

Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.), cultivar burren, en biorreactores económicos de inmersión temporal

Production of potato microtubers (*Solanum tuberosum* L.), Variety Burren in temporary immersion bioreactors

Marbell Danilo Aguilar Maradiaga¹, Roxana Yadira Cruz Cardona², Mirna Indiana Ortiz Zelaya³, Johnston Erizaet Zeledón Rodríguez³

¹ Docente Universidad Nacional Agraria (UNA), Managua, Nicaragua, km 12 ½ carretera norte. Apdo. 453. Marbell.Aguilar@ci.una.edu.ni.

² Laboratorio cultivo de tejidos, Facultad de Agronomía, UNA.

³ Graduados de Ingeniero Agrónomo en la UNA.



RESUMEN

El estudio de microtuberización con el cultivar de papa Burren se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Nacional Agraria entre los meses de junio a diciembre de 2015. Se estudiaron las fases de multiplicación y formación de microtubérculos en Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal (BEIT). Las mejores variantes de medios de cultivo resultaron las que contenían 0.20 mg l⁻¹ de GA₃ con 0.50 mg l⁻¹ de BAP y 0.10 mg l⁻¹ de GA₃ con 1 mg l⁻¹ de BAP, con medias respectivas en número de entrenudos de 6.32 y 5.7 y número de hojas por planta de 7.37 y 6.93. Adiciones de sacarosa de 80 g l⁻¹ y 110 g l⁻¹ favorecieron la formación de microtubérculos con medias de peso fresco entre 0.69 y 0.75 gramos. En concentraciones de sacarosa entre 80 g l⁻¹ y 120 g l⁻¹ no se registraron diferencias estadísticas significativas entre las medias de las variables diámetro y longitud de microtubérculos. En microtubérculos con diámetro mayor a los 10 mm se obtuvieron medias en longitud de planta, número de hojas y número de brotes de 21 cm, 16.35 y 5.65 respectivamente y con diámetros entre 8 y 10 mm las medias respectivas fueron de 16.37 cm, 11.35 y 5.35.

Palabras clave: microtubérculos, biorreactores, microesquejes

Abreviatura: BAP, Bencil amino purina; GA₃, Ácido giberélico; BEIT, Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal.

ABSTRACT

The study microtuberization with potato cultivar Burren was conducted in tissue culture laboratory of the National Agrarian University between June and December 2015. Phases of multiplication and formation of microtubers were studied in bioreactors Economic Temporary Immersion (BEIT). The best variants of culture media were those containing 0.20 mg l⁻¹ GA₃ with 0.50 mg l⁻¹ BAP and 0.10 mg l⁻¹ GA₃ with 1 mg l⁻¹ BAP, with average respective number of inter-nodes 6.32 and 5.7 and number of leaves per plant of 7.37 and 6.93. Additions sucrose 80 g l⁻¹ and 110 g l⁻¹ favored the formation of microtubers with average fresh weight between 0.69 and 0.75 grams. Sucrose concentrations of 80 g l⁻¹ and 120 g l⁻¹ were no significant statistical differences between the means of the variable diameter and length of microtubers were recorded. In microtubers more than 10 mm diameter averages obtained plant length, number of leaves and number of buds of 21 cm, 16.35 and 5.65 respectively and with diameters between 8 and 10 mm the respective means were 16.37 cm, 11.35 and 5.35. In microtubers more to 10 mm diameter averages obtained plant length, number of leaves and number of buds of 21 cm, 16.35 and 5.65 respectively and with diameters between 8 and 10 mm the respective means were 16.37 cm, 11.35 and 5.35.

Key words: Minitubers, Bioreactors, microshoots

Recibido: 31 de marzo del 2016

Aceptado: 28 de octubre del 2016

PRODUCCIÓN DE PLANTA

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los alimentos más importantes tanto en Europa como en América y es uno de los cuatro cultivos básicos a nivel mundial (Cepeda y Gallegos, 2003).

En Nicaragua la producción de papa fresca es deficitaria en comparación a la demanda global, considerando un per cápita de 8 kilogramos en el consumo anual. Esto significa que el país depende de las importaciones de aproximadamente el 40%.

La producción de papa registra los menores rendimientos por área y países debido a la baja calidad de la semilla, inadecuados métodos y técnicas de cultivo, de control de plagas y enfermedades y manejo post cosecha.

Los microtubérculos, son tubérculos de papa producidos *in vitro*, que tienen muchas propiedades que los hacen propágulos ideales para la producción de semilla de papa de alta calidad y es así que utilizan como fuente de material vegetativo para la producción de minitubérculos-semilla prebásica de papa en invernadero. (Khuri y Moorby 1996).

Los microtubérculos generalmente se originan en estructuras aéreas de la planta aunque algunos pueden formarse en el medio de cultivo. (Hussey y Stacey, 1984). Se ha demostrado que la producción de microtubérculos en biorreactores de inmersión temporal se puede integrar a un programa de producción de semilla certificada. (Jiménez *et al.*, 1999).

Igarza *et al.*, (2012), destacan que la técnica de biorreactores de inmersión temporal no sólo induce más tubérculos por planta que en medio de cultivo semi-sólido, sino que también aumenta el tamaño y el peso de los microtubérculos.

Varios factores pueden incidir en la supervivencia en campo de las plantas obtenidas de microtubérculos, entre ellos se mencionan: su masa fresca, manipulación *in vitro*, atenciones culturales y condiciones climáticas adversas (Park *et al.*, 2009).

Considerando que los microtubérculos son una alternativa para la producción de semilla de alta calidad genética y fitosanitaria, con el presente estudio nos proponemos producir microtubérculos de papa cultivar Burren en el sistema de Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal (BEIT) y la evaluación de la supervivencia en condiciones *ex vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del área de estudio. La fase de micropropagación, se realizó durante el periodo comprendido entre mayo y diciembre del 2015 en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Facultad de Agronomía (FAGRO), Managua.

Esterilización de materiales y equipos. En la limpieza de la cristalería se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO_3) al 1% con la inmersión de los BEIT durante 24 horas y posteriormente se procedió a eliminar los residuos de cloro con agua del grifo. Pevio a la siembra de los tejidos, las variantes de medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120°C a una atmósfera de presión durante 20 minutos. Los platos petri,

pinzas y bisturís se esterilizaron en el horno a temperaturas de 180°C durante una hora.

Fase de multiplicación. En el experimento de multiplicación se empleó como medio de cultivo basal las sales de Murashige y Skoog, 1962 (MS) con diferentes concentraciones de ácido giberélico y de BAP. Para la reproducción se emplearon microesquejes que se cortaron con una longitud aproximada de 1 cm y se inocularon en BEIT con capacidad de 3000 ml, adicionando en cada uno de ellos 700 ml de la variante de medio de cultivo correspondiente. Se sembraron 70 microesquejes por BEIT que crecieron en condiciones ambientales de 20 +/- 2 °C, con 12 horas de luz natural y 12 horas de oscuridad. Se suministró un riego de inmersión de tres minutos por día.

Las variantes de medio de cultivo que se estudiaron en la fase de multiplicación se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Variantes de medios de cultivo en fase de multiplicación

Tratamiento	*GA3 (mg l-1)	**BAP (g l-1)
M1	0.0	0.0
M2	0.10	0.50
M3	0.10	1.00
M4	0.20	0.50
M5	0.20	1.00

Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA) con arreglo unifactorial, cada bloque conformado por 3 BEIT. Los datos de las variables longitud de planta, número de hojas, número de entrenudos y brotación de yemas axilares se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos se hizo la prueba de rangos múltiples de Duncan -Waller ($\alpha = 0.05$). Los datos fueron procesados y analizados en paquetes estadísticos con Statistical Analysis System (SAS) versión 15.

A las cuatro semanas de establecido el experimento se realizaron las evaluaciones de las siguientes variables, Longitud de planta principal, se medirá la longitud de la base al ápice, Número de hoja, Número de entrenudo y Brotación de yemas axilares

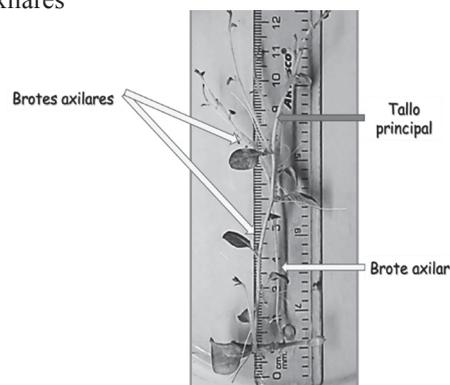


Figura 1. Tallo principal y brotación axilar de yemas en plantas *in vitro* del cultivar Burren.

PRODUCCIÓN DE PLANTA

Microtuberización. De las plantas formadas se extrajeron 30 yemas apicales y/o axilares que se sembraron en la mejor variante de medio de cultivo de la fase de multiplicación donde crecieron durante dos semanas bajo condiciones de 22 ± 2 °C, 12 horas luz y 12 de oscuridad y el suministro de un riego de inmersión al día. Las plantas formadas después de este periodo se transfirieron a BEIT con volumen de 3000 ml y adicionando a cada uno la cantidad de 700 ml de medio de cultivo.

Medios de cultivo. A las dos semanas de permanencia de los microesquejes en el medio de multiplicación, se procedió a efectuar al reemplazo de este medio por variantes que contenían cinco diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo basal sales de MS. El contenido de medio de cultivo líquido de los BEIT se decantaron para lograr transferirlos completamente a beaker con capacidad de 1000 ml. Transcurridas cuatro semanas se repitió el procedimiento descrito anteriormente para reemplazarlos con medios de cultivo frescos, pero conservando la concentración de sacarosa en el BEIT correspondiente. Los BEIT fueron cubiertos con láminas de aluminio para obtener una mejor respuesta de las plantas a la microtuberización por efecto de la oscuridad, y permanecieron bajo condiciones de oscuridad hasta completar las ocho semanas, de acuerdo a lo reportado por Jiménez *et al.*, (1999) (figura 2a y 2b)

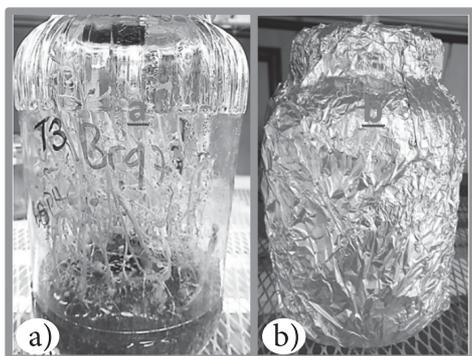


Figura 2. a) Plantas del cultivar Burren obtenidas en medio de multiplicación en b). BEIT cubierto con lámina de aluminio.

La temperatura en el cuarto de crecimiento fue entre 20 ± 2 °C durante las 8 semanas. Las variantes de medio de cultivo para la microtuberización fueron 80% de Sacarosa (g l-1) para la microtuberización 1, 90 para la M2, 100 para la M3, 110 para la M4, y 120 para la M5

Se empleó un diseño de bloques completos al azar (BCA) con arreglo unifactorial, un bloque conformado por tres BEIT cada uno conteniendo 30 plantas y un total de cinco bloques. Los datos de las variables número de microtubérculos por planta, número de brotes, diámetro, longitud y peso fresco de los microtubérculos se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos se practicó la prueba de

rangos múltiples de Duncan - Waller ($\alpha = 0.05$). Los datos fueron procesados y analizados en paquetes estadísticos con Statistical Analysis System (SAS) versión 15.

A las ocho semanas de establecido el experimento se evaluaron las siguientes variables: Número de microtubérculos por planta, Diámetro y longitud en mm, Peso fresco en mg, y Número de brotes por microtubérculos

Plántulas producidas a partir de microtubérculos. De microtubérculos con diámetros entre 4-7.9, 8-10 y >10 mm (figura 3a) se sembraron de forma independiente en número de 5 por maceta a una profundidad de 2 cm en sustrato de compost (figura 3b). Finalizada la siembra las macetas se trasladaron a un micro túnel protegido con tela antiáfida para evitar la presencia de ácaros y para mantener la humedad del sustrato se suministró un riego por día.

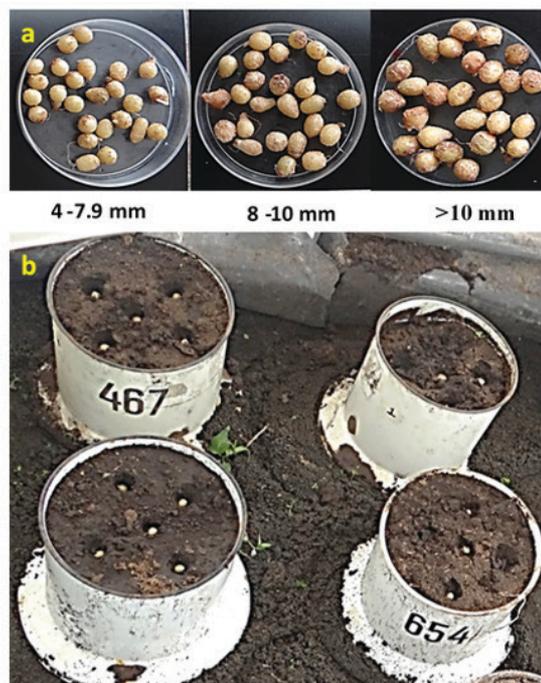


Figura 3 a: Microtubérculos del cultivar Burren con diámetros de 4-7.9 mm, 8 - 10 mm y >10 mm. b: Siembra en macetas.

Formación de plantas. A los 15 días de la siembra de los microtubérculos se evaluaron las siguientes variables: Longitud de la planta (cm), número de hojas, número de brotes, y germinación (%)

Se empleó un diseño completos al azar (DCA) con arreglo unifactorial, cada tratamiento conformado por cinco macetas y se sembraron en cada maceta cinco microtubérculos por categoría de diámetro. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) a los datos de las variables longitud de la planta (cm), número de hojas, número de brotes y porcentaje de supervivencia. Para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos se practicó la prueba de diferencia mí-

PRODUCCIÓN DE PLANTA

nima significativa (LSD) con $\alpha = 0.05$. El procesamiento de datos se realizó con el paquete estadístico similar al empleado en el experimento de multiplicación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El sistema de producción *in vitro* de microtubérculos consiste esencialmente en colocar segmentos nodales de plantas *in vitro* o plantas completas en un medio de cultivo para la inducción de la tuberización (caracterizado por un alto contenido de sacarosa y en algunos casos complementado con sustancias reguladoras del crecimiento).

Fase de multiplicación. El objetivo de la fase de multiplicación es obtener un medio de cultivo que contribuya al incremento de las variables número de hojas y número de brotes axilares por planta. En el cultivar Burren la evaluación de estas variables mostraron mejor comportamiento estadístico en los medios de cultivo que contenían 0.10 mg l⁻¹ de GA₃ con 1 mg l⁻¹ de BAP o 0.20 mg l⁻¹ de GA₃ con 0.50 mg l⁻¹ de BAP. En estos medios de cultivo se logra que las plantas cuenten con cantidades necesarias de sustancias de reserva en tallos y hojas que serán empleadas en la formación de microtubérculos con mayores dimensiones y mayor peso fresco (cuadro 3).

Fase de microtuberización. La inducción y desarrollo de los microtubérculos pueden ser influenciados por varios factores, como la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, las condiciones del cultivo, la temperatura, el fotoperiodo, la intensidad de la luz, la formulación del medio de cultivo, así como la consistencia y el genotipo de la papa (Garner y Blake 1989).

En las variables peso fresco, diámetro y longitud de microtubérculos no se registraron diferencias significativas por efecto del suministro de cinco concentraciones de sacarosa. En peso fresco se obtuvieron medias de entre 0.69 y 0.75 gramos, en diámetro las medias presentaron un rango entre los 0.85 y 0.92 cm y en longitud con rangos entre los 1.04 y 1.17 cm (cuadro 2).

Las medias de peso fresco de microtubérculos obtenidos con el cultivar Burren resultaron superiores a los logrados con el empleo de BEIT por Sánchez y Rocha (2016) en el cultivar Servane con medias entre los 0.4 y 0.6 gramos en medios de cultivo que agregaron concentraciones de sacarosa de 80, 90, 100 y 110 g l⁻¹. Mientras que en diámetro de los microtubérculos el cultivar Burren las medias fueron superiores a 1 cm y en el cultivar Servane obtuvieron medias en un rango entre los 0.53 y 0.57cm. Estos resultados evidencian que las dimensiones que presentan los microtubérculos producidos en el sistema BEIT está en dependencia del componente genotípico y del refrescamiento de cada variante de medio de cultivo como se realizó a las cuatro semanas de iniciada la microtuberización en el cultivar Burren. El cambio por un medio fresco contribuye a retardar la hidrólisis en glucosa y fructosa que sufre la sacarosa, de manera que se favorece el proceso de microtuberización. Khuri y Moorby (1995) y Akita y Takayama (1994), recomiendan que en los biorreactores se deben adicionar una concentración relativamente alta de sacarosa (80 g l⁻¹) para la producción de microtubérculos grandes y mantener un suministro adecuado de sacarosa en toda la etapa de crecimiento para un óptimo crecimiento de microtubérculos. En la figura 4 se observa la formación de microtubérculos en el sistema BEIT.



Figura 4. Microtubérculos del cultivar Burren a las ocho semanas en BEIT.

Cuadro 2. Efecto de la sacarosa en la media de peso, diámetro y la longitud de microtubérculos

Variante del medio MS (1992)	Sacarosa (g l ⁻¹)	Media de peso de microtubérculos (g)	Diámetro (cm)	Longitud (cm)
1	80	0.69 a	0.92 a	1.10 a
2	90	0.71 a	0.88 a	1.17 a
3	100	0.62 a	0.87 a	1.09 a
4	110	0.75 a	0.85 a	1.05 a
5	120	0.63 a	0.85 a	1.04 a

PRODUCCIÓN DE PLANTA

Plantas formadas a partir de microtubérculos. Igarza *et al.*, (2014) refieren que algunos autores han referido que el diámetro de los microtubérculos es determinante en el desarrollo de las plantas en campo, al menos en los primeros días después de la plantación.

Microtubérculos con diámetro mayores a los 10 de mm se obtuvieron medias de las variables longitud de planta, el número de hojas y el número de brotes que superaron significativamente a las obtenidas con la siembra de microtubérculos con diámetro entre 4-7.9 mm y únicamente superaron en la media de la variable número de hojas a los microtubérculos que se sembraron con diámetros entre 8-10 mm. Cuadro 3. Désiré *et al.*, (1995) destacan que el vigor de la brotación de microtubérculos depende de su tamaño, de hecho cuando se incrementa el tamaño, la fuente de las reservas de hidratos de carbono en particular, es importante y por lo tanto podría ser propicio para el desarrollo de la planta.

Cuadro 3. Longitud de la planta, número de hojas y número de brotes de tres diámetros de microtubérculos del cultivar Burren a los 15 días de la siembra en macetas

Diámetro de microtubérculos (mm)	Longitud de planta (cm)	Número de hojas	Número de brotes
>10	21.00 a	16.35 a	5.65 a
8 -10	16.37 ab	11.35 b	5.35 ab
4 -7.9	13.35 b	7.92 b	4.22 b

Medias con letras desiguales en una columna difieren según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para $p < 0.05$.

Con la siembra de los microtubérculos en macetas, se obtuvieron porcentajes de supervivencia entre el 76 y el 84%, resultados determinados por el diámetro del microtubérculo, así a mayor diámetro, mayor será la cantidad de reserva de agua y carbohidratos que contengan los microtubérculos al momento de la siembra en condiciones *ex vitro*, por tanto mayor será la supervivencia. (Figura 5).

Los microtubérculos no resultaron afectados por la dormancia, por tanto no es necesario aplicar tratamientos hormonales o de bajas temperaturas de almacenamiento previo a la siembra. Igarza, *et al.*, 2014, con la siembra directa en campo de microtubérculos del cultivar Andinita con diá-

metros entre 4 y 6.9 mm, 7 y 10 mm y mayores de 10 mm, a los 21 días lograron el 63.3, 76.7 y 93.3% de supervivencia respectivamente.

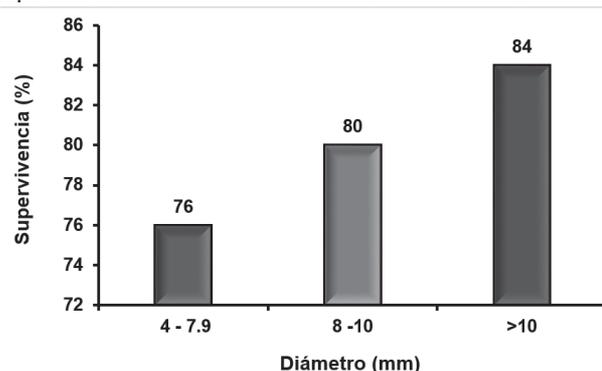


Figura 5 Porcentaje de supervivencia de tres diámetros microtubérculos del cultivar Burren a los 15 días de la siembra en maceta.

CONCLUSIONES

En el cultivar Burren en las variantes de medios de cultivo que contenían 0.20 mg l⁻¹ de GA₃ con 0.50 mg l⁻¹ de BAP y 0.10 mg l⁻¹ de GA₃ con 1 mg l⁻¹ de BAP, se obtuvieron medias respectivas en número de entrenudos de 6.32 y 5.7 y en número de hojas por planta de 7.37 y 6.93.

Adiciones al medio de cultivo de 80 g l⁻¹ y 110 g l⁻¹ de sacarosa favorecieron la formación de microtubérculos de peso fresco con medias entre 0.69 y 0.75 gramos.

No se registraron diferencias estadísticas significativas entre las medias de las variables diámetro y longitud de microtubérculos cuando se adicionaron concentraciones de sacarosa entre 80 g l⁻¹ y 120 g l⁻¹.

Microtubérculos con diámetro mayor a los 10 mm, se lograron medias en longitud de planta, número de hojas y número de brotes de 21 cm, 16.35 y 5.65 respectivamente y con diámetros de tubérculos entre 8 y 10 mm las medias respectivas fueron de 16.37 cm, 11.35 y 5.35. El mejor porcentaje de germinación se obtuvo con microtubérculos con diámetro mayor a los 10 mm con el 84%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akita, M; Takayama, S. 1994. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Rep* 13:184-187.
- Cepeda, M; Gallegos, G. 2003. La papa el fruto de la tierra. México, Mx. Ed trillas. Pág. 9-11.
- Désiré, S. Couillerot, JP; Vasseur, J. 1995. Germination en serre des microtubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) produit *in vitro*: Influence du diamètre, de la densité de la plantation et de l'âge des microtubercules sur le rendement. *Acta Botanica Gallica*, 142, 379-387. <http://dx.doi.org/10.1080/12538078.1995.10515258>
- Garner, N; Blake, J. 1989. The induction and development of potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. *Ann. Bot.* 63: 663-674.
- Hussey, G, Stacey NJ. 1984. Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann Bot* 53: 565-578.
- Igarza, JC, Agramonte, D; Alvarado, Y; De feria, M; Pugh, T. 2012. Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos (CISAT). Laboratorio de Biotecnología.

PRODUCCIÓN DE PLANTA

- Igarza, JC; Agramonte, D; De Feria, M; Jaime J; Pérez, M. 2014. Obtención de microtubérculos de papa cv. 'Andinita' en Sistemas de Inmersión Temporal. En: Biotecnología Vegetal Vol. 11, No. 1: 59 -62.
- Jiménez, E, Pérez N; De Feria, M; Barbón, R; Capote, A; Chávez, M; Quiala, E; Pérez J. 1999. Improved production of potato micro-tubers using a temporary immersio system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59: 19-23.
- Khuri, S; Moorby, J. 1996. Nodal segments or microtubers as explants for *in vitro* microtuber production of potato. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 45: 215-222.
- Khuri, S; Moorby, J. 1995. Investigation into the role of sucrose in potato cv. Estima microtuber production *in vitro*. *Ann Bot* 75:295-303.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Park, SW; Jeon, JH; Kim, HS; Hong, SJ; Aswath, C, Joung H. 2009. The effect of size and quality of potato microtubers on quality of seed potatoes in the cultivar Superior. *Sci Horticult* 120:127-129.
- Sánchez, Y; Rocha, C. 2016. Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L), cultivar Servane en Biorreactores económicos de inmersión temporal. Managua, Nicaragua. NI. P 12-19.