) Fuerte fruncimiento y clorosis. (Fuente: Trabajo Campo GBVa).

Fig. 29. (a) Inmuno-electromicroscopía y decoración de partículas de PVY. (b) Cortes ultrafinos de tejidos infectados en los que pueden observarse claramente estructuras en molinete (Pinwheel) (Fuente: <http://www.dpvweb.net>).

Fig. 30. Mosaico causado por la infección con PVX. (Fuente: Internacional Potato Center, CIP 1996).

Fig.31.Fotografía microscopio electrónico de barrido de las partículas filamentosas de PVX. (Fuente: <http://www.dpvweb.net>).

Fig.32. Distintos grados de severidad en síntomas. (a) Mosaico ligero (b) Mosaico severo (c) Mosaico intenso acompañado de ondulado de las hojas y arrugado foliar. En todas está presente PVA, asociado con PVY y PVS. (Fuente: Trabajo Campo GBVa).

Fig. 33 .Fotografía al microscopio electrónico de partículas de PVA por la técnica de IEM y decoración.(Fuente: <http://www.dpvweb.net>).

Fig. 34 Sintomatología mostrada por la asociación de PVM, PVS y PVA. (a) Abarquillado, abullonado y ligera clorosis (b) Fuerte abarquillado, encrespamiento del margen de la hoja, abullonado. (c) Ondulación del margen de los folíolos (ligera deformación), fuerte abullonado, ligera clorosis (d) Abarquillado con ligera deformación del extremo foliar, marcado clorosis, ligera ondulación del margen foliar. Fuente: Trabajo campo GBVa.

Fig. 35. Fotografía microscopio electrónico de barrido de partículas de PVM. (Fuente: <http://www.dpvweb.net>).

Fig. 36 Síntomas causados por PVS. Abarquillado, clorosis y ligero fruncimiento Internervial. (a) Efectos en planta entera. (b) Detalle. (Fuente: Trabajo campo GBVa).

Fig. 37 Representación esquemática de la técnica de DAS-ELISA. (Fuente: Manual de capacitación: Técnicas en virología de plantas. Centro Internacional de la Papa (CIP), 1997)

Fig. 38. Incidencia de los virus PVX, PVY, PVA, PVM, PVS y PLRV expresada en porcentaje de incidencia sobre cada una de las entradas por variedad analizadas en el primer ensayo de campo. Entradas 56 y 37, Mora; entradas 33 y 18, Borralla; entradas 11 y 61, Torrenta.

Fig. 39. Incidencia de los virus PVX, PVY, PVA, PVM, PVS y PLRV expresada en porcentaje de incidencia sobre cada una de las entradas por variedad analizadas en el segundo ensayo de campo. Entradas 56 y 37, Mora; entradas 33 y 18, Borralla; entradas 11 y 61, Torrenta.

Fig. 40. Incidencia de los virus PVX, PVY, PVA, PVM, PVS y PLRV expresada en porcentaje de incidencia sobre cada una de las entradas por variedad analizadas en el invernadero. Entradas 56 y 37, Mora; entradas 33 y 18, Borralla; entradas 11 y 61, Torrenta.

Fig. 41. Detección de PVS mediante IC-RT-PCR empleando una temperatura de anillamiento de 55° C.

Fig. 42. Detección de PVX mediante IC-RT-PCR empleando una temperatura de anillamiento de 55° C.

Fig. 43. Detección de PVA mediante IC-RT-PCR empleando una temperatura de anillamiento de 55° C.

Fig. 44. Detección de PLRV mediante IC-RT-PCR empleando una temperatura de anillamiento de 55°C.

Fig. 45. Detección de PVS mediante IC-RT-PCR empleando una temperatura de anillamiento de 60° C.

Fig. 46. Detección de PVX mediante IC-RT-PCR empleando una temperatura de anillamiento de 60° C.

Fig. 47. Detección de PVA mediante IC-RT-PCR empleando una temperatura de anillamiento de 60°C.

Fig. 48. Detección de PLRV mediante IC-RT-PCR empleando una temperatura de anillamiento de 60° C.

Fig. 49. Detección de PVY mediante IC-RT-PCR empleando una temperatura de anillamiento de 60° C.

Fig. 50. Detección simultánea de PVX, PLRV, PVA, PVS y PVY mediante la técnica de IC-RT-PCR.

Fig. 51. Detección de PLRV mediante RT-PCR sobre extractos crudos de plantas.

Fig. 52. Detección de PVY mediante RT-PCR sobre extractos crudos de plantas.

Fig. 53. Detección de PVS mediante RT-PCR empleando la pareja de cebadores PVS₁ sobre extractos crudos de plantas.

Fig. 54. Detección simultánea de PVX, PVA, PLRV y PVS mediante RT-PCR múltiple sobre jugos de plantas en dos diluciones: 1:50 y 1:100.

Fig. 55 Representación esquemática del proceso seguido para la clonación y secuenciación de los fragmentos seleccionados

Fig. 56. Selección de colonias transformantes. En las líneas de los extremos se coloca el plásmido sin inserto y en las centrales las colonias evaluadas. Las líneas marcadas en rojo indican las colonias seleccionadas y potencialmente portadoras del inserto, y que quedan identificadas en el cuadro adjunto

Fig. 57. Selección de colonias transformantes. En las líneas de los extremos se coloca el plásmido sin inserto y en las centrales las colonias evaluadas. Las líneas marcadas en rojo indican las colonias seleccionadas y potencialmente portadoras del inserto, y que quedan identificadas en el cuadro adjunto.

Fig. 58. Selección de colonias transformantes. En las líneas de los extremos se coloca el plásmido sin inserto y en las centrales las colonias evaluadas. Las líneas marcadas en rojo indican las colonias seleccionadas y potencialmente portadoras del inserto, y que quedan identificadas en el cuadro adjunto.

Fig. 59. Selección de colonias transformantes. En las líneas de los extremos se coloca el plásmido sin inserto y en las centrales las colonias evaluadas. Las líneas marcadas en rojo indican las colonias seleccionadas y potencialmente portadoras del inserto, y que quedan identificadas en el cuadro adjunto.

Fig. 60. Selección de colonias transformantes. En las líneas de los extremos se coloca el plásmido sin inserto y en las centrales las colonias evaluadas. Las líneas marcadas en rojo indican las colonias seleccionadas y potencialmente portadoras del inserto, y que quedan identificadas en el cuadro adjunto.

Fig. 61. Selección de colonias transformantes. En las líneas de los extremos se coloca el plásmido sin inserto y en las centrales las colonias evaluadas. Las líneas marcadas en rojo indican las colonias seleccionadas y potencialmente portadoras del inserto, y que quedan identificadas en el cuadro adjunto.

Fig. 62. Digestión con Eco RI de los clones seleccionados. Cada par de líneas lleva el clon sin digerir y el clon digerido con la enzima de restricción. En el cuadro adjunto se especifican los clones para cada par de líneas. C+ (1) Control de planta infectada con PVY; C+ (2) Control de planta infectada con PVA. M: Marcador λ PstI

Fig. 63. Digestión con Eco RI de los clones seleccionados. Cada par de líneas lleva el clon sin digerir y el clon digerido con la enzima de restricción. En el cuadro adjunto se especifican los clones para cada par de líneas. C+ (1) Control de planta infectada con PVS y amplificada con los cebadores PVS1; C+ (2) Control de planta infectada con PVS y amplificada con los cebadores PVS2. M: Marcador λ PstI

Fig. 64. Digestión con Eco RI de los clones seleccionados. Cada par de líneas lleva el clon sin digerir y el clon digerido con la enzima de restricción. En el cuadro adjunto se especifican los clones para cada par de líneas y de color rojo los seleccionados para secuenciar.

Fig. 65. Digestión con Eco RI de los clones seleccionados. Cada par de líneas lleva el clon sin digerir y el clon digerido con la enzima de restricción. En el cuadro adjunto se especifican los clones para cada par de líneas.

Fig. 66. Digestión con Eco RI de los clones seleccionados. Cada par de líneas lleva el clon sin digerir y el clon digerido con la enzima de restricción. En el cuadro adjunto se especifican los clones para cada par de líneas. M: Marcador λ PstI.

Fig. 67. Representación gráfica de los valores medios obtenidos para las variables: porcentaje de desarrollo (%D), porcentaje de explantos no desarrollados y porcentaje de explantos contaminados (%C) durante el tratamiento de Termoterapia (34° C/16 h y 32° C/8 h) transcurridos 30 días.

Fig. 68. Representación gráfica de las variables: porcentaje de desarrollo (%D), el porcentaje de explantos no desarrollados (%NoD) y el porcentaje de explantos contaminados (%C) durante el ensayo de Cultivo de Meristemos.

Fig. 69. Distintas fases en el desarrollo de un meristemo a plántula de la variedad Borralla. Transcurridas dos y tres semanas de cultivo respectivamente (a y b). Transcurridos 6 semanas de cultivo (c y d).

Fig. 70. Representación gráfica de las variables: porcentajes de plantas sanas (%S) y porcentajes de plantas con virus (%C), tras la aplicar Termoterapia y Cultivo de Meristemos a las entradas de cada una de las variedades en estudio.

Fig. 71. Representación gráfica de la incidencia de virus en plantas no saneadas por entrada de la var. Borralla.

Fig. 72. Representación gráfica de la incidencia de virus en plantas no saneadas por entrada de la var. Mora.

Fig. 73. Representación gráfica de la incidencia de virus en plantas no saneadas por de la variedad Tormenta.

Fig. 74. Porcentaje de incidencia de virus en el total de plantas no saneadas

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

AGRIOS, G.N. (1990). Economic considerations. *In* Plant viruses. Vol. II. Pathology. Edited by C.L. Mandahar, CRC Press, Boca Raton, Fla pp 1-22.

AITEKEN-CHRISTIE, J.E (1991). Automation. In: Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H. (Eds) Micropropagation: Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. p. 363-388.

ALCHANATIS, V.; PELEG, K.; ZIV, M. (1994). Morphological control and mesuration of potato plantlets from tissue cultures for automated micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 36: 331-338.

ALONSO, F. (1996) El cultivo de la Patata. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

ÁLVAREZ, C. Y GIL, J. (1996). Inventario de las papas presentes en la Isla de Tenerife u de los nombres que en ella reciben. Hoja Divulgativa nº 5 del Servicio Insular de Agricultura del cabildo Insular de Tenerife, S/C de Tenerife.

ASHMORE, S.E. (1997). Status Report on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetic resource. IPGRI. Roma.

AVRAMEAS, S. (1969). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. *Immunochemistry* 6: 43-52.

BARBARA, D.J., MORTON, A. SPENCE, N.J., Y MILLER, A. (1995). Rapid differentiation of closely related isolates of two plant viruses by polymerase chain reaction an restriction fragment lenght polymorphism chain reaction analysis. *Journal Virological Methods*, 55: 121-131.

BARIANA, H.S., SHANNON, A.L., CHU, W.G. WATERHOUSE, P.M. (1994). Detection of five seedborne legum viruses in one sensitive multiplex polymerase cahin reaction test. *Phytopahology* 84: 1201-1205.

BARNETT, O.W. 1992. A summary of potyvirus taxonomy and definitions. Pgs 435-444 in : *Potyvirus Taxonomy*. O.W. Barnett, ed. Springer Verlag, New York.

BARTLES, R. (1971) Potato virus A CMI/AAB Description of plant Viruses nº 54.

BAULCOME, D.C. (1999). Fast forward genetics based on virus-induces gene silencing. *Current Opinion of Plant Biology* 2, 109-113.

BECZNER, L., HORVATH, H.; ROMHANYI, I.; FORSTER, H. 1984. Studies on the aetiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Research* 27: 339-352.

BEEEMSTER, A.B.R.; DE BOKX, J. A. (1987) Survey of properties and symptoms. En J.A. de Bokx & J.P.J. van der Want Eds. 1987, 84-113.

BENNETT, C.W. (1969). Seed transmission of plant viruses. *Virus Res.* 14: 221-261.

- BENSON, A.P. Y R.P. SINGH. (1964) Seed transmisión of potato spindle tuber virus in tomato by mechanical inoculation. *Am. Potato J.* 47: 75-80.
- BLANCO.URGOITIE, B.; SANCHEZ, F.; DOPAZO, J.; Y PONZ, F. 1996. A strain-type clustering of potato virus Y based on the genetic distance between isolates calculated by RFLPs analysis of the amplified coat protein gene. *Archives of Virology*. 141: 2425-2442.
- BLANCO-URGOITIE, B. SANCHEZ, F. PEREZ DE SAN ROMAN, C. DOPAZO, J., Y PONZ, F. 1998. Potato virus Y group C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strains. *Journal of General Virology* 79: 2037-2042.
- BODE, O. 1968. Die virosen des europäischen raumes. In *Pflanzliche Virologie*, Vol. II part 1: p. 31, ed. M. Klinkowski, 457 pp., BerlínÑ: Akademie-Verlag.
- BONGA, J. M. Y VON ADERKAS, P. (1992). *In Vitro Culture of Trees*. Ed. Kluwer Academic Publisher. Boston.
- BONGA, J.M. Y DURZAN D. J. (1982) *Tissue Culture in Forestry*. Martines Nijhoff/ Dr. W. Junk Publisher, The Netherlands.
- BOONHAM, N. HIMS, M. BARKER, I., Y SPENCE, N. 1999. Potato virus Y from petunia can cause symptoms of potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). *European Journal of Plant Pathology* 105, 617-621.
- BORJA, J.M. Y PONZ, F. 1992. An appraisal of different methods for the detection of the walnut strian of cherry leafroll virus, *Journal Virol. Methods*. 36, 73-83.
- BRANDES, J. 1964. Identifizierung von gestreckten pflanzenpathogenen viren auf homologischer grundlage. *Mitt. Biol. BundAnst. Ld.- u. Forstw.* 110: 130 pp.
- BRUNT, A.A. 1992. The general properties of potyvirus. *Arch. Virol. (Suppl. 5)*, 3-16.
- CAMBRA, M.; P. MORENO Y L. NAVARRO. (1979). Detección rápida del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) mediante la técnica inmunoenzimática ELISA-Sandwich. *Anales INIA Ser. Prot. Veg.* 12: 115-125.
- CASPER, R. (1977). Detection of potato leafroll virus in potato and in *Physalis floridiana* by enzyme-linked immunosorbent assa (ELISA). *Phytopathol. Z.* 96:97-107.
- CHAMBERLAIN, J.S. Y CHAMBERLAIN J.R. (1994). Optimization of multiplex PCRs. In: Mullis, K.B., Ferré, F. Gibbs, R.A. (Eds), *The Polymerase Chain Reaction*. Birkhauser, Boston, MA, pp. 38-46.
- CHAMBERLAIN, J.S., GIBBS, R.A., RAINER, J.E., NGUYEN, P.N. Y CASKEY, C.T. (1988). Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*. 16: 11141-11156.

- CHICO, R. J. (1986) Estudio comparativo de variedades locales de papa. Trabajo Fin de carrera, Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola, ULL.
- CHRISAN, D. (1994). Molecular diagnostic testing for determination of myeloid lineage in acute leukaemias. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 24: 355-363.
- CHYZANOWSKA, M. 1991. New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVY^N) found recently in Poland. *Potato research* 34, 179-182.
- CHYZANOWSKA, M. 1994. Differentiation of Potato virus Y (PVY) isolates. *Phytopathol. Pol.* 8, 15-20.
- CLARK, M.F. Y A.N. ADAMS. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- COLLINS, H.A Y EDWARDS, S. (1998) *Plant Cell Culture*. BIOS Scientific Publisher Limited.
- CONCI, V.C. Y NOME, S.F. (1991). Virus free garlic (*Allium sativum* L) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. *Journal of Phytopathology* 132, 186-192.
- D'AQUINO, L., DALMAY, T., BURGYAN, J., RAGOZZINO, A. Y SCALA, F. 1995. Host range and sequence analysis of an isolate of potato virus Y inducing vein necrosis in pepper. *Plant Disease*. 79: 1046-1050.
- DE BOKX, J.A. Y HUTTINGA, H. 1981. *Potato virus Y*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No 242. Egham, UK: International Mycological Institute.
- DEBABRATA, S.; CHANDRA, R. Y NAIK, P. (1997) Effect of inoculation density on potato micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 48: 63-68.
- DODDS J. Y ROBERTS, L.W (1982) *Experiments in Plant tissue Culture*. Cambridge University Press.
- DODDS, J.H. (1991). *In vitro methods for conservation in plant genetic resources*. Ed. Chapman & Hall. Londres.
- DOUGHERTY, W.G. Y CARRINGTON, J.C. 1988. Expression and function of potyviral gene products. *Annual Review of Phytopathology*, 26, 123-143.
- DOYLE, H. (1797). *Tratado sobre el Cultivo, Uso y Utilidades de las Patatas ó Papas, e Instrucción para su mejor propagación*. Imprenta Real .Madrid. 118 pp.
- EDWARDS, M.C. Y GIBBS, R.A. (1995). Multiplex PCR. *In PCR primer, laboratory manual*. Edited by C.W. Diefenbach and G.S. Dveksler. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Pp 157-171.
- ENGVALL, E. Y P. PERLMANN (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871-874.

ESPINOZA, N., LIZÁRRAGA, R., SIGUEÑAS, C., BUITRON, F. BRYAN, J., Y DODDS J.H. (1992) Tissue Culture: Micropropagation, Conservation and Export of Potato Germoplasm. CIP Research guide 1. Ed. International Potato Center. Lima, Perú.

EVANS, D.A.; SHARP, W.R., AMMIRATO, P.V. Y YAMADA, Y. (1983) Handwork of Plant Cell Culture. Volumen 1: Techniques for propagation and Breeding. Collier Macmillon Publisher. London.

FACCIOLI, G. Y COLOMBARINI, A. (1996). Correlation of potato virus S and virus M contents of potato meristem tips with the percentage of virus-free plantlets produced in vitro. Potato Research 39, 129-140.

FERNÁNDEZ VALIELA, M.V. (1995). Los virus Patógenos de las plantas y su control. 4^{ta} Edición. Vol. I. Ed. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Buenos Aires. Argentina. 701 pp.

FRIBOURG, C. E. (1980). Historia y distribución de virus de papa en América Latina. Fitopatología (Lima) 15 (2): 13-24.

FULTON, R.W. (1964) Transmission of plant viruses by grafting, dodder, seed and mechanical inoculation. En: M.K. Corbett y H.D. Sisler (eds). Plant virology. University of Florida Press, Gainesville, Fl, EEUU. P. 39-67.

GARNER, N. Y BLAKE, J. (1989) The induction and development of microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. Ann Bot. 63: 663-674.

GEORGE, E.F. (1993). Plant Propagation by Tissue Cultura. Part. 1 The Technology. 2^a ED. Exegetics Ltd., Edington, Wilts. England.

GEORGE, E.F. (1996). Plant propagation by tissue culture. Part 2, in practice Exegetics, Ltd. Edington, Wilts., England.

GIL, J. (1997). El cultivo tradicional de la papa en la Isla de Tenerife. Ed. Asociación Granate.

GIL, J.; Rodríguez, C y Hernández, E. (2000). Los cultivos tradicionales y su diversidad. Caracterización morfológica básica de las Papas Antiguas de la Isla de Tenerife. Publica Seminario permanente de Agricultura Ecológico (CSCA) Univ. de la Laguna.

GLAIS, L., KERLAN, C. Y ROBAGLIA, C. 2002. Variability and evolution of potato virus Y, the type species of the *Potyvirus* genus. In Plant Viruses as Molecular Pathogens, pp. 225-253. Edited by J. A. Khan & J. Dijkstra. New York: Haworth Press.

GOLINOWSKI, W.; GARBACZEWSKA, G. (1984) Process of necrosis formation in potato plants infected with potato leafroll virus. Zesz. Probl. Post. Nauk. Roln. , 298, 45-55.

GOLMIRZAI, A.M. Y PANTA, A. (1997). Tissue Culture for conservation of root and tuber crops. In. Conservation of Plant Genetic Resources In vitro. Vol 1: General Aspects. Eds. Science Publishers, Inc USA.

GOODWING, P. ; KIM Y. Y ADIRSAWATO, T. (1980) Propagation of potato by shoot-tip culture. 1. Shoot multiplication. Potato Research 23: 9-18.

GOULD, A.R. Y SYMONS R.H. (1983). A molecular biological approach to relationships among viruses. Annu. Rev. Phytopathol. 21: 179-199.

GREGORI, G. Y LORENZINI, R. (1974) Meristem-tip culture of potato plants as a method of improving productivity. Potato Research. 17: 24-33.

GUGERLI, P.; GEHRIGER, W. (1980) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of leafroll virus and potato virus Y in potato tubers after artificial break of dormancy. Potato Res. 23, 353-359.

HALL, J.S.; ADAMS, B. ; PERSON, T.J.; FRENCH, R.; LANE, L.C. Y JENSEN , S.G. 1998. Molecular cloning, sequencing and phylogenetic relationship of a new potyvirus: sugarcane streak mosaic virus, and a re-evaluation of the classification of the potyviridae. Mol. Phylogen. Evol. 10 (3), 323-332.

HAMMERSCHALG, F. (1982). Factors affecting establishment and growth of peach shoots *in vitro*. HortScience 17: 85-86.

HARRIS, K.F. (1977). An ingestion-egestion hypothesis of noncirculative virus transmission. En: Harris, K.F. y K. Maramorosch (eds). Aphis as virus vectors. Academic Press, Inc. Nueva York, EE.UU. p. 165-220.

HARRIS, R.E. y MASON, E.B.B. (1983). Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid media. Can. J. Plant Sci. 63: 311-316.

HARVEY, B.M.R.; BOWDEN, CG.; REAVEY, C. Y SELBY, C. (1994) Stimulation of *in vitro* root and shoot growth of potato by increasing sucrose concentration in the presence of fluridone, an inhibitor of abscisic acid synthesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 37: 271-276.

HAWKES, J. G. (1967) The history of the Potato (Master memorial Lecture, 1966). J.r. Hortic. Soc. 92; 207-224, 249-262, 288-302.

HAWKES, J. G. (1978) Byosystematics of the potato. En “ The potato crop”. P.M. Harris ed. London.

HAWKES, J. G. (1990) The Potato. Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. Londres, Belhaven Press, 259 pp.

HAWKES, J. G. Y FRANCISCO-ORTEGA, J. (1992). The Potato in Spain during the late 16th Century. Economic Botany 46 (1): 86-97.

HAWKES, J. G. Y FRANCISCO-ORTEGA, J. (1993) The Early History of the Potato in Europe. *Euphytica* 70: 1-7.

HENEGARIU, O, HEEREMA, N.A., DLOUHY, S.R. VAMCE, G.H. Y VOGT, P.H. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step by step protocol. *Biotchniques*, 23: 59-71.

HENSHAW, G.G.; O'HARA, J.F. Y WESTCOTT, R.J. (1980a). Tissue culture methods for the storage and utilization of potato germoplasm. In: *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists* (D.S. Ingram and J.P. Helgeson, eds.) pp. 71-76. Blackwell Scientific Pub., Oxford.

HENSHAW, G.G.; STAMP, J.A., Y WESTCOTT, R.J. (1980b). Tissue culture and germplasm storage. In: *Plant Cell Culture: Results and perspectives* (F. Sala, B. Parisi, R. Cella, y O. Ciferri, eds.). pp. 277-282. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

HOLLINGS, M.; BRUNT, A.A. (1981) Potyvirus group. CMI/AAB. Descrip. of plant viruses n° 245.

HOOKER, W. J. (1980) Compendio de enfermedades de la papa. Centro Internacional de la papa (CIP), Lima, Perú.

HOOKER, W. J. (1981). Compendium of potato diseases. The American Phytoathological Society, St. Paul, MN, EE.UU. 125 p.

HOWARD, H.M. Y WAINWRIGHT, J. 1960. Potato virus and paracrinkle. *Nature*, lond. 186: 993

HUISMAN, M.J., LINTHORST, H.J.M., BOL, J.F., Y CORNELISSEN B.J.C., 1988. The complete nucleotide sequence of potato virus X and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA-viruses. *J. Gen. Virol.* 69: 1789.

HUSSEY, G. Y STACEY, N. (1981). In vitro propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) *Annals of Botany* 48: 787-796.

HUTTINGA, H. (1996). Sensitivity of indexing procedures for viruses and. In: De Boer, S.H. Andrees, J.H. Tpmmerup, I.C. (Eds) *Pathogen Indexing Technologies. Advances in Botany Research Incorporating Advances in Plant Pathology*, Academy Press, New York, USA. Vol. 23 pp. 59-71.

IRIONDO, J.M. Y PITA, J.M. (1991). Bancos de cultivo in vitro. *Agricultura* n°: 714-715.

IZQUIERDO, J. CIAMPÍ, L. Y DE GARCÍA (1995). *Biotecnología Aplicable*. Ed. FAO-Chile.

JANSEN, R.W.; SIEGL, G. Y LEMON, S.M. 1990. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2867-2871.

- JOHN, M.E. (1992). An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic acids Research*. 20: 2381.
- JONES, R.A. C. 1990. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. *Annals of Applied Biology* 117, 93-105.
- JONES, T.D.; BUCK, K. W. Y PLUMB, R.T. 1991. the detection of beet western yellows virus and beet mild yellowing virus in crop plants using the polymerase Chain reaction. *Journal Virol Methods*. 35, 287-296.
- KEESE, P.; MARTIN, R.R.; KAWCHUCK, L.M.; WATERHOUSE, P.M. Y GERLACH, W. L. 1990. nucleotide sequence of an Australian and Canadian isolate of potato leafroll luteovirus and their relationships with two European isolates. *J. Gen. Virol*. 71: 719-724
- KOJIMA, M., SHIKATA, E., SUGAWARA, M. Y MURYAMA, D. 1969. Purification and electron microscopy of potato leafroll virus. *Virology*. 39: 162.
- KOONJUL, P.K., BRANDT, W.F. FARRANT, J.M. Y LINDSEY,G.G. (1999). Inclusion of polyvinylpyrrolidone in polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucleic Acids Res*. 27: 915-916.
- KORSCHINECK, I.; HIMMLER, G.; SAGL, R.; STEINKELLNER, H.; Y KATINGER, H. 1991. A PCR membrane spot assay the detection of plum pox virus RNA in bark of infected trees. *J. Virol. Methods*. 31, 139-146.
- KUO, C.G. (1991). Conservation and distribution of sweet potato germplasm. En: *In vitro Methods for conservation of plant genetic resources*. J.H. Dodds (ed.). Chapman & Hall. Londres. pp:123-150.
- LANGEVELD, S.A.; DORE, J.M. ; MEMELINK, J. DERKS, A.F.L.M.; VAN DER VULGT C.I.M.; AASJES C.J. Y BOL, J.F. 1991. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *J.Gen. Virol*. 72, 1531- 1541.
- LEROMANCE, M., NEDELLEC, M. 1997. Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of the potato tuber necrotic ring disease (PTNRD). *Plant Pathology* 46, 104- 111.
- LEVIN, R Y VASIL, K. (1989). Progress in reducing the cost of micropropagation. *IAPTC Newsletter*, 59, 2-12.
- LIZÁRRAGA, R.; HUAMÁN, Z. Y DODDS, J.H. (1989). In vitro conservation of potato germoplasm at the International Potato Center. *American Potato Journal*. 66: 253-276.
- LIZÁRRAGA, R.; PANTA, A.; ESPINOZA, N. y DODDS, J.H. (1992) *Tissue Culture of Ipomoea Batatas: Micropropagation and Maintenance*. CIP. Reserach guide 32 International Potato (CIP) Lima. Perú.

LIZÁRRAGA, R.; PANTA, A.; JAYASHINGE, U. Y DODDS, J.H. 1991. Tissue culture for elimination of pathogens. CIP Reserach Guide 3. International Potato Center (CIP), Lima, Perú.

LOBO CABRERA, M. (1988). El Comercio canario europeo bajo Felipe II. Ed. Viseconsejería de Cultura y Deportes del Gobierno de Canarias y Secretaría general do Turismo, Cultura e imicraçao del Governó Regional da madeira. Funchal. Madeira 241 pp.

LÓPEZ LINAGE Y COL. (1991) De papa a patata. La difusión española del tubérculo andino. ICI y MAPA.

LOUGHNANE, J.B. Y P.A. MURPHY. (1938). Dissemination of potato viruses X and F by leaf contact. Sci. Proc. R. Dublin Soc. 22:1-15.

LWOFF, A. R.W. HORNE Y P. TOURNIER. (1962) A system of viruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27: 51-55.

MACÍAS, M. (1989). La papa en la economía canaria. Aproximación histórica. Cuadernos Phytoma España, 3: 4-6.

MANDAHAR, C.L. (1990). Virus transmission. *In*: Plant viruses. Vol. II Pathology. Edited by C.L. Mandahar. C:R:C Press, Boca raton, Fla. Pp. 205-253.

MARGARA, J. (1988) Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ed. Mundi-Prensa.

MARRERO, A. (1992) Cultivos tradicionales de papas en Canarias y su biodiversidad. Proceedings of the Ethnobotanical Congreso, Córdoba. En prensa.

MARRERO, A. (1992) Cultivos tradicionales de papas en Canarias y su biodiversidad. Proceedings of the Ethnobotanical Congreso, Córdoba. En prensa.

MATAUŠEK, J. SCHUBERT, J. DIDIC, Y P. PTÁÈEK, J. 2000. A broad variability of potato S carlavirus (pvs) reveled by analysis of rt-pcr amplified virus sequences. Can. J. Plant Pathol. 22.

MATTHEWS, R.E.F. 1991. Plant Virology. 3 ed. Academic Press Inc., San Diego, California.

MATTHEWS, R.F. (1979) Classification and nomenclature of viruses. Third report of the International Commitee on Taxonomy of Viruses. Intervirology 12: 131-296.

MAULE, A.J., HALL, A. AND DONSON, J. (1983). The application of spot hybridization to the detection of DNA and RNA viruses in plant tissue. Journal of Virological Methods, 6: 215-224.

MAYO, M.A.; ROBINSON, D.J. ; JOLLY, C.A. Y HYMANN, L. 1989. Nucleotide sequence of potato leafroll virus RNA. J. Gen. Virol. 70: 1037-1051.

- McDONALD, J.G., KRISTJANSSON, G.T., SINGH, R.P., ELLIS, P.J. AND McNAB, W.B. 1994. Consecutive ELISA screening with monoclonal antibodies to detect potato virus Y^N. *American Potato Journal*. 71: 175-183.
- MEHARD, M.; LAPIERRE, H. MAURY, Y. (1978). Le virus de l'enroulement de la pomme de terre : purification, détection sérologique et dosage dans la plante. *C.R. Acad. Sci. Paris, D*. 286, 1179-1182.
- MELLOR, F.C. Y STACE-SMITH, R. (1977). Virus free potatoes by tissue culture. In: *Applied & fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. J Reinert & Y.P.S. Baja (Eds), Springer-Verlag, Berlin. Pp. 615-637.
- MOREL, G. Y MULLER, J.F. 1964. La Cultura in vitro du meristeme apical de la pomme de terre. *C.R. Acad. Sci.* 258: 5250.
- MOREL, G.M. (1960). Producing virus-free *Cymbidium*. *Am. Orchid Soc. Bull.* 29: 495-497.
- MOREL, G.M. (1965). Clonal propagation of orchids by meristem culture. *Cymbidium Soc. Nwes.* 20: 3-11.
- MOREL, G.M. y MARTIN, C. (1952). Guérison de dhalias atteints d'une maladie á virus. *C :R : Acad. Sci.* 235 : 1324-1325.
- MOREL, G.M. y MARTIN, C. (1955). Curing potatoes infected with virus. *C.R. Acad. Agric. France.* 41: 472-475.
- MOROZOV, S.YU., LUKASHEWA, I., CHERNOW, B.K., SKRYABIN K.G. Y ATABEKOV, J.G. 1987. Nucleotide sequence of the open reading frames adjacent to the coat protein cistron in potato virus X genome. *FEBS Lett.* 213: 438-442.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.; SHARF, S.; SAIKI, R.K.; HORN, G.T. Y ERLICH, H. 1986. *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* 51, 263-272.
- MURASIGHE, T, y SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NATTI, J.J., KIRKPATRICK, H.C. Y ROSS, A.F. 1953. Host range of potato, leafroll virus. *Am. Potato Journal.* 30: 55-64.
- NEMCHINOV, L. HADIDI, A. CANDRESSE, Y. FOSTER, J.A., Y VERDEREVSKAYA, T. (1995). Sensitive detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* from infected apple or peach tissue usin RT-PCR, IC-RT-PCR or multiplex IC-RT-PCR. *Acta Hortic. (Wageningen)*, 386: 51-62.
- NICOLAS, O. Y LALIBERTÉ, J.F. 1991. The use of PCR for cloning of large cDNA fragments of turnip mosaic potyvirus. *J. Virol. Methods.* 32, 57-66.

NIE, X., Y SINGH R.P. (2000). Detection of multiple potato virus using an oligo (dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 86: 179-185.

NIE, X., Y SINGH, R.P. (2001). A novel usage of random primers for multiplex Rt-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves and tubers. *Journal of Virological Methods* 91: 37-49.

NOLASCO, G.; DE BLAS, C.; TORRES, V. Y PONZ, F. (1993). A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant virases and subvirla pathogens. *Journal of Virological Methods*. 45: 201-218.

NOVAK, F. J. ZADINA, J., HOROCKAVA, V. Y MASKOVA, I. (1980). The effect of growth regulators on meristem tip development and in vitro mulitplication of *Solanum tuberosum* L. *Plants. Potato Res.* 23: 155-166.

NOZERAN, R.; BANCILHON-ROSSIGNOL, L. Y GRENANS, S. (1977) Nouvelles possibilities d'obtertion et a multiplication rapide de clones sains de pome de terre (*Solanum tuberosum*, L.) C.R. Acad. Sci. Paris 285, 37-40.

OHSHIMA, K., SAKO, K., HIRAISHI, C., NAKAGAWA, A., MATSUO, K. OGAWA, T., SHIKATA, E., Y SAKO, N. 2000. Potato tuber necrotic ringspot disease occurring in Japan: its association with Potato virus Y necrotic strain. *Plant Disease* 84, 1109-1115.

OWENS, R. A. Y T. O. DIENER. (1981). Sensitive and rapad diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. *Science* 213: 670-672.

PARDO, J. Y LÓPEZ, M. L. (1993). Las primeras noticias sobre plantas americanas en las relaciones de viajes y crónicas de indias (1943-1553). Instituto de Estudios. Documentales e Históricos sobre la Ciencia. Valencia.

PENNAZIO, S. y REDOLFI, P. (1973). Factors affecting culture *in vitro* of potato meristem tip. *Potato Reserch.* 16: 20-29.

PENNAZIO, S. Y VECCHIATI, M. (1976). Effects of naphthalenacetic acid on potato meristem tip development. *Potato Research.* 19: 257-261.

PÉREZ FRANCÉS, J.F. 2004. Cultivo in vitro de plantas y sus aplicaciones en agricultura. Ed: ARTE Comunicación Visula S.L. 405 pp.

PETERS, D Y JONES, R.A.C. 1981. Potato leafroll virus. *In* : Compendium of potato diseases. *Edited by* W. J. Hooker. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn. Pp 68-70.

PETERS, D. 1967. The purification of potato leafroll virus from its vector *Myzus persicae*. *Virology* 31: 46-54

PIERIK, R. L. M. 1990 Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa

PURCIFULL Y EDWARDSON. 1981. Potexviruses. In Hand book of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis, p. 628, ed. E. Kurstak, Amsterdaam: elsevier /north-Hollan.

RAVELO, M. 2002. Micropropagación de las variedades canarias de papa: Negrita herreña y Mora. Tesis de Licenciatura.

RAVNIKAR, M.; PLAPER, I.; UCMAN, R. y ZEL, J. (1994). Establishment of an efficient method for virus elimination in meristem cultures and regeneration of high quality plants. In: IPBA, Rogla. December 5-7. pp: 97-102.

RIECHMANN, J.L., LAÍN, S. Y GARCÍA, J.A. 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. Journal of General Virology 73, 1-16.

ROBAGLIA, C.; DURAND, -TARDIF, M.; TRONCHET, M. BOUDAZING, G.; ASTIER-MANIFACIER, S.; Y CASSE-DELBART, F. (1989) Nucleotide sequence of potato virus Y (N starin) genomic RNA. J. Gen. Virol.; 70; 935-947.

ROBERTSON, N.L.; FRENCH, R. Y GRAY, S. 1991. Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteovirus. J. Gen. Virol. 72, 1473- 1477.

ROCA, W.N., ESPINOZA, N.O., ROCA, M.R. Y BRYAN, J.E. (1978). A tissue culture method for rapid propagation of potatoes. Am. Potato J. 55: 691-705.

RODRÍGUEZ BRITO, W. (1986). La agricultura de exportación en Canarias (1940-1980). Ed. Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca del gobierno de Canarias. S/C de Tenerife 571 pp.

RODRÍGUEZ BRITO, W. (1992). Canarias, agricultura y ecología. Centro de la Cultura Popular Canaria, La Laguna.

ROUSSELLE, P.; ROBERT, Y. Y COL. (1999). La patata. Ed. Minda-Prensa. Madrid.

ROWHANI, A., CHAY, C., GOLINO, D.A., Y FALK, B.W. (1993). Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of *Grapevine fanleaf virus* in grapevine tissue. Phytopathology, 83: 749-753.

SAADE, M., APARICIO, F., SÁNCHEZ-NAVARRO, J.A., HERRANZ, M.C., MYRTA, A., DITERLIZZINI, B. Y PALLAS, V. (2000). Simultaneous detection of three ilarviruses affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridization and multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. Phytopathology. 90: 1330-1336.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H. A. Y ARNHEIM N. 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230, 487-491.

SALAMAN, R. N. (1949) The History and Social influence of the potato (nueva edición por J.G. Hawkes, 1985). Cambridge University Press, 685 pp.

- SALAZAR, L. F. 1971. Una raza del virus "Y" de la papa en Perú. *Fitopatología* 4, 26-33.
- SALAZAR, L. F. 1979. Aplicación de la técnica serológica con conjugados enzimáticos (ELISA) para diagnosticar virus de la papa. *Fitopatología*. 14: 1-9
- SALAZAR, L. F. (1995) Los virus de la papa y su control. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 226 p.
- SÁNCHEZ- VIZCAÍNO, J.M. Y M. CAMBRA. (1981). Técnicas inmunoenzimáticas en patología animal y vegetal. Min. Agric. Inst. Nac. Inv. Agrarias, Madrid, España. 57 p.
- SASSON, A. (1993). *Biotechnologies in developing countries: present and futures*. Vol. 1. UNESCO publ. Paris.
- SHARMAN, M; THOMAS, J. E. Y DIETZGEN R.G. (2000). Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection of viruses of banana. *Journal Virological Methods* 89: 75-88.
- SHUKLA, D.D. 1994. The Potyviridae. :D. Shukla, C.W. Ward and A.A. Brunt, eds. C.A.B. International, Orion, England.
- SHUKLA, D.D. Y WARD C.W. 1989. Identification and classification of potyviruses on the bases of coat protein sequence data and serology. *Archives of Virology* 106, 171-200.
- SHUKLA, D.D. Y WARD C.W. 1998. Amino acid sequence homology of coat protein as a basis fo identification and classification of the potyvirus group. *Journal of General Virology* 69, 2703-2710.
- SIGVAL, R. 1984. the relative efficiency of some aphid species as vectors of potato virus Y. *Potato Research* 27, 285-290.
- SINGH, M Y SINGH R.P. (1996). Factors affecting detection of PVY in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction and nucleic acid spot hybridization. *Journal of Virological Methods* 60: 47-57.
- SINGH, M.;SINGH, R.P. Y MOORE, L.1999. Evaluation of NASH and RT_PCR for the detection of PVY in dormant tubers and its comparison with visual symptoms and ELISA in plants. *American Journal of Potato Research*, 75: 61-66.
- SINGH, R. P.; BOUCHER, A.; SOMRVILLE, T. H. Y COLEMAN S. (1996). Detection of potato viruses A, M, S, X, Y and leafroll and potato spindle tuber viroid from tissue culture plantlets using single leaf discs. *America Potato Journal*. Vol 73: 101-112.
- SINGH, R. P.; KURZ, J. Y BOITEAU, G. (1996) Detection of stylet-borne and circulative potato viruses in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 59: 189-196.

- SINGH, R.P. (1989). Plant Viroids: a biochemical novelty. *In: Plant viruses. Vol. I. Structure and replication Edited by C.L. Mandahar. CRC Press, Boca Raton, Fla, pp. 260-288.*
- SINGH, R.P. (1998). Reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plants and aphids. *Journal of virological Methods. 74: 125-138.*
- SINGH, R.P. (1999). Development of the molecular methods for potato virus and viroid detection and prevention. *Genome 42: 592-604.*
- SINGH, R.P. 1992. Incidence of the tobacco venial necrotic strain of potato virus Y (PVY^N) in Canada in 1990 and 1991 and scientific basis for eradication of the disease. *Canadian Plant Disease Surv. 72: 113-119.*
- SINGH, R.P. Y SINGH, M. 1998. Specific detection of potato virus A in dormant tubers by reverse transcription polymerase reaction. *Plant. Dis. 82, 230-234.*
- SINGH, R.P., SINGH, M. Y MCDONALD, J.G. (1998b). Screening by a 3-primer PCR of North American PVY^N isolates for European-type members of the tuber necrosis-inducing PVY^{NTN} subgroup. *Canadian Journal Plant Pathology. 20: 227-233.*
- SINGH, R.P., XIANZHOU, N. Y SINGH M. (2000). Duplex RT-PCR: reagent concentrations at reverse transcription stage affect the PCR performance. *Journal of Virological Methods. 68: 121-129.*
- SINGH, R.P.; KURZ, J.; BOITEAU, G.; Y BERNAND, G. 1995. Detection of leafroll virus in single aphids by reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. *J.Virol Methods. 55, 133-143.*
- SINGH, R.P.; SINGH, M. Y KING, R. R. (1998). Use of citric acid for neutralizing polymerase chain reaction inhibition by chlorogenic acid in potato extracts. *Journal of Virological Methods. 74: 231-235.*
- SKRYABIN, K.G.; KRAEV, A.S.; MOROZOV, S. YU.; ROZANOV, M.N.; CHERNOV, B.K.; LUKASHEVA, L.I.; Y ATABEKOV, J.G. 1988. The nucleotide sequences of potato virus X RNA. *Nucleic Acid Res. 16, 10929, 10930.*
- SLACK, S.A Y SINGH, R.P. (1998). Control of viruse affecting potatoes through seed potato certification programs *In: Plant virus disease control. Edited by A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minn. Pp. 249-260.*
- SONNENBERG, N., SHATKIN, A.J., RICCARDI, R.P., RUBIN M., Y GOODMAN, R.M. 1978. Analysis of terminal structures of RNA from potato virus X. *Nucleic Acids Res. 5: 2501 pp. 25-44*
- SOUZA-DIAS, J.A.C.; RUSSO, P. BETTI, J.A., MILLER, L. Y SLACK, S.A. 1999. Simplified Extraction Method for ELISA and PCR Detection of Potato Leafroll Luteovirus primary infection in dormant tubers. *Amer. Journal of Potato res. 76: 209-213.*

- STEGWEE, D. (1960). Further investigations on the relation between *Myzus persicae* and the potato leaf-roll virus. Proc. Conf. Potato Virus Dis., Braunschweig. p. 106-110.
- TAMADA, T. ; HARRISON, B.D. ; Y ROBERTS, I.M. (1984) Variation among British isolates of potato leafroll virus. Ann. Appl. Biol.; 104; 107-116.
- TAPIA, M. E. (1993) Semillas andinas. El banco de oro. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Lima (CONCYTEC).
- TORDO V.M.J., CHACHULSKA, A.M. FAKHFAKH, H. LEROMANCER, M., ROBAGLIA, C., Y ASTIER-MANIFACIER, S. 1995. Sequence polymorphism in the 5' NTR and in the P1 coding region of Potato Virus Y genomic RNA. Journal of General Virology 76, 939-949.
- VAN DEN HEUVEL, J.F.J.M., VAN DER VLUGT R.A.A., VERBEEK, M., DEHAAN, P.T., Y HUTTINGA, H. 1994. Characteristics of a resistance breaking isolate of Potato virus Y causing potato tuber necrotic ringspot disease. European Journal of Plant Pathology 100: 347- 356.
- VAN DER VLUGT, R.A.A., LEUNISSEN, J., Y GOLDBACH, R. 1993. Taxonomic relationships between distinct Potato virus Y isolates based on detailed comparisons of the viral coat protein and 3' non-translated regions. Archives of Virology 131, 361-375.
- VAN DER WILK, F.; HUISMAN, M.J.; CORNELISSEN, B.J.C.; HUTTINGA, H. Y GOLDBACH, R. 1989. Nucleotide sequence and organization of potato leafroll virus genomic RNA. FEBS lett. 245:51-56.
- VAN KAMMEN, A. (1997). Virus-induced gene silencing in infected and transgenic plants. Trends in Plant Science 2, 409-411.
- VARVERI, C. 2000. Potato Y Potyvirus detection by Immunological and Molecular Techniques in Plants and Aphids. Phytoparasitica 28(29): 141-148.
- VASIL, K. (1994/0). Automation of plant propagation. Plant Cell, Tissue and Organ culture. 39, 105-108.
- VIERA Y CLAVIJO, J. (1942). Diccionario de Historia Natural de las Islas Canarias. Ed. Excmo. Mancomunidad de Cabildos de La Palma. España. 472 pp.
- VOLLER, A.; D.E. BIDWELL Y A. BARTLETT (1976). Enzyme immunoassay in diagnostic medicine: Theory and practice. Bull. World Health Org. 53: 5-65.
- VOLLER, A.; D.E. BIDWELL; G. HULDT Y E. ENGVALL (1974). A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. Bull. World Health org. 51: 209-211.
- VUNSH, R., ROSNER, A. Y STEIN, A. 1990. The use of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of yellow mosaic virus in gladiolus. Ann. Appl. Biol. 117, 561-569.

- WAH, Y.F.W.C. Y SYMONS R.H. 1997. A high sensitivity RT-PCR assay for the diagnosis of grapevines viroids in field and tissue culture samples. *Journal Virological Methods*, 63: 57-69.
- WALKEY, D.G.A., FREEMAN, G.H., Inactivation of cucumber mosaic virus in cultured tissues of *Nicotiana rustica* by diurnal alternating periods of high and low temperature, *Ann. Appl. Biol.* **87** (1977) 375-382.
- WATSON, M.A. 1972 Transmission of plant viruses by aphids. En: Kado, C.I. y H.O. Agrawal (eds). *Principles and techniques in plant virology*. Van Nostrand Reinhold Co., Nueva York, EE.UU. p 131-167.
- WEBB, R.E., LARSON, R.H., Y WALKER, J.C. 1951. Naturally occurring strains of the potato leaf-roll. *Amer. Potato J.* 28: 667-71
- WEBB, R.E.; LARSON, R.H. Y WALKER, J.C. 1952. Relationships of potato leaf roll virus strain. *Univ. Wisconsin Res. Bull.* 178: 40.
- WETTER, C. 1971 Potato virus S. CMI/AAB. Description. of plant viruses, nº 60
- WETZEL, T. CANDRESSE, T. RAVELONANDRO, M. Y DUNEZ, J. 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *J. Virol. Methods.* 33, 355-365.
- WETZEL, T.; CANDRESSE, T., MACQUARIRE, G. RAVELONANDRO, M. Y DUNEZ, J. (1992). A highly sensitive polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *J. Virol Methods* 39: 27-37.
- WITHERS, L.A. (1985). Long-term storage of in vitro cultures. En: *In Vitro techniques, propagation and long-term storage*. A. Schafer. Menuhr (Ed.) Martinus Nijhoff y Dr. Junk Publ. Pp:137-148.
- ZIV, M. RONEN, G. Y RAVIV, M. (1996). Disposable presterilized bioreactors for large-scale micropropagation of plants. *In vitro cellular & developmental biology*.
- ZOBAYED, S. ARMSTRONG, J. Y ARMSTRONG, W. (2001) Micropropagation of potato: Evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization. *Annals of Botany* 85: 53-59.
- ZUBELDÍA, A., LÓPEZ, G. Y SAÑUDO, A. (1955). Estudio, descripción y clasificación de un grupo de variedades primitivas de patatas cultivadas en las Islas Canarias. *Boletín del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas*, nº 33. Cuaderno 225. Madrid.