

Tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L), variedad Diacol Capiro, en biorreactores de inmersión temporal y evaluación de su comportamiento en campo

Nelson Montoya Pérez*, Dagoberto Castro Restrepo, Jaiber Díaz García
y Domingo Ríos Giraldo

Unidad de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica
de Oriente, Rionegro, Antioquia, Colombia.

Recibido: 07-01-08 Aceptado: 08-07-08

Resumen

La propagación *in vitro* de papa se ha empleado por más de dos décadas para la multiplicación rápida de material libre de virus en programas de producción de minitubérculos; sin embargo, la tecnología ha tenido baja eficiencia y no satisface las necesidades de semilla certificada. Esta investigación se realizó con el objetivo de demostrar que la producción de microtubérculos en BIT se puede integrar a un programa de producción de semilla certificada de papa Diacol Capiro. Para la inducción de microtubérculos a partir de brotes micropagados de papa Diacol Capiro en biorreactores de inmersión temporal (BIT), se desarrollaron dos fases: a) fase de proliferación masiva de brotes, en la que se encontró que la frecuencia de inmersión de cada 3 horas con duración de 3 minutos y 600 mL de medio de cultivo produjo la mejor cantidad y calidad de brotes; b) fase de tuberización, en la que se encontró que la adición de sacarosa al 8% produjo mayor cantidad de microtubérculos, y cuando se adicionó 6-bencil-amino-purina (6-BAP, $1,0 \text{ mgL}^{-1}$) mejoró la producción (229 microtubérculos/BIT). En campo se comparó el comportamiento de los microtubérculos con semilla élite y plántulas *in vitro* de papa. Se encontró que para la obtención de semilla élite son superiores los microtubérculos porque producen en promedio 49 tubérculos por planta, mientras que con plantas *in vitro* y semilla élite la producción es de 24 y 34 tubérculos por planta, respectivamente.

Palabras claves: microtubérculos, *in vitro*, sacarosa, biorreactor.

In vitro tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) variety Diacol Capiro in temporary immersion bioreactors and grow evaluation in field

Abstract

In vitro propagation of potato has been employed for more than two decades to the multiplication of plant material virus free programs of tuber seeds production. However this technology has shown low efficiency and does not satisfy the demand of certificated seed. The purpose of this investigation was to demonstrate that the production of microtuber in Temporary Im-

* Autor para la correspondencia. E-mail: nmontoya@uco.edu.co.

mersion Bioreactors (TIBs) can be integrated to a program of potato seed production in Diacol Capiro. The microtuber induction in the TIBs was carried out in two phases: a) Shoots massive proliferation phase. This phase had an immersion frequency of three hours and duration of three minutes each one with 600 mL of culture media, wich showed the higher quantity and quality of shoots. b) Tuber phase. The higher number of microtubers were produced adding sucrose at 8%, and 6-Bencil-Amino-Purine (6-BAP, 1.0 mgL⁻¹) for the the production of 229 microtubers/TIB. After the lab research the microtubers were evaluated under field conditions and they were compared to the elite seed and *in vitro* plantlets. It was found that to obtain potato elite seed, microtubers are superior because they produce 49 tubers on average for plant, while with *in vitro* plants and elite seed is of 24 and 34 tubers for plant, respectively.

Key words: microtuber, *in vitro*, sucrose, bioreactors.

Introducción

La micropropagación en papa se utiliza principalmente para la producción de semilla, para la colección y la distribución de germoplasma a través del mundo y para el hallazgo de clones de interés en la agricultura. Para este propósito, se utiliza como material de inicio plantas libres de virus. Los métodos de propagación usados se dirigen a producir una gran cantidad de plantas en el tiempo más corto posible (1, 2). Sin embargo, los inconvenientes principales en la producción de semilla de papa mediante las técnicas del cultivo *in vitro* se han presentado en el traslado y plantación desde la fase de aclimatización a condiciones de campo (3).

Muchos países o regiones carecen de áreas libres de vectores que permitan la producción de tubérculos semilla de alta calidad; por lo tanto, la tecnología de los microtubérculos se presenta como un componente importante en la producción de semilla. En este sentido, los microtubérculos pueden también proveer una solución en países donde la disponibilidad de semilla de alta calidad es requerida debido al incremento de las nuevas áreas de siembra (4). La tuberculización es un proceso fisiológico complejo, regulado por muchos factores, que incluyen los ambientales, hormonales, suplemento de nitrógeno, densidad de inóculo, fuente de explante, cultivar y concentración de sacarosa. Sin embargo, es posible suministrar fuentes de carbono externas para producir

suficientes carbohidratos con el fin de promover el crecimiento celular y la subsecuente regeneración (5). Se han desarrollado varias técnicas para la producción de microtubérculos *in vitro*. Entre ellas está la técnica de los BIT (6). Esta tecnología ha sido empleada satisfactoriamente en la inducción de tubérculos *in vitro* de papa (7). Teisson y Alvard (8) lograron la formación de microtubérculos empleando la técnica semiautomatizada (RITA) y usando como medio básico el MS suplementado con cicocel (CCC), ancymidol, ácido pantoténico y concentraciones altas de sacarosa. Pérez *et ál.* (9) informan que la técnica de inmersión temporal permite que todas las yemas axilares sean inducidas a formar microtubérculos y que estos, a su vez, alcancen mayor tamaño.

La presente investigación describe cómo la utilización de biorreactores de inmersión temporal permite optimizar la producción de microtubérculos que se pueden utilizar directamente en campo para la obtención de semilla básica.

Materiales y métodos

Propagación en biorreactores de inmersión temporal

Como fuente de explantes se emplearon brotes de papa de la variedad Diacol Capiro obtenidos por micropropagación convencional en medio de cultivo semisólido.

Se utilizó un sistema de BIT modificado (10, 11), con frascos de 5 L de capacidad interconectados con mangueras de silicona a frascos de 1 L, donde se colocó el medio de cultivo líquido. Cada BIT se conectó a un sistema de entrada de aire proveniente de un compresor con programador automático para controlar la frecuencia, duración de inmersión, luminosidad y flujo de gases.

Multiplicación en BIT

Inicialmente se evaluaron tres frecuencias (3, 5 y 7 horas), con 3 minutos de inmersión, 80 plántulas y 300 mL de medio de cultivo por biorreactor. Luego se evaluaron tres volúmenes de medio (200, 400 y 600 mL) con una sola frecuencia (3 horas) y 3 minutos de inmersión. El medio de cultivo que se empleó fue el compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog (12), suplementado con tiamina HCl (0,4 mgL⁻¹), pantotenato de calcio (1,0 g/L), mio-inositol (100 mgL⁻¹), 6-BAP (1,0 mgL⁻¹) y sacarosa (30 g/L). Los cultivos se incubaron a 24 °C con fotoperiodo de 12 horas de luz (FFF 80 μmol m⁻²s⁻¹). Las variables que se evaluaron fueron número y altura de los brotes. Se empleó un experimento aleatorio completo al azar con tres repeticiones. Esta etapa tuvo una duración de 40 días.

Tuberización en los BIT

En la etapa de tuberización se empleó el medio de cultivo (MS), suplementado con L. cysteina (0,1 mgL⁻¹), ácido cítrico (0,05 mgL⁻¹), ácido ascórbico (0,05 mgL⁻¹), pantotenato de calcio (0,3 mgL⁻¹), 6-BAP (1 mgL⁻¹), y mio-inositol (100 mgL⁻¹).

Efecto de la concentración de sacarosa

Se evaluaron tres concentraciones de sacarosa (4,0%, 8,0 % y 12,0%) p/v. Los biorreactores se mantuvieron en condiciones de oscuridad. El medio de cultivo se cambió a los 20 días para suministrar nutrientes a las plántulas. A los 60 días se cosecharon los microtubérculos y se midieron las variables: número y tamaño de los microtubérculos por biorreactor. Los microtubérculos se

clasificaron en: grandes (0,1 g), medianos (0,08 g) y pequeños (0,04 g). Posteriormente se hizo el conteo total por biorreactor. Para el procesamiento estadístico se empleó un experimento aleatorio completo al azar con tres repeticiones.

Efecto de la concentración de 6-BAP

Una vez evaluado el efecto de la sacarosa en la tuberización *in vitro*, se evaluaron tres concentraciones de la citoquinina 6-BAP: 1, 3 y 5 mgL⁻¹. Como medio de cultivo se empleó la formulación anterior: se adicionaron 300 mL del medio de cultivo, con frecuencia de 3 horas, y se hizo el montaje de tres biorreactores con diferentes concentraciones de 6-BAP en combinación con sacarosa al 8%.

Para el análisis estadístico se empleó un experimento aleatorio completo al azar con tres repeticiones. Las variables que se midieron correspondieron a número de microtubérculos por tratamiento y tamaño (cuatro tamaños: 0,6; 0,8; 1 y 1,2 cm).

El tiempo de cosecha se determinó observando la apariencia del cultivo hasta obtener los microtubérculos bien conformados con brotes. Después de la cosecha se sembraron en bandejas plásticas con espacio para 128 alvéolos con turba a capacidad de campo, se cubrieron con tapa plástica transparente durante 20 días para conservar la humedad relativa, y a los 30 días se hizo el trasplante a condiciones de campo.

Evaluación en aclimatización de acuerdo al peso de los microtubérculos

Para este experimento se emplearon cuatro categorías de peso (0,1; 0,4; 0,8 y 1,2 g). Los microtubérculos con tallo (100 de cada tamaño) se sembraron en bandejas plásticas, y como sustrato se empleó turba. Las bandejas se cubrieron con tapas transparentes para controlar la humedad relativa y se manejó una temperatura de 21 °C. La evaluación de la supervivencia se hizo a los 20 días, cuando los microtubérculos rebrotados alcanzaron 7 cm de altura promedio.

Evaluación en campo

Para evaluar los microtubérculos en campo, se establecieron tres parcelas de 270 m² cada una. Cada parcela se dividió en tres y en cada división se sembraron los tratamientos, así: 100 plantas *in vitro*, 100 plantas de microtubérculos y 100 plantas por semilla élite.

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de supervivencia, tamaño, peso y total de tubérculos por planta. Para el procesamiento estadístico de la información se empleó un experimento aleatorio completo al azar con tres repeticiones.

Resultados y discusión

Fase de proliferación en los BIT

Determinación de la frecuencia de inmersión. La figura 1 muestra que cuando se empleó la frecuencia de 3 horas se logró mayor cantidad de brotes (470), mientras que en los tratamientos con 5 y 7 horas se obtuvieron 420 y 390 brotes respectivamente. Al realizar el análisis en relación con el tamaño de los brotes, se encontró, de igual manera, que con la frecuencia de 3 horas, el 78% de los brotes presentaron más de 2 cm de longitud. Jiménez *et ál.* (3) indicaron que se incrementó hasta en tres veces la longitud de los brotes y se mejoró el vigor de la planta, probablemente por la disponibilidad de nutrientes que se obtiene en el proceso de inmersión temporal.

La figura 2 muestra la diferencia en relación con el número y tamaño de los brotes cuando se evaluaron diferentes frecuencias de inmersión.

Evaluación del efecto del volumen del medio de cultivo. Cuando se empleó el volumen de 600 ml se logró mayor cantidad de brotes (580), mientras que en los tratamientos con 200 y 400 ml de medio de cultivo se obtuvieron 480 y 510 brotes, respectivamente.

Al hacer el análisis en relación con el largo de los brotes, la figura 2 muestra que

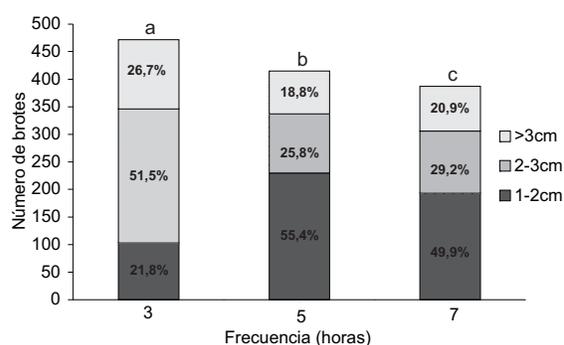


Figura 1. Efecto de las frecuencias de inmersión en la altura y número de brotes de papa (*Solanum tuberosum* L), variedad Diacol Capiro, durante la fase de multiplicación *in vitro* en biorreactores de inmersión temporal.

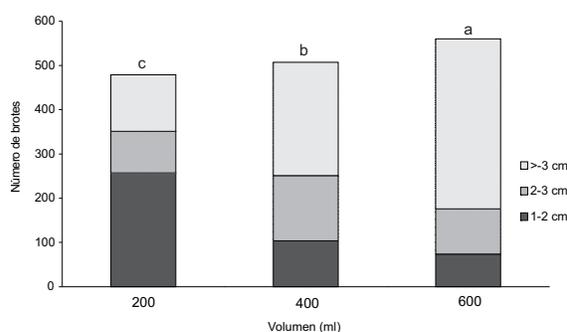


Figura 2. Efecto del volumen del medio de cultivo en la proliferación *in vitro* de plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L), variedad Diacol Capiro, en biorreactores de inmersión temporal.

con 600 ml, el 86,8% de los brotes fueron mayores de 2 cm. Además se logró una tasa de multiplicación de 7,25. En las técnicas convencionales, el volumen del medio de cultivo es relativamente pequeño comparado con cultivos hidropónicos y otros sistemas de producción, a lo cual se suma el tiempo transcurrido entre los subcultivos (13).

Fase de tuberización

Tuberización en los BIT. La tabla 1 muestra que cuando se empleó 8% de saca-

Tabla 1
Evaluación de la sacarosa en el número y peso de microtubérculos de papa en biorreactores de inmersión temporal.

Sacarosa (%)	Microtubérculos (%)	Peso del tubérculo (g)		
		0,04	0,08	0,1
4	17 b	13 c	44,6 a	42,4 b
8	96 a	17,4 c	24,9 b	57,7 a
12	20 b	21,6 c	22,9 b	55,5 a

Los datos representan la media de tres repeticiones. Los tratamientos con letras diferentes presentaron diferencia significativa para $P < 0,05$ por el test de Duncan.

Tabla 2
Comportamiento de la tuberización en relación con las diferentes concentraciones de BAP, para número y tamaño de los microtubérculos.

Tratamiento (BAP mgL^{-1})	Microtubérculos (N°)	Tamaño(cm)/microtubérculos(%)			
		0,6	0,8	1,0	1,2
1	229 a	50 a	27 b	13 c	10 d
3	125 b	56,7 a	25 b	11 c	7,3 d
5	64 c	73 a	17 b	7 c	3 d

Los datos representan la media de tres repeticiones. Los tratamientos con letras diferentes presentaron diferencia significativa para $P < 0,05$ por el test de Duncan.

rosa, el número de microtubérculos por biorreactor correspondió a 98, mientras que en los tratamientos con 4% y 12% se obtuvieron 15 y 20 microtubérculos, respectivamente. Al analizar el peso, se encontró que, de igual manera, con 8%, el 89,6% de los microtubérculos estuvieron por encima de 0,08 g.

Cuando la concentración de sacarosa se incrementó al 8%, se encontraron diferencias significativas en relación con el número y peso de microtubérculos por biorreactor. Cuando se evaluó el efecto del 6-BAP en la tuberización *in vitro*, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. Los resultados presentados en la tabla 3 muestran, con diferencia significativa, que cuando se empleó la concentración de 1 mgL^{-1} , se logró mayor cantidad de microtubérculos (229 por biorreactor), mien-

tras que en los tratamientos con 3 y 5 mgL^{-1} se obtuvieron 125 y 64 microtubérculos, respectivamente.

El análisis en relación con el tamaño de los microtubérculos indica que, de igual manera, con 1 mgL^{-1} de 6-BAP, el 50% estuvo por encima de 0,8 cm, mientras que en los tratamientos con 3 y 5 mgL^{-1} los porcentajes estuvieron en 43,3% y 27%, respectivamente.

La respuesta a la tuberización *in vitro* con el empleo de 6-BAP mostró que en la medida en que se disminuye la concentración, aumenta el número de microtubérculos.

Fase de aclimatización

Evaluación de la supervivencia de acuerdo al peso de los microtubérculos. En la figura 3 puede verse con diferencia significativa que con los microtubérculos de ta-

Tabla 2
Comportamiento de la tuberización en relación con las diferentes concentraciones del BAP, para número y tamaño de los microtubérculos.

Tratamiento (BAP mgL ⁻¹)	Microtubérculos (N°)	Tamaño(cm)/microtubérculos(%)			
		0,6	0,8	1,0	1,2
1	229 a	50 a	27 b	13 c	10 d
3	125 b	56,7 a	25 b	11 c	7,3 d
5	64 c	73 a	17 b	7 c	3 d

Los datos representan la media de tres repeticiones. Los tratamientos con letras diferentes presentaron diferencia significativa para $P < 0,05$ por el test de Duncan.

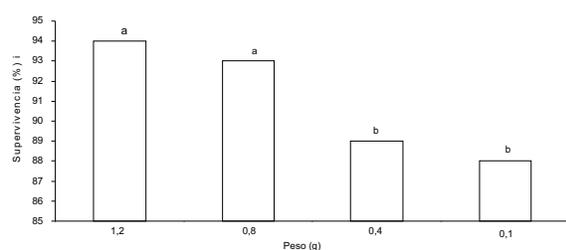


Figura 3. Evaluación de la supervivencia en relación con el peso de los microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L), variedad Diacol Capiro, en biorreactores de inmersión temporal.

maños mayores de 1,2 g y 0,8 g se logró mayor porcentaje de supervivencia (94% y 93%, respectivamente). En cuanto a los microtubérculos de menor tamaño, los porcentajes de supervivencia correspondieron a valores entre 89% y 88%, que se pueden considerar como aceptables. Un aspecto que se debe tener en cuenta para explicar, en general, la alta supervivencia de estos materiales procedentes del sistema de inmersión temporal durante la fase de aclimatización es la calidad de los tubérculos como producto de un mejor suministro de nutrientes por el contacto directo con el medio de cultivo, el mejor intercambio gaseoso durante los intervalos de la inmersión y la prevención de la de-

secación debido a la capa fina de medio en el entorno de los tejidos, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Teisson y Alvard (6).

Evaluación de los microtubérculos en campo

Evaluación de tres tipos de semilla de papa (*Solanum tuberosum* L), variedad Diacol Capiro, en campo. La tabla 3 muestra cómo al evaluar el tipo de semilla se observaron diferencias significativas según las variables consideradas. En relación con la supervivencia, los microtubérculos (semilla élite) presentaron los mejores resultados, con un 100% de prendimiento, seguidos por los microtubérculos obtenidos en BIT, con el 80%, y las plantas *in vitro*, con el 60%. Estos resultados están relacionados con el tamaño de los materiales y el contenido de reservas nutricionales. En los microtubérculos *in vitro* obtenidos en BIT se presentó la mayor cantidad de tubérculos por planta en campo (49 tubérculos/planta), mientras que en los tratamientos con plantas *in vitro* y semilla élite se obtuvieron 24 y 34 tubérculos/planta, respectivamente.

De igual manera, en la evaluación en campo se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en relación con el tamaño de los tubérculos, ya que al emplear semilla élite se obtuvieron tubérculos más grandes (de 4 a 5 cm y > 5 cm) en el

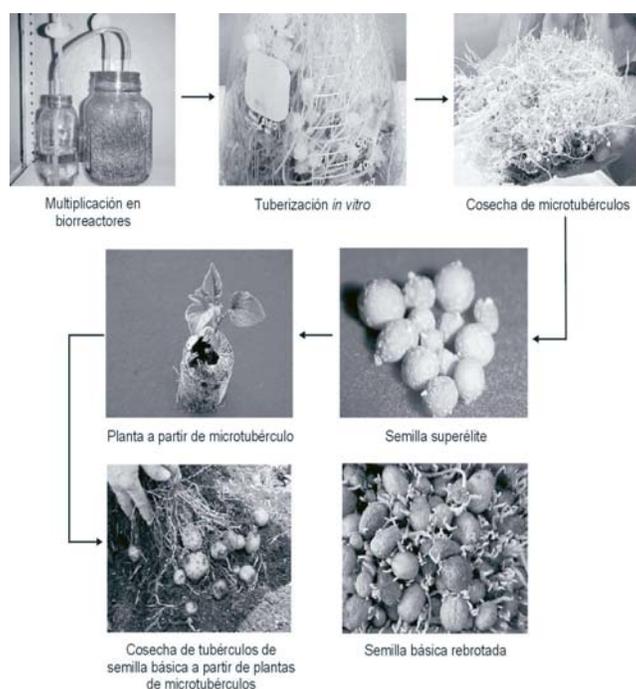


Figura 4. Proceso de tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) por el sistema de biorreactores de inmersión temporal y la obtención de semilla básica.

60,6% de los casos, mientras que en los tratamientos con plantas *in vitro* y microtubérculos, este porcentaje fue de 47,7% y 38%, respectivamente.

Desde el punto de vista del número de tubérculos y de la sencillez del proceso, es ventajoso el empleo de microtubérculos *in vitro*, ya que le permiten al agricultor, sin necesidad de invertir en infraestructuras sofisticadas, obtener, directamente en su parcela, semilla básica de alta calidad (figura 4).

Cuando se hizo el análisis en relación con el peso de la cosecha por planta, se encontraron diferencias significativas, como puede observarse en la tabla 3. Con semilla élite, se lograron 6,5 kg/planta, mientras que en los tratamientos con microtubérculos y plantas *in vitro* los pesos promedios fueron de 5,7 y 3,5 kg, respectivamente. Los resultados obtenidos en esta investigación indican que los microtubérculos tuvieron 49% más rendimiento que las plantas *in vitro*.

Conclusiones

Cuando se empleó la frecuencia de inmersión de tres horas, se logró la mayor cantidad de brotes (470) y el 78% de los brotes presentaron el mayor tamaño (> 2 cm).

La utilización del volumen de medio de cultivo de 600 mL en un biorreactor con capacidad de 5 L permitió obtener 580 brotes con una tasa de multiplicación de 7,25.

Se logró mayor eficiencia en la tuberización *in vitro* cuando se utilizó 1 mgL^{-1} de 6-BAP en el medio de cultivo y 8% de sacarosa.

Los microtubérculos obtenidos en BIT presentaron en condiciones de campo el 80% de supervivencia y la formación de 49 tubérculos/planta, lo cual permite demostrar que estos materiales se pueden emplear en programas de producción de semilla básica.

Referencias bibliográficas

1. DODDS, J.H. "Biotechnological techniques applied to potato and sweet potato improvement for developing countries". En: **Plant Biotechnologies for Developing**, pp.15-30, 1999.
2. PEREA DALLOS, M. "Utilización de los sistemas *in vitro* para la obtención de plantas de ñame (*Dioscorea spp*) libres de patógenos". En: M. Guzmán Barney y G. Buitrago Hurtado (Eds.). **Producción de semillas por biotecnología**. Unibiblios-U-Nacional, Bogotá (Colombia), pp. 41-54, 2000.
3. JIMÉNEZ E., CAPOTE A., PÉREZ N., QUIALA E., DE FERIA M., PÉREZ J.C. "Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum L*) en sistemas de inmersión temporal". En: **Técnicas de avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas**, libro de resúmenes BIOVEG'99. Universidad de Ciego de Ávila, Cuba, 1999.
4. MALDONADO I.A., WRIGHT J.E., SCOTT G.J. **Am. J. Potato Res.** 75: 71-79, 1998.
5. SEETOHUL S. **Study of the effects of carbohydrates in tissue culture of *Nicotiana tabacum***. (Dissertation for requirement of B.Sc.). University of Mauritius, Mauritius, 1995.
6. TEISSON C., ALVARD D. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 5: 107-117, 1995.
7. JIMENEZ E., PÉREZ N., DE FERIA M., BARBÓN R., CAPOTE A., CHÁVEZ M., QUIALA E., PÉREZ J.C. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 59: 19-23, 1997.
8. TEISSON C., ALVARD D. "In vitro propagation of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion". En: **Potato seed production by tissue culture**. European Commission, Brussels (Belgium), p. 822, 1998.
9. PÉREZ N., DE FERIA M., JIMÉNEZ E., CAPOTE A., QUIANA E. **Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum L*) en sistemas de inmersión temporal y estudio de su comportamiento en campo**. IBP-UCLV, Santa Clara (Cuba), 1999.
10. LORENZO J.C., GONZÁLEZ B.L., ESCALONA M., TEISSON C., ESPINOSA P., BORROTO C. **Plant cell, Tissue and Organ Culture** 54: 197-200, 1998.
11. ESCALONA M., LORENZO J.C., GONZÁLEZ B., DAQUINTA M., GONZÁLEZ J.L., DESJARDINS C.G. **Plant Cell Reports** 743: 748, 1999.
12. MURASHIGE T., SKOOG F. **Physiologia Plantarum**. 15: 473-497, 1962.
13. KOZAI T., JEONG B.R., KUBOTA C.H., MURA I. **J. Japan. Soc. Hort. Sci.** 64(1): 63-71, 1995.