

Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para la producción a gran escala de tubérculos *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. var. Atlantic y estudio de su comportamiento en el campo

Naivy Pérez*, Manuel de Fera, Elio Jiménez, Alina Capote, Maité Chávez y Elisa Quiala. * Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 1/2, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: naperez@uclv.etcvsa.cu

RESUMEN

Se diseñó una unidad de inmersión temporal con el objetivo de lograr a gran escala la producción de tubérculos *in vitro* de papa como una vía alternativa para la producción de semilla. Se alcanzó un promedio de 2.6 tubérculos *in vitro* por planta con promedios de peso fresco de 1.27g y de diámetro de 11.4mm. Se obtuvo sólo un 2.9% de tubérculos *in vitro* con un calibre menor de 4.0mm, mientras que el 78.1% correspondió al calibre superior a 7.0mm. Los tubérculos de mayor calibre presentaron 100% de conservación durante nueve meses y fue posible su plantación en campo sin necesidad de una etapa previa de aclimatización, aspectos beneficiosos para la producción comercial. Los resultados en condiciones de campo permitieron observar que las plantas obtenidas de los tubérculos *in vitro* presentaron una altura promedio de 22.77cm y 1.51 tallos por planta, mientras que en las plantas *in vitro* los valores fueron de 15.32cm y 1.16 respectivamente. Después de cosechados ambos tratamientos, no se observó diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de minitubérculos por planta. Sin embargo, los procedentes de tubérculos *in vitro*, presentaron valores estadísticamente superiores en cuanto al peso y diámetro de los mismos con respecto a los tubérculos obtenidos de las plantas *in vitro*.

Palabras claves: automatización, micropropagación, papa, tuberización *in vitro*

Abreviaturas: AG₃ – Ácido giberélico; MS – Murashige y Skoog (1962); SIT - Sistemas de Inmersión Temporal

ABSTRACT

A special temporary immersion system was designed in order to scale up the potato *in vitro* tubers production as an alternative method for potato seed production. An average of 2.6 *in vitro* tubers with an average fresh weight of 1.27g and diameter of 11.4mm was obtained. Only 2.9% of the *in vitro* tubers had a diameter of less than 4.0mm, while 78.1% of the *in vitro* tubers were larger than 7.0mm in diameter. These tubers can be stored and directly planted without an acclimatization stage so they are the most desirable for commercial production. Under field conditions, the plants obtained from *in vitro* tubers reached an average height of 22.77cm and 1.51 stems per plant compared to an average height of 15.32cm and 1.16 stems per plant reached by the *in vitro* plants. During the harvest the number of minitubers per plant was similar in both treatments, although comparing fresh weight and diameter, the results were statistical superior for *in vitro* tubers than for *in vitro* plants.

Key words: Automation, *in vitro* tuberization, micropropagation, potato

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa en nuestro país presenta como limitante la elevada inversión, alrededor de 14 millones de dólares, que año tras año se realiza en la compra de semillas a otros países. Además que al importar un volumen considerable de semilla, se somete a los riesgos de introducción de agentes patógenos e insectos que existen inevitablemente en toda importación de grandes volúmenes de materiales de siembra (Pérez y Rodríguez, 1989).

Debido a que los métodos tradicionales no garantizan la disminución de las enfermedades que afectan al cultivo de la papa, la producción de tubérculos *in vitro* (Wang y Hu, 1980) y la producción de plantas *in vitro* (Espinoza *et al.*, 1992) se han convertido en las vías más eficientes para la propagación de este cultivo, manteniendo un alto grado de pureza varietal y calidad fitosanitaria.

La principal problemática asociada con la obtención de tubérculos *in vitro* mediante cultivos estáticos es la baja

producción por planta (1.0–1.5) y el pequeño tamaño de los mismos, que limita la plantación directa en condiciones de campo (Jiménez *et al.*, 1999) problemas que disminuyen con el empleo de técnicas de cultivo más eficientes basadas en la semiautomatización del proceso, que a su vez permiten reducir los costos de producción.

El empleo de los medios de cultivo líquidos en el cultivo *in vitro* es un aspecto primordial en la automatización de la micropropagación (Debergh, 1988; Tisserat, 1991; Aitken-Christie *et al.*, 1995) y en el desarrollo de técnicas para la producción a gran escala. Sin embargo, provocan un efecto depresivo sobre el crecimiento del tejido en el cultivo *in vitro*, que conduce a la hiperhidricidad de los tejidos, por esto en el mundo se han desarrollado varias estrategias encaminadas a reducir estas desventajas así como los costos de producción. Una de ellas ha sido el diseño de nuevos modelos de biorreactores y sistemas automatizados empleando medios de cultivo líquidos (Tisserat y Vandercook, 1985; Alvard *et al.*, 1993; Akita y Takayama, 1994; Ziv y Shemesh, 1996; Jiménez *et al.*, 1997).

La calidad de las plantas y los tubérculos *in vitro* producidos en sistemas semiautomatizados basados en la inmersión temporal de los explantes es superior a los obtenidos con el empleo de métodos convencionales (Jiménez *et al.*, 1999).

El presente trabajo tuvo como objetivos, realizar la producción a gran escala de tubérculos *in vitro* de papa empleando sistemas de inmersión temporal y evaluar en el campo el comportamiento de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de tubérculos *in vitro* a gran escala

Sobre la base de experimentos realizados en el Laboratorio de Biorreactores del Instituto de Biotecnología de las Plantas y a partir de las experiencias en el manejo a menor escala de los sistemas de inmersión temporal (SIT) descritos por Jiménez *et al.* (1999); se realizó un diseño de los mismos para la producción de tubérculos *in vitro* de papa a gran escala, el cual comprendía estantes divididos en tres secciones con capacidad para 12 sistemas. Se emplearon frascos de cultivo del tipo Clearboys (Nalgene, USA) de 10 litros de capacidad.

Como material vegetal se utilizaron plantas *in vitro* de la variedad Atlantic cultivadas en medio nutritivo líquido compuesto por las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962) complementado con 0.5mg.l⁻¹ de tiamina, 100mg.l⁻¹ de mioinositol y 2.0% de sacarosa con pH ajustado a 5.7 previo a la esterilización para

detectar posibles contaminantes presentes en el cultivo. Se empleó una densidad de 20 explantes por frasco tipo magenta con 25ml de medio de cultivo. Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento con una temperatura de 20±2°C, fotoperíodo de 16 horas de luz y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 42.0–48.0µmol.m⁻².s⁻¹ en agitador orbital a 100rpm.

Cada SIT fue inoculado con 120 explantes provenientes del material vegetal testado. Para el crecimiento y desarrollo de las plantas se utilizó el medio de cultivo anteriormente descrito con un volumen de cuatro litros por sistema y bajo las mismas condiciones durante cuatro semanas de cultivo.

Para la etapa de inducción de la tuberización *in vitro* se utilizó un medio de cultivo similar al empleado en la etapa anterior, incrementándose solamente la concentración de sacarosa hasta un 8.0%, según la metodología descrita por Agramonte *et al.* (1996) para la producción de tubérculos *in vitro* en medios de cultivo estáticos.

Se utilizaron nueve litros de medio de cultivo por sistema, las plantas *in vitro* fueron mantenidas en condiciones de oscuridad durante seis semanas hasta realizar la cosecha.

Se evaluó el número de tubérculos *in vitro* por planta, así como el peso fresco (g) y el diámetro de los mismos (mm). Los tubérculos *in vitro* obtenidos se clasificaron en tres calibres (menores de 4.0mm; 4.0mm–7.0mm y mayores de 7.0mm) y se conservaron durante nueve meses a bajas temperaturas (4–6°C) en una cámara de frío.

Plantación en campo

Los tubérculos *in vitro*, previo a la plantación, fueron tratados con ácido giberélico (0.05g.l⁻¹) durante cinco minutos y colocados a la oscuridad durante siete días y luego a la luz difusa con humedad relativa entre 80.0–90.0% y temperatura de 25±1°C. Transcurridos 28 días se plantaron directamente en condiciones de campo en la Estación Experimental “Pedro Lantigua” en Remedios, Villa Clara, sobre un suelo ferralítico rojo, con el fin de realizar un estudio comparativo con respecto a las plantas *in vitro* obtenidas por el método convencional de micropropagación.

Se empleó un diseño de bloques al azar con cuatro réplicas. Las parcelas experimentales estaban formadas por cuatro surcos con un total de 120 plantas por réplica, la distancia de plantación utilizada fue de 0.90 x 0.20m según la metodología propuesta por Pérez (1991). Se evaluó el porcentaje de supervivencia a los 15 y 35 días, se determinó además la altura(cm) y el

número de tallos por planta a los 45 días de cultivo y el número de minitubérculos por planta, peso fresco por planta (g) y tamaño de los minitubérculos a los 70 días, momento en el que se realizó la cosecha de forma manual.

Procesamiento estadístico

Para el procesamiento estadístico de los datos fue empleado el análisis de varianza de clasificación simple, denominado ONEWAY y para la variable número de tubérculos la Prueba no paramétrica (Mann Whitney) empleando el paquete estadístico computacional SPSS/PC versión 9.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de tubérculos *in vitro* a gran escala

Se observó durante la etapa de multiplicación, que las plantas *in vitro* mostraron un rápido y vigoroso crecimiento sin la presencia de síntomas de hiperhidricidad y se obtuvieron 2.6 tubérculos *in vitro* por planta con un peso fresco promedio de 1.27g y diámetro promedio de 11.4mm. El 36% de los tubérculos *in vitro* alcanzaron un peso fresco mayor de 1.0g, valores superiores a los señalados por otros autores como Teisson y Alvard (1998) que obtuvieron un 21.8% de tubérculos *in vitro* con peso superior a 1.0g al utilizar sistemas semiautomatizados RITA con esta finalidad para la variedad Desirée.

Al clasificar los tubérculos *in vitro* cosechados de los SIT según el tamaño, el 2.9% correspondió al calibre menor de 4.0mm, 19.0% a calibres de 4.0mm a 7.0mm, mientras que el 78.1% presentó un calibre superior a 7.0mm. Los tubérculos *in vitro* correspondientes a este calibre fueron los que mostraron un mejor comportamiento pues facilitaron la manipulación y se logró conservar el 100.0% de los mismos, además estos mostraron una mejor respuesta ante el tratamiento con

AG₃ al brotar el 100.0% y fue posible su plantación directa en el campo sin la necesidad de una etapa previa en fase de aclimatización. Jiménez *et al.* (1999) obtuvieron al emplear la metodología propuesta por Agramonte *et al.* (1996) para la producción de tubérculos *in vitro* de papa en medios estáticos, sólo un 15.0% de tubérculos *in vitro* de la variedad Desirée y un 41.9% de la variedad Atlantic que corresponde al calibre superior (>7mm), porcentaje superado al emplear en el presente trabajo los sistemas de inmersión temporal.

Estos sistemas semiautomatizados permitieron reducir el trabajo manual, e incrementar la producción, así como una mayor calidad de las plantas y los tubérculos *in vitro* producidos en estos sistemas con respecto a los métodos convencionales. Esto es el resultado de condiciones físicas creadas en el vaso de cultivo donde la atmósfera interna es renovada casi completamente a intervalos regulares permitiendo la eliminación de gases tóxicos y se logra una mayor disponibilidad y asimilación de nutrientes (Teisson y Alvard, 1994).

Plantación en el campo

Los tubérculos *in vitro* bajo condiciones de campo presentaron un 89% de brotación a los 15 días y un 77.3% de supervivencia a los 35 días, mientras que las plantas *in vitro* presentaron un 74.% y 57.5% de supervivencia a los 15 y 35 días respectivamente. Agramonte (1999) obtuvo menos del 50.0% de supervivencia en tubérculos *in vitro* de calibre superior a 4.0mm sin aclimatizar provenientes de medios estáticos y un 90.0% al ser previamente brotados en la fase de aclimatización.

Otros parámetros evaluados en esta etapa de desarrollo y crecimiento vegetativo, mostraron diferencias significativas entre el comportamiento en campo de los tubérculos *in vitro* y las plantas *in vitro* (Tabla 1).

Tabla 1. Comportamiento en el campo de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L. var. Atlantic) obtenidas de tubérculos y plantas *in vitro* durante su crecimiento y desarrollo vegetativo.

Variables evaluadas	Tubérculos <i>in vitro</i> X ± ES	Plantas <i>in vitro</i> X ± ES
Altura (cm)	22.77±0.40a	15.32±0.41b
No. de tallos y ramas/planta	1.51±0.05a	1.16±0.03b

Letras distintas en una misma fila difieren estadísticamente para $p < 0.01$

Al evaluar ambos tratamientos después de realizada la cosecha, el número de minitubérculos por planta no presentó diferencias significativas, no coincidiendo estos resultados con los obtenidos por Agramonte (1999) quien encontró diferencias significativas entre tubérculos

in vitro provenientes de cultivos estáticos y plantas *in vitro*. Es de destacar que los tubérculos *in vitro* empleados eran de calidad inferior si tenemos en cuenta los calibres y pesos de estos con respecto a los obtenidos en sistemas de inmersión temporal donde

las condiciones de cultivo son mejores que en medios de cultivo estáticos. En las restantes variables evaluadas, los resultados del tratamiento plantado con

tubérculos *in vitro*, fueron estadísticamente superiores con respecto a los resultados obtenidos de las plantas *in vitro* (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados obtenidos en campo al evaluar la producción de minitubérculos a partir de tubérculos y plantas *in vitro*.

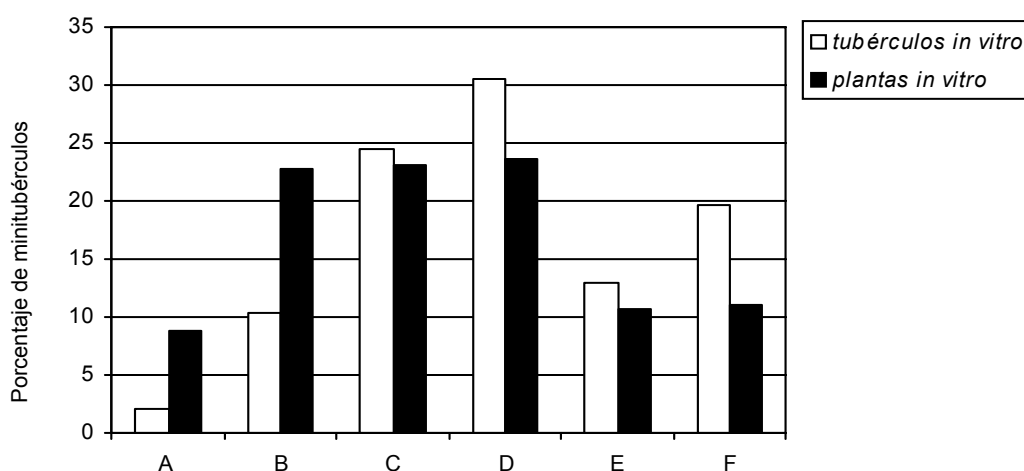
VARIABLES EVALUADAS	Tubérculos <i>in vitro</i> X ± ES	Plantas <i>in vitro</i> X ± ES
Número de tubérculos/planta	5.83±0.42a	5.40±0.44a
Peso de tubérculos/planta (g)	310.3±16.6a	146.6±12.9b
Diámetro de los tubérculos (mm)	42.2±0.14a	31.4±0.10b

Letras distintas en una misma fila difieren estadísticamente para $p < 0.01$

Los minitubérculos obtenidos a partir de tubérculos *in vitro* mostraron valores superiores de porcentajes en los calibres 25-45mm en relación con los minitubérculos provenientes de plantas *in vitro* (Figura 1).

Luego de analizar los resultados alcanzados quedó

demostrado que es posible desarrollar el esquema de producción de tubérculos *in vitro* en SIT para la obtención de semilla original y no sólo de plantas *in vitro* como ocurre en la tecnología actual pues no resulta fácil mantener una producción estable y sostenible con este material de plantación.



Calibres de los minitubérculos.

A: < 9mm; B: 9 – 20mm; C: 20 – 35mm; D: 35 – 45mm; E: 45 – 55mm; F: ≥ 55mm

Figura 1. Porcentaje de minitubérculos obtenidos en campo a partir de tubérculos y plantas *in vitro* clasificados según calibres.

CONCLUSIONES

La técnica de inmersión temporal asociada o no a la producción masiva de tubérculos *in vitro* es una alternativa a los actuales métodos de propagación masiva de esta especie así como para la introducción de nuevos genotipos. Además constituye una variante de interés para la producción de tubérculos *in vitro* de papa no sólo por la inducción de un mayor número de tubérculos/planta con respecto a métodos convencionales sino por el incremento del peso y tamaño de los mismos. Estas ventajas posibilitan una

mayor facilidad para el manejo y la posibilidad de plantarlos sin previa aclimatización, por lo que es posible emplear este método de propagación como una posible técnica para la obtención de semilla de papa de elevada calidad fitosanitaria.

REFERENCIAS

Agramonte, D, Jiménez F, Medina O, Pérez M, Gutiérrez O, Ramírez D y Pérez J (1996) Metodología para la producción y manejo de microtubérculos *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.). IV Coloquio de Biotecnología Vegetal. Libro de reportes, pp. 25-26. Santa Clara, Cuba.

- Agramonte, D (1999) Métodos biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis para aspirar al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Las Villas, Cuba.
- Aitken-Christie, J y Davies HE (1988) Development of a semi-automated micropropagation system. *Acta Hort.* 230: 81-87
- Aitken Christie, J, Kozai T y Takayama S (1995) Automation in plant tissue culture – general introduction and overview. En: Aitken Christie, J, Kozai T y MA Smith (Eds). *Automation and environment control in plant tissue culture*, pp. 1-18 Kluwer Academic Publisher, Dordrecht
- Akita, M y Takayama S (1994) Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Report* 13: 184-187
- Alvard, D, Cote F y Teisson C (1993) Comparisson of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 55-60
- Debergh, P (1988) Improving mass propagation of *in vitro* plantlets. En: Kozai T (Ed) *Horticulture in High Technology Era. International Symposium on High Technology in Protected Cultivation*, pp. 45-57
- Espinoza, N, Estrada P, Tovar P, Bryan P y Dodds J (1992) Tissue culture micropropagation, conservation and export of potato germoplasm. *Especialized Technology Document 1*, CIP, Lima.
- Jiménez, E, Capote A, Pérez N, Chávez M, Quiala E, de Feria M, Barbón R, y Pérez JC (1997) Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en sistemas de inmersión temporal. *Técnicas de avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas*, p.7. Ciego de Ávila, Cuba.
- Jiménez, E, Pérez N, de Feria M, Barbón R, Capote A, Chávez M, Quiala E y Pérez JC (1999) Improved production of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59: 19-23
- Levin, R, Gava V, Tal B, Hirsch S, DeNola D y Vasil IK (1988) Automated plant tissue culture for mass propagation. *Bio/Tech* 6: 1035-1040
- Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-479
- Pérez, J y Rodríguez C (1989) Producción de semillas y propágulos. Editorial Pueblo y Educación. p. 220.
- Pérez, J (1991) Resultados obtenidos en la plantación de vitroplantas de papa en Santa Martina. En: Informe IBP – Empresa de semillas, Cuba.
- Teisson, C y Alvard D (1994) A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary immersion. VII Int. Congress IAPTC, Firenze. *Book of Abstracts*, p.25
- Teisson, C y Alvard D (1998) *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. CIRAD-BIOTROP, France.
- Tisserat, B y Vandercook CE (1985) Development of an automated plant culture system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 5: 107-117
- Tisserat, B (1991) Automated Systems. En: Bajaj YPS (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17. High-Tech and Micropropagation I*, Springer-Verlag, Berlin. pp. 419-431
- Wang, PI y Hu CY (1982) *In vitro* mass tuberization and virus free seed potato production in Taiwan. *Am. Potato Journal* 59: 33-37
- Ziv, M y Shemesh D (1996) Propagation and tuberization of potato bud clusters from bioreactors culture. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 32: 31-36