



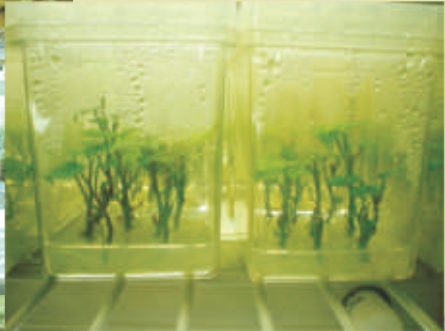
PERÚ

Ministerio
de Agricultura

Instituto Nacional
de Innovación Agraria



MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS DE CAMOTE (*Ipomoea batatas* L.) LIBRES DE VIRUS



MINISTERIO DE AGRICULTURA
INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA - INIA

**MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS
DE CAMOTE (*Ipomoea batatas* L.)
LIBRES DE VIRUS**

**Ing. M.Sc. Julio A. Olivera Soto
Aux. Lab. Filomena Marcelo C.**

© INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA - INIA

Diagramación e Impresión:

Programa Nacional de Medios y Comunicación Técnica

Primera Edición:

Setiembre, 2010

Tiraje : 500 ejemplares

Av. La Molina N° 1981, Lima 12 Casilla N° 2791 - Lima 1

Telefax: 3495631 / 3492600 - Anexo 248

Prohibida la reproducción total o parcial sin autorización

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N°: 2010-11688

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	5
2. MICROPROPAGACIÓN	6
2.1 Introducción del material a condiciones <i>in vitro</i>	6
2.2 Desinfección de explantes	6
2.3 Medio de cultivo	7
2.4 Fase de inicio	8
2.5 Fase de multiplicación	10
2.6 Multiplicación en sistema de inmersión temporal	11
2.7 Desarrollo de sistemas de inmersión temporal	13
2.8 Funcionamiento del sistema RITA®	15
2.9 Ventajas del uso del sistema de inmersión temporal RITA®	18
2.10 Uso de contenedores alternativos	21
3. DESARROLLO EN CONDICIONES DE MEDIO AMBIENTE	22
3.1 Aclimatación	22
3.2 Traslado a invernadero	23
3.3 Virosis del camote y detección de virus	25
ANEXOS	
Anexo 1.	
Secuencia de técnica NCM-Elisa para detección de virus	29
Anexo 2.	
Volumen de soluciones stock para la preparación de medio de cultivo MS	30
4. BIBLIOGRAFÍA	31

Foto 18. Toma de muestras de discos de hojas de camote.

1. INTRODUCCIÓN

El camote (*ipomoea batatas*) es una especie perteneciente a la familia de las convolvuláceas, es una planta herbácea y perenne, sin embargo es cultivada como una planta anual usando raíces reservantes o esquejes para su propagación vegetativa. Debido al sistema de propagación transmite enfermedades causadas por virus reduciendo los rendimientos y calidad del producto cosechado. En el Perú la alta incidencia de enfermedades virales en la costa, afectaron considerablemente el rendimiento y la disponibilidad de semilla (esquejes) de calidad. Además, la agresividad de las plagas permitió la transmisión acelerada de virus por estos vectores, como el caso de la mosca blanca.

Cuando el agricultor emplea esquejes provenientes de plantaciones contaminadas con virus, el rendimiento disminuye considerablemente y los esquejes no sirven como material de propagación para una nueva campaña. La forma convencional de controlar las enfermedades en el campo no resuelve este problema. Por tanto la micropropagación de plantas libres de virus en laboratorio es una alternativa para la propagación masiva de camote, en forma rápida ya que permite disponer de semilla en un período corto para distribución a agricultores. La Estación Experimental Agraria Donoso - Huaral en el laboratorio de biotecnología viene propagando durante varios años plantas de camote libres de virus de diferentes cultivares, con la finalidad de brindar esquejes (semilla vegetativa) de calidad a los agricultores que se dedican a este cultivo.

La presente publicación contribuye al conocimiento en esta área con el resultado de los trabajos de investigación realizados en el laboratorio de biotecnología de la Estación Experimental Agraria Donoso - Huaral del Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA, en el cultivo de camote, así como los resultados de las capacitaciones en el Centro Internacional de la Papa (CIP) y en el Centro de Investigación en Agricultura Tropical (CIAT), esta última en el marco del Sub-Proyecto: "Desarrollo de nuevas variedades de camote para diferentes usos," agradeciendo al Ing. Juan Pablo Molina, investigador especialista en camote del INIA, por su apoyo en este trabajo.

2. MICROPROPAGACIÓN

2.1 Introducción del material a condiciones *in vitro*

Los explantes (porción de la planta que se utiliza para la introducción *in vitro*), se toman de plantas provenientes de invernadero o casa de malla, estas plantas deben tener las mejores condiciones fitosanitarias y deben ser de mayor vigor, se toma la porción apical del tallo quitando las hojas, se les da un tratamiento con un acaricida de amplio espectro a los brotes de 2 a 3 cm de longitud por 10 minutos para eliminar ácaros en cualquier fase de desarrollo, luego colocarlos en un vaso o en una botella, en ambos casos bien limpios y con tapa hasta el momento de proceder a la desinfección en el laboratorio.

Para disminuir considerablemente la posibilidad de presencia de virus en los meristemos aislados se debe dar un tratamiento de termoterapia a las plantas que van a ser utilizadas como donantes. Para esto se debe colocar las plantas durante un mes en una cámara de termoterapia a 38 °C por 16 horas y a 32 °C por 8 horas, bajo constante iluminación, después del tratamiento de termoterapia debe usarse de preferencia los meristemos apicales.

2.2 Desinfección de explantes

En el laboratorio los brotes deben ser lavados con abundante agua de caño y luego 3 veces con agua destilada; en la cámara de flujo laminar son sumergidas las yemas en alcohol al 96% durante pocos segundos, para facilitar la penetración del desinfectante. La desinfección se realiza con hipoclorito de sodio al 2%, durante 12 minutos, también se puede agregar Tween-20, como agente dispersante, después es eliminado el hipoclorito de sodio y enjuagado 3 veces con agua destilada estéril para eliminar todo residuo.

En caso que se presente fenolización (oxidación del tejido) se prepara una solución antioxidante de ácido ascórbico (50 mg en 250 ml de agua destilada), la fenolización del tejido, se produce a causa de la segregación de alta concentración de polifenoles en la superficie afectada, que la planta produce como respuesta al daño, y que se puede atenuar con el uso de ácido ascórbico, ácido cítrico o una combinación de ambos. Las yemas se introducen en la solución antioxidante y se mantienen en ella hasta el momento de la disección del meristema.

La solución antioxidante no debe ser esterilizada en autoclave, para la esterilización de la misma se utiliza un filtro de 0,22 (micrometros) de porosidad, que puede ser un filtro descartable estéril enroscable a una jeringa de vidrio o un sistema de esterilización por filtración que usa membranas de la misma porosidad de los filtros descartables pero de mayor diámetro, por lo que puede filtrar mayor volumen en menor tiempo.

2.3 Medio de cultivo

Se emplea el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) (ver anexo 2), además de las sales orgánicas e inorgánicas que se utilizan para la preparación del medio de cultivo, se emplea sacarosa ó azúcar blanca refinada al 3 % y se ajusta el pH en 5,7, utilizando HCl 1,0 N para disminuir el pH ó NaOH 1,0 N para elevar el pH; luego el medio se calienta a fuego lento para disolver el agar – agar, que se agrega como agente solidificante al 0,8 %, finalmente después de retirar el medio de cultivo del fuego y dejar enfriar un poco se agrega los reguladores de crecimiento. Posteriormente proceder a dispensar en los contenedores respectivos ya sea con dispensador o en forma manual y luego se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 121°C de temperatura y 1,2 kg/cm² de presión. Para el medio de inicio se utiliza tubos de prueba de 100 x 12 mm ó 125 x 15 mm para la siembra de meristemas, y los subcultivos se pueden hacer en tubos de 100 x 25 mm.

2.4 Fase de inicio

La disección o corte del meristema apical se efectúa con ayuda de un microscopio estereoscópico, primero se eliminan los primordios foliares (foto 1), hasta llegar al último par de primordios (fotos 2 y 3) que cubren el domo meristemático o apical (gráfico 1). El meristema es un conjunto de células somáticas no diferenciadas que se encuentra en constante división celular, debido a que los virus fácilmente se movilizan por el tejido vascular, es importante hacer la disección solamente del tejido no diferenciado.



Foto 1. Yemas apicales de camote con eliminación de 1, 2 y 3 pares de primordios



Foto 2. Yema de camote con 3 primordios foliares.

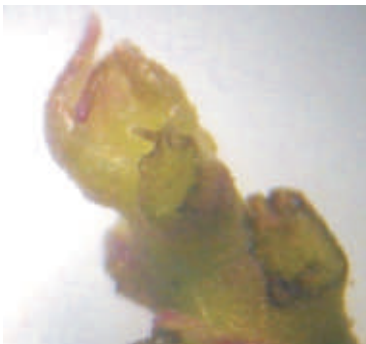


Foto 3. Yema de camote con 2 primordios foliares.

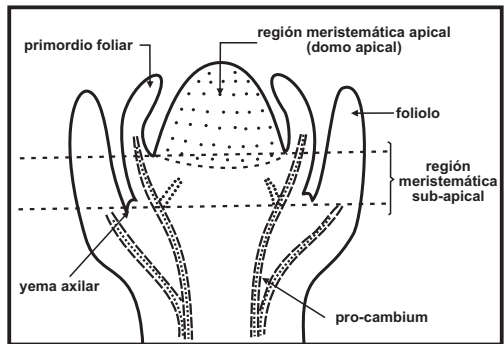


Gráfico 1. Corte transversal de yema con primordios y domo apical.

El trabajo bajo luz artificial y los cortes que se hacen en el tejido, inducen a la fenolización del tejido, por lo tanto realizar la disección con bastante rapidez y pericia a fin de disminuir este problema, y no dañar el meristemo. Inmediatamente el meristemo se coloca en el tubo de prueba conteniendo el medio de cultivo esterilizado. El tamaño del meristemo no debe ser mayor de 0,5 mm de longitud para asegurar que se encuentre libre de patógenos.

En caso de presencia de bacterias, se pueden utilizar antibióticos como Rifampicina para eliminarlas, para ello usar una solución concentrada (12 000 ppm) de este antibiótico, esterilizada por filtración y en condiciones asépticas; se colocan pequeños cuadritos de 5 mm x 5 mm de papel filtro, colocados en una placa petri para hacer fácil el manipuleo y luego se agrega la solución y se dejan secar en la cámara de flujo laminar. El papel filtro se introduce en el tubo de prueba con el meristema y se debe cambiar de tubo con un nuevo papel filtro cada 3 días.

La fase de inicio, comienza con la siembra del meristema en el medio de cultivo MS (ver anexo 2) suplementado con ácido giberélico 20 ppm, realizando al menos 3 subcultivos cada 3 días; los tubos sembrados son colocados en la sala de incubación en estantes con luz artificial, con temperatura de 24 °C +/- 2 °C, la humedad relativa debe oscilar entre 60 % a 70 %, ya que indirectamente afecta al medio de cultivo, con menor humedad relativa, fácilmente pierde agua el medio de cultivo, incrementándose la concentración de sales en el mismo y con humedad relativa alta aumenta la posibilidad de contaminación. Gradualmente se le da luminosidad a los meristemas, hasta llegar a los 3000 lux, es importante descartar microplantas que presenten síntomas de fenolización y vitrificación (aparición húmeda y translúcida, desarrollo anormal de las hojas y necrosis).

Esta fase dura aproximadamente 6 a 8 semanas, durante esta fase las microplantas permanecen en los estantes de la cámara de incubación a 23 °C con 16 horas luz de fotoperiodo. Luego que se observa la formación de las hojas y las microplantas alcanzan 2 a 3 cm mínimo de altura, se puede sembrar en el medio de cultivo de multiplicación.

2.5 Fase de multiplicación

Después que las microplantas alcanzan 2 a 3 cm de longitud, son transferidas a cajas de polipropileno (magentas) u otro tipo de envase que puede ser frasco de vidrio o un contenedor con tapa y resistente al autoclave, en el caso de las magentas se coloca 4 brotes por envase, según sea el desarrollo de las microplantas, ya que el tamaño está influenciado por la variedad. Las magentas deben contener 40 ml de medio de cultivo MS suplementado con ácido giberélico 10 ppm, esta giberelina en la mayoría de cultivos induce la elongación de brotes, lo que a su vez propicia la formación de yemas axilares, las cuales forman nuevas microplantas y de esta manera se incrementa el número con cada subcultivo.

Las condiciones de incubación en esta fase es de 25 °C a 28 °C de temperatura, con 16 horas luz y luminosidad de 3000 lux. Luego de 6 semanas promedio se obtienen de 3 a 6 brotes por microplanta, según sea la respuesta de la variedad, y se separan por nudos para volver a multiplicar o pasar a la fase de enraizamiento (foto 4). Al volver a multiplicar se siembra 9 entrenudos por envase con 40 ml de medio de cultivo y se colocan en forma vertical distribuidos en filas de 3 (foto 5), no se recomienda la formación de callos en las microplantas por cuanto produce variabilidad genética a mayor número de ciclos de propagación y se empieza a manifestar la pérdida de vigor de las microplantas, que demoran más en multiplicarse y disminuye el número de brotes formados en cada una de ellas.



Foto 4. Separación de yemas axilares de microplantas de camote en fase de multiplicación.

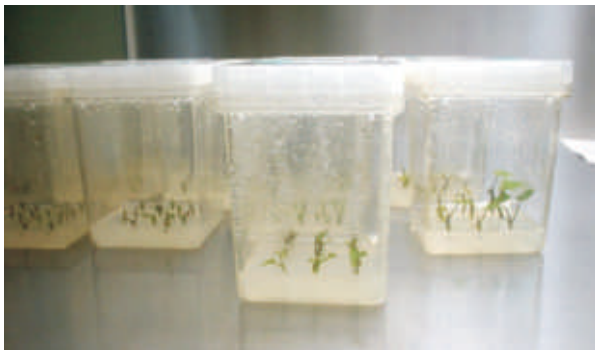


Foto 5. Microplantas de camote en fase de multiplicación con formación de yemas axilares.

2.6 Multiplicación en sistema de inmersión temporal

El uso de medio de cultivo líquido favorece el desarrollo de las microplantas en la fase de multiplicación; para ello se puede utilizar sistemas de propagación de inmersión temporal usando contenedores especialmente diseñados y fabricados para este fin o también se puede adaptar contenedores que se encuentran en nuestro medio.

Ambos sistemas tienen sus ventajas y desventajas, pero es importante señalar que para poder utilizar cualquiera de estos contenedores es necesario contar previamente con un sistema de bombeo de medio de cultivo líquido por presión de aire, esterilizado por filtración y automatizado.

El sistema funciona teniendo como base una red instalada de aire comprimido que circula por las tuberías introduciéndose en los envases, para lo cual previamente pasa por filtros de aire y de humedad, para esterilizar el aire se utilizan filtros hidrofóbicos de 0,22 μm de porosidad y 0,47 mm de diámetro, se utiliza un micro PLC para automatizar el encendido y apagado del compresor de aire por periodos determinados.

La automatización del proceso de propagación *in vitro* es una necesidad para la reducción de los costos en la industria de la micropropagación, varias estrategias de automatización han sido desarrolladas por distintos grupos a nivel mundial, algunas con el empleo de tecnologías sofisticadas por lo que el costo de aplicación de las mismas es alto.

Por esta razón se han ensayado otras variantes más simples para lograr al menos la automatización o semi-automatización de algunas partes del proceso, haciendo énfasis en aquellas que mayor consumo de mano de obra implican, como son el último subcultivo de multiplicación y el de enraizamiento donde se manipula aproximadamente el 80 % del volumen total de explantes en un proceso.

El empleo de medios de cultivo líquidos es un aspecto primordial en la automatización, pero es necesario tener en cuenta que el contacto de los explantes con el medio líquido puede conducir a la vitrificación, un serio desorden fisiológico común en muchas plantas o afectaciones en el crecimiento de los explantes por hipoxia.

Es así que se genera la necesidad de contar con un sistema de inmersión temporal de bajo costo y que sea automatizado, para producir mayor número de microplantas en menor tiempo y con menor uso de mano de obra.

2.7 Desarrollo de sistemas de inmersión temporal

Sobre la base del principio que el contacto intermitente con el medio líquido y la aireación continua del medio de cultivo pueden reducir o eliminar desordenes fisiológicos propios del trabajo con medio líquido, se han construido varios aparatos de inmersión temporal que reportan incremento en el número, peso y tamaño de los brotes sometidos al contacto intermitente con el medio de cultivo en diferentes tipos de envases de distinta capacidad.

Entre estos sistemas se cuenta con un sistema comercial de la compañía Nalgene, empleando unidades de filtración comerciales; a partir de este principio se realizó otros diseños para aplicaciones generales en el Laboratorio Biotrop del CIRAD en Montpellier, Francia, cuyo nombre comercial es RITA® (Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado) el cual ha sido utilizado exitosamente para la propagación de varias especies (bananos, cítricos, café, piña, caucho y papa) tanto por organogénesis como embriogénesis. Los tiempos y frecuencia de inmersión han demostrado ser normalmente bastante espaciados en el tiempo (baja frecuencia y tiempo), aunque se han observado diferencias notables entre las especies y los distintos sistemas de regeneración.

En Cuba fueron desarrollados sistemas de inmersión temporal usando en vez de RITA®, frascos de vidrio con tapas de caucho con perforaciones para la colocación de tubos de aluminio para el ingreso de aire, de esta manera se logra que todas las partes del sistema se puedan adquirir en el mercado nacional.

En Israel se ha empleado un sistema con envases de plástico flexible colgantes como los que se usan para administrar suero en medicina, el principio es similar a los otros, solo que requiere que los envases sean comprados a la empresa fabricante, aunque la capacidad de los envases sea no mayor a un litro como sucede con los RITA®.

Las ventajas del uso del sistema de inmersión temporal son:

- Se utiliza medio de cultivo líquido, por ello no es necesario adicionar agar-agar al medio de cultivo.
- No se requiere muchos envases pequeños, como magentas o frascos de vidrio.
- Disminuye considerablemente la mano de obra en la tarea de multiplicación ya que se reduce el número de subcultivos.
- Los brotes que se obtienen son más vigorosos y se desarrollan en menos tiempo que el sistema convencional.
- Si se utilizan envases de vidrio se pueden emplear envases de diferentes volúmenes de acuerdo a las necesidades de producción.

Las características del Sistema RITA® son:

- Recipiente de Inmersión Temporal Automático.
- De importación, procedencia francesa.
- Capacidad máxima 500 ml.
- Repuestos y accesorios de importación.
- Se requiere de máximo cuidado en su manipulación.
- Hecho a base de polímeros de resistencia al autoclave.

2.8 Funcionamiento del sistema RITA®

Fase emergida. Esta fase es la de mayor duración.

Los explantes están colocados sobre un disco de esponja de poliuretano (gráfico 2).

Fase sumergida. La duración de esta fase se define por experimentación pero siempre es muy corta: Puede variar de 1 minuto por día hasta 4 veces 15 minutos por día.

Una sobrepresión de aire estéril, aplicada en la parte baja, permite al medio de cultivo subir a la parte alta donde se encuentran los explantes.

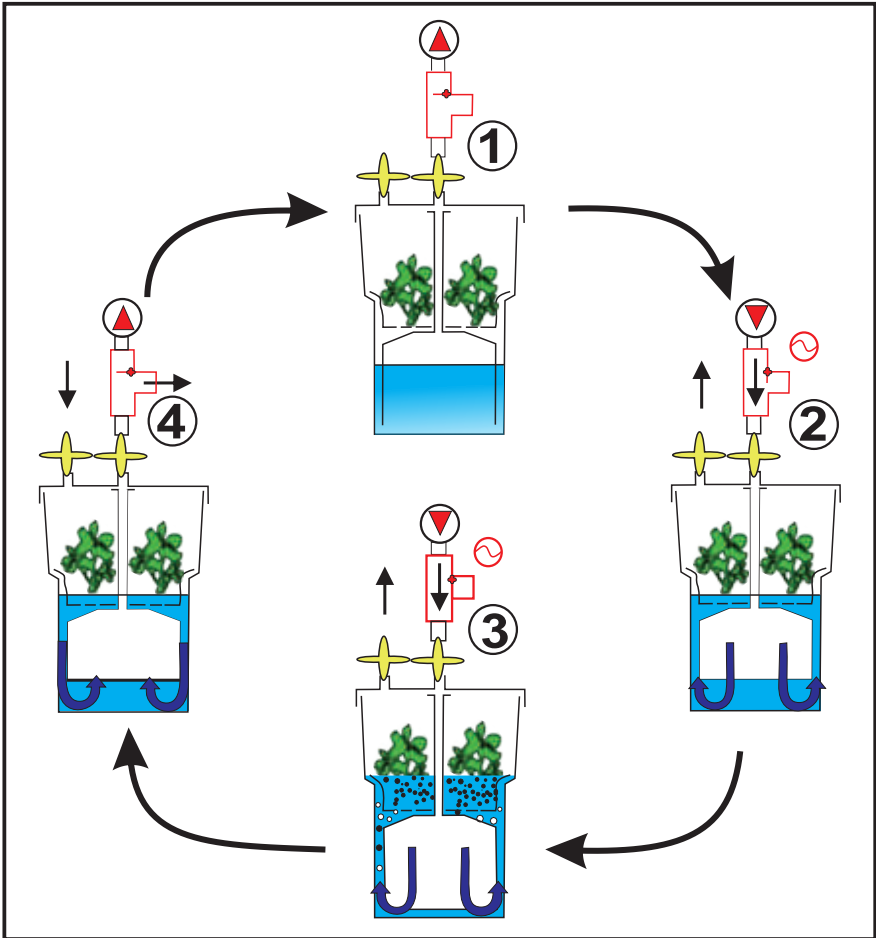
El aire inyectado permite la oxigenación del medio, el aire de la parte alta se renueva totalmente.

Pasado el tiempo de inmersión, la bomba de aire se apaga, las presiones se equilibran, y el medio vuelve a bajar por gravedad a la parte inferior, por capilaridad, una fina película de medio se mantiene en contacto sobre los explantes.

El sistema debe ser ensamblado con diferentes piezas que se pueden encontrar en el mercado local excepto por el recipiente o envase RITA®.

Primero se debe instalar un compresor de aire como fuente de aire a presión, este mismo aire debe pasar por dos filtros de aire y humedad, antes de ingresar al sistema, el compresor debe estar instalado en la parte externa de la cámara de incubación del laboratorio.

Dentro de la cámara de incubación se colocará una red de mangueras conectadas con acoples rápidos, codos y distribuidores según requiera el diseño y la distribución en los diferentes pisos de los estantes.

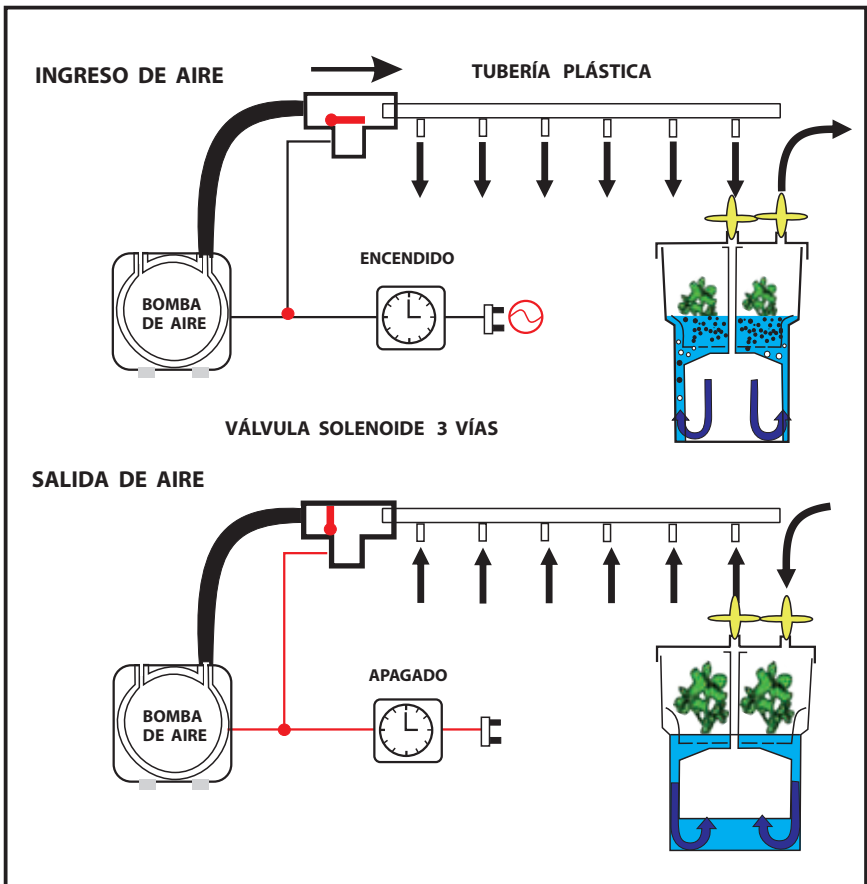
Gráfico 2. Funcionamiento del envase RITA®

Fuente: CIRAD

Luego en los estantes donde estarán los RITA® se debe colocar un tubo de CPVC con salidas adaptadas en agujeros para conexión de mangueras de silicona (manifold o flauta), la que debe permitir el paso del aire de estas mangueras hasta los RITA®, previamente pasarán por un filtro hidrofóbico de 0,22 μm tanto de entrada como de salida.

El ingreso y expulsión de aire dentro del sistema estará controlado por válvulas solenoides de tres vías (gráfico 3) que permitirán el ingreso del aire en momentos determinados e igualmente la expulsión del mismo de los envases.

Gráfico 3. Ingreso y salida de aire en el sistema RITA®



Fuente: CIRAD

La apertura o cierre de la válvula estará controlado por un micro PLC donde se podrá programar las funciones mediante un software ya que vienen con interfase para computadora.

2.9 Ventajas del uso del sistema de inmersión temporal RITA®:

- Disminución del costo de la mano de obra, debido a la facilidad de manipulación de los explantes y del cambio de medio.
- Permite una mejor nutrición mineral. Un contacto estrecho entre la superficie de los explantes y el medio durante la fase de inmersión. Por capilaridad, una fina película de medio se mantiene sobre los explantes.
- Fuerte disminución de los problemas de asfixia o vitrificación de los tejidos en comparación con una inmersión permanente.
- Renovación completa del aire dentro del recipiente durante cada inmersión.
- Mejor separación de los tejidos o células bajo el efecto de las burbujas.
- Control de los procesos morfológicos debido a la frecuencia y la duración de inmersión.
- Protección de cada recipiente contra la contaminación por los filtros. Manipulación individual fácil. Eliminación de los riesgos de contaminación cruzada.

Cuadro 1. Comparativo de producción de microplantas de camote en diferentes sistemas de propagación.

	Tipo de envase	Nº microplantas x envase	Índice de multiplicación	Nº de subcultivos	Nº de días x subcultivo	Nº de envases utilizados	Nº total de días	Nº de microplantas obtenidas
S.C.	Caja polipropileno 50 ml ("magenta")	6	3 - 4	5	30	81 - 215	150	1 458 - 5 120
BIT	Frasco de vidrio de 3 y 4 litros	40	15 - 20	2	25	15 - 20	50	9 000 - 16 000
RITA	Contenedor polímero de 0,5 litro	20	10 - 15	3	25	75 - 115	75	10 000 - 33750

S.C. = Sistema convencional en medio de cultivo semi sólido

BIT = Biorreactor de inmersión temporal (frasco de vidrio)

RITA® = Recipiente de inmersión temporal automatizado

En el Cuadro 1 se muestra los parámetros productivos para una producción masiva de plántulas de camote bajo diferentes sistemas de propagación '*in vitro*', teniendo en cuenta que el primer sistema comparado es el sistema convencional, donde se emplea medio de cultivo semi-sólido en envases de polipropileno mas conocidos como "magentas".

El sistema convencional requiere menos envases que el BIT, pero demanda mayor cantidad de mano de obra por el tiempo que toma y por el número de subcultivos, mientras que el BIT produce mayor cantidad de brotes en menor número de frascos, debido a la capacidad de los frascos, pero la desventaja es el riesgo muy alto de contaminación al momento de retirar los brotes, y este sistema debe tener funcionando sin desperfectos el sistema de ventilación de la cámara de incubación, de lo contrario la pérdida de plantas es muy alta.

En el caso del RITA® también se requiere de un alto número de contenedores, pero la ventaja frente al S.C. es que el periodo de propagación es más corto y la producción de brotes es mucho mayor.

Las microplantas se colocan dentro de los contenedores, que previamente fueron esterilizados por autoclave envueltos en papel aluminio (foto 6) y luego se conectan las mangueras de salidas de los filtros hidrofóbicos, que sirven para esterilizar el aire que produce el burbujeo y la elevación del medio líquido. Las mangueras se conectan a la red de aire impulsada por el compresor, los contenedores se colocan en los estantes de la sala de incubación (foto 7) y se conectan al sistema de aire presurizado, se debe controlar constantemente el desarrollo de las microplantas en su interior y cambiarlas de envase para seguir la multiplicación en 20 días promedio, las microplantas que se siembran no deben tener los nudos basales ni apicales, para así inducir el desarrollo de todos los demás entrenudos.



Foto 6. Preparación de envases RITA® para ingreso al autoclave.



Foto 7. Envases RITA® con microplantas de camote en cámara de incubación.

2.10 Uso de contenedores alternativos

Cuando no se cuenta con envases RITA®, se puede usar contenedores de vidrio con tapas de caucho resistente al autoclave, los cuales se adaptan haciéndoles dos tubos de ingreso, uno para introducir y otro para regresar el medio de cultivo de un contenedor a otro, ya que este es un sistema dual (foto 8).



Foto 8. Comparación de envases RITA y contenedores alternativos

Los frascos de vidrio que se utilizan pueden ser de diferentes volúmenes, de 200 ml hasta 5 litros (foto 9), utilizándose en algunos casos en biofábricas envases de mayor capacidad, tener en cuenta que más fácil de manipular son los envases de menor capacidad ya que es menor la pérdida de microplantas en caso de contaminación.



Foto 9. Siembra de brotes de camote en medio semi-sólido y líquido.

Aunque en los envases de mayor volumen se puede

la multiplicación ocurre al mismo tiempo que el enraizamiento, este es el caso del camote donde la fase de enraizamiento no existe como tal propiamente dicha, ya que generalmente con la formación de nuevos brotes en la fase de multiplicación, también se desarrolla el sistema radicular de la planta, siendo más profuso en algunos cultivares, estas raíces son suficientes para permitir a las plántulas adaptarse a condiciones de medio ambiente.

Cuando el objetivo es enraizar las microplantas, no es necesario que desarrollen tanto como para multiplicación, esto se logra dejando menos tiempo en incubación los envases, solo hasta que se desarrolle el sistema radicular en 1 ó 2 cm.

3. DESARROLLO EN CONDICIONES DE MEDIO AMBIENTE

3.1 Aclimatación

Una vez culminado el enraizamiento, las plántulas son extraídas de sus contenedores, que pueden ser frascos de vidrio o magentas, y se retiran los restos del agar del medio de cultivo con ayuda de pinzas y lavando bien las raíces en agua destilada, sujetando las plántulas delicadamente para no quebrarlas. Con este lavado evitamos que se presenten hongos y causen pudrición radicular al momento de trasladar las plántulas a bolsas o macetas con sustrato. Luego se siembra las plántulas en los contenedores previamente preparados.

El sustrato que se utiliza puede ser arena de río lavada y esterilizada en horno o estufa a 200 °C durante 2 horas colocado en bandejas, o también se puede utilizar sustrato comercial a base de musgo, que ya se encuentra desinfectado. En el primer caso para colocar el sustrato se puede utilizar cualquier contenedor que tenga muy buen sistema de drenaje como el caso de macetas de plástico, en el segundo caso, cuando se utilice musgo, se puede emplear bandejas negras que normalmente se usa para hacer almácigo, rellenándolas

con el sustrato a base de musgo, debido a que es bastante liviano. Las plántulas se acondicionan en un invernadero o en una sala de aclimatación con temperatura de 25°C promedio y elevada humedad relativa para evitar marchitamiento. La aclimatación ocurre en 4 semanas promedio con esas condiciones, pero de no tener control de temperatura, en invierno el desarrollo de las plántulas puede tardar hasta 6 semanas.

3.2 Traslado a invernadero

Luego de la aclimatación las plántulas que se encuentran en macetas (foto 10) se extraen y se cortan las raíces para que tengan el mismo tamaño (foto 11), luego se desinfectan con benomil al 1% y se siembran en camas bajas en invernaderos o cobertores (foto 12). Las camas contienen sustrato a base de arena y humus en proporción 1:1 donde permanecen 5 semanas más. Estas camas se forman colocando estacas de eucalipto, en todo el perímetro, sujetadas con alambre distanciadas a 1 metro y forrando todo el



Foto 10. Plántulas de camote en aclimatación en macetas con sustrato de arena desinfectado.



Foto 11. Plántulas de camote listas para ser sembradas en camas bajas.

contorno con plástico negro y luego rellenando con el sustrato, también se puede utilizar dos filas de ladrillos y luego forrarlos con plástico y nivelar la cama. Después de 3 meses, de las plantas madres que ya están listas para ser cortadas, se cortan los esquejes que van a ir a campo definitivo (foto 13).

3.3 Virosis del camote y detección de virus

Son varios los virus que afectan al camote, pero en la costa de nuestro país los virus que más se manifiestan son el virus del moteado plumoso del camote SPMV (*Sweet Potato Feathery Mottle Virus*) y el



Foto 12. Instalación de plántulas de camote en invernadero en camas bajas.



Foto 13. Corte de esquejes de plantas desarrolladas en invernadero.

virus del enanismo clorótico del camote, SPCSV (*Sweet Potato Chlorotic Stunt Virus*) que actuando en sinergismo forman el complejo viral SPVD (*Sweet Potato Virus Disease*). Debido a que la propagación vegetativa provee un mecanismo altamente eficiente para la perpetuación y diseminación de las enfermedades virales, su incidencia puede llegar a ser alta en el cultivo de camote.

Actualmente el complejo viral es uno de los principales problemas en el cultivo de camote, causante de la disminución del rendimiento promedio en los últimos años. La reducción del rendimiento es superior al 50%, se caracteriza por presentar distorsión y pérdida de área foliar de las hojas y pérdida casi total de la producción.

El SPFMV pertenece al género potyvirus (foto 14), transmitido por áfidos o pulgones (foto 15) en forma no persistente, quiere decir que el virus es adquirido en inserciones de períodos breves de segundos a minutos y la capacidad de transmitir el virus por el vector puede mantenerse por períodos no prolongados. Se caracteriza por la presencia de manchas anilladas en el follaje y estrías en las raíces reservantes, esta enfermedad es endémica en el Perú.

El SPCSV pertenece al género crinivirus (foto 16), transmitido por mosca blanca (foto 17) en forma semi persistente, o sea que para ser transmitidos necesitan ser translocados dentro del vector, y precisan de un periodo de latencia tras la adquisición para que pueda ocurrir la



Foto 14. Partículas virales flexuosas del potyvirus SPFMV



Foto 15. Áfidos (*Aphis* sp.) vector del virus SPFMV

inoculación, se caracteriza por el bajo porte de las plantas y amarillamiento general. Se debe eliminar las plantas con síntomas y controlar una alta población de mosca blanca.

Además de estos virus también se presentan los virus SPMMV, (Sweet Potato Mild Mottle Virus), del grupo de los ipomovirus, transmitido por mosca blanca.

Para la detección de la amplia gama de virus que afectan al



Foto 16. Partículas virales flexuosas del crinivirus SPCSV



Foto 17. Mosca blanca (*Bemisia tabaci*) vector del virus SPCSV

camote se puede utilizar diferentes técnicas según sea el caso. Una de ellas es la inoculación mecánica con plantas indicadoras, como *Nicotiana benthamiana*, *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana tabacum*.

También se utiliza la técnica ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) en su variante DAS-ELISA ó NCM-ELISA, esta última utiliza membrana de nitrocelulosa para detectar virus, para emplear esta técnica se debe contar con el antisuero específico para cada virus que se quiere detectar, pero de otro lado es bastante sensible y

no se requiere de mucho equipamiento para realizar la prueba.

Primero se toma muestras de las hojas de camote en forma de disco (foto 18) y se aplica la muestra a la membrana de nitrocelulosa. Luego se realiza el bloqueo de la membrana de nitrocelulosa (foto 19) y se incuba por 1 hora, seguido de un lavado, luego se agrega los anticuerpos y seguidamente se aplica la solución sustrato. Finalmente se procede al desarrollo de la reacción en la membrana (foto 20) y a la lectura de los resultados.

Además existen técnicas moleculares para detección e identificación de virus y viroides. La detección puede hacerse tomando muestras a nivel de plantas *in vitro* como en plantas adaptadas a condiciones de medio ambiente. Para detectar algunos virus, se usa la reacción



Foto 18. Toma de muestras de discos de hojas de camote.

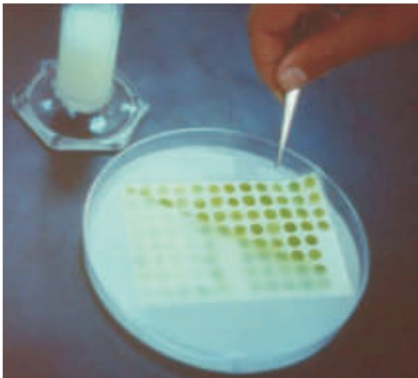


Foto 19. Bloqueo de membrana de nitrocelulosa en solución buffer.

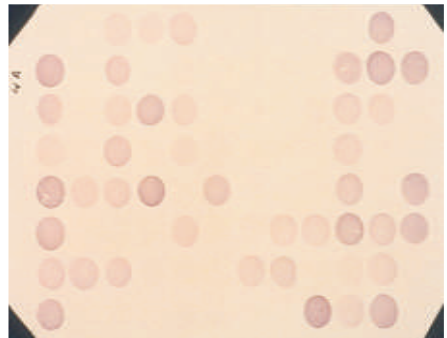


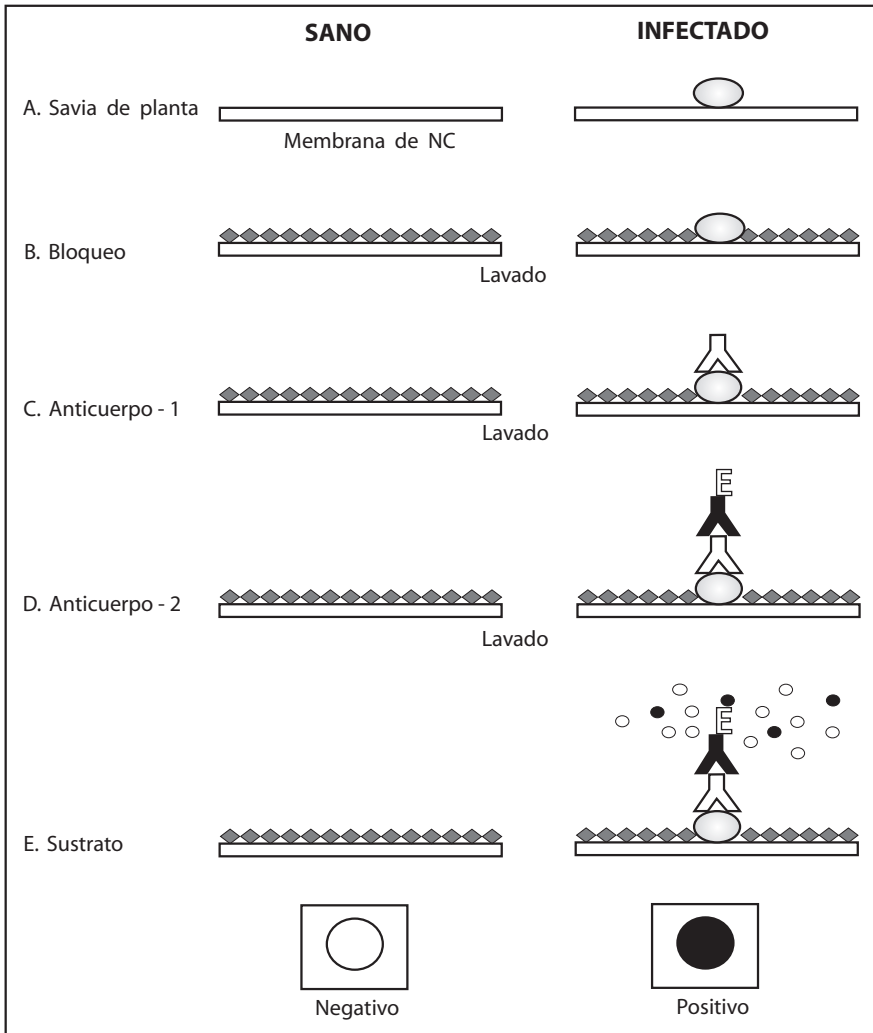
Foto 20. Membrana de nitrocelulosa con reacción final.

en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR), para amplificar el ARN del virus.

Es muy importante eliminar en campo las plantas con presencia de virus y establecer nuevas plantaciones utilizando semilla de calidad (libre de patógenos), aisladas en lo posible de plantaciones contaminadas.

Anexo 1. Secuencia de técnica NCM–Elisa para detección de virus en camote.

ANEXOS



Anexo 2. Volumen de soluciones stock para la preparación de medio de cultivo MS

Solución Stock de Macronutrientes:				
	mg/l	20X (en g)	Diluir en:	Agregar:
KNO ₃	1 900	38,0	2 litros de agua	100 ml por litro de MS
NH ₄ NO ₃	1 650	33,0		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	7,4		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	8,8		
KH ₂ PO ₄	170	3,4		
Solución Stock de Micronutrientes:				
	mg/l	50X (en g)	Diluir en:	Agregar:
KI	0,83	0,0415	250 ml de agua	5 ml por litro de MS
H ₃ BO ₃	6,3	0,315		
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9	0,845		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	0,43		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,00125		
CoCl ₆ ·H ₂ O	0,025	0,00125		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,0125		
Solución Stock de Fe - EDTA:				
	mg/l	50X (en g)	Diluir en:	Agregar:
Na ₂ EDTA	37,3	1,865	250 ml de agua	10 ml por litro de MS
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	1,390		
Solución Stock de Vitaminas:				
	mg/l	50X (en g)	Diluir en:	Agregar:
Mio-inositol	100,0	5,00	250 ml de agua	10 ml por litro de MS
Glicina	2,0	0,10		
Acido nicotínico- HCl	0,5	0,025		
Tiamina	0,1	0,005		
Piridoxina- HCl	0,5	0,025		

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Centre de Cooperation International en Recherché Agronomique pour le Developpement (CIRAD) Vitropic®. Manual de funcionamiento de RITA®.
2. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Roca, W.; Mroginski L.(edit.).
3. George F. Edwind. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. Exegetics Limited. 2nd Edition.
4. Lizarraga, R.; Panta, A.; Espinoza, N. y Dodds, J. 1992. Tissue Culture of *Ipomoea batatas*: Micropropagation and maintenance. CIP Research Guide 32.
5. Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioessays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
6. Olivera, S. Julio. 2009. Técnicas de producción de semilla genética y básica de ajo (*Allium sativum* L.) libre de virus". Instituto Nacional de Innovación Agraria. Serie Folleto N° 12-09.
7. Sociedad Española de Fitopatología. 1996. Patología Vegetal. Llácer G.; López M. M. y Trapero A. (edit.). Ed. Phytoma, España.
8. Toledo, J.; Espinoza, N. y Golmirzaie, A. 1998. Cultivo de Tejidos. Manejo de plántulas *in vitro* en la producción de semilla de papa. Manual de Capacitación CIP.