

Aclimatización de plantas *in vitro* de *Solanum tuberosum* (L.) variedad Desiree

Felipe Alberto Jiménez Terry*, Daniel Agramonte Peñalver, Juan Nivaldo Pérez Ponce, Daymí Ramírez Aguilar, Odalis Gutiérrez Martínez, Martha Pérez Peralta. *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: dagramonte@uclv.edu.cu

RESUMEN

En la fase de aclimatización del Instituto de Biotecnología de las Plantas de la UCLV se realizó el presente trabajo con el objetivo de desarrollar la metodología de aclimatización de plantas *in vitro* de papa en función de la producción de semilla. Los resultados demostraron que las plantas *in vitro* procedentes de la fase de enraizamiento mayores de 4.0cm tuvieron un mejor comportamiento, además, con el sustrato basado en las formulaciones de compost y casting solos o combinados con 15% de zeolita, la fertilización nitrogenada (urea 2.5 g l⁻¹) e iluminación solar de 25 ó 50% en la primera semana y 50 ó 75% en la segunda se incrementó la calidad fisiológica de las plantas *in vitro* para ser plantadas en el campo.

Palabras clave: condiciones *in vivo*, manejo, plantas *in vitro*, sustrato

ABSTRACT

In the phase of acclimatization of the Plants Biotechnology Institute of the Central University of Las Villas the present work was done with the objective of development the methodology of acclimatization of potato plants *In vitro* in function of the seed production. The results demonstrated that the plants *in vitro* coming from the rooting phase bigger than 4.0cm had a better behavior, that together to the handling of other factors like the employment of an appropriate substrat based on the compost an formulation casting alone or cocktails with 15 zeolita%, the nitrogen fertilization (urea 2.5 g.l) and the regulation of the solar illumination to 25 or 50% in the first week and 50 or 75% in second, allowed to increase the physiologic quality of the vitroplants to be planted in the field.

Keywords: *in vitro* plants, *in vivo* conditions, management, substrates

INTRODUCCION

En el año 1992 se construyó una Biofábrica en el Instituto de Biotecnología de las Plantas con capacidad para producir un millón de plantas *in vitro* de papa por año, estando el país en condiciones de iniciar un programa integral para la producción de semilla nacional (Agramonte, 1999). El principal problema que ha presentado la producción masiva de plantas *in vitro* de papa en esta Biofábrica ha sido el alto costo de producción ocasionado por no existir un área adecuada y con las condiciones necesarias para la aclimatización de las plántulas antes de ser llevadas a campo, lo que provocaba grandes pérdidas de las mismas (Pérez, 1998).

En esta fase se han desarrollado diferentes métodos (Agramonte *et al.* 2000):

- 1- La plantación en mota prensada bajo las condiciones de túneles.
- 2- La plantación en bolsas bajo las condiciones de los umbráculos con zarán.
- 3- La plantación en contenedores bajo las condiciones de los umbráculos con zarán.

Aún existen dificultades en la etapa de aclimatización de las plantas *in vitro* de papa lo que provoca que muchas de estas lleguen al campo sin el desarrollo foliar necesario y a raíz desnuda y no resisten el trasplante, lo que prolonga su permanencia en esta fase. Las razones abordadas, justifican el desarrollo de esta investigación en la cual se pretendió:

- 1- Definir el tamaño de las plantas *in vitro* de papa para ser trasladadas a la fase de aclimatización.
- 2- Evaluar algunos sustratos, la iluminación y sustancias bioestimuladoras en esta etapa.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en la fase de aclimatización aledaña a la Biofábrica del Instituto de Biotecnología de las Plantas perteneciente a la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas en el período comprendido desde diciembre de 1998 hasta diciembre del 1999. Esta instalación posee canteros de hormigón que soportan los contenedores de las plantas *in vitro*. El cultivar utilizado en los

experimentos fue Desirée y las plantas *in vitro* procedían de la fase de enraizamiento con seis subcultivos.

Se utilizaron como contenedores del sustrato sobre el cual se desarrollan las plantas las bandejas de poliestireno de 247 orificios con una capacidad de 32 cm³. En cada tratamiento se plantaron 200 plantas *in vitro* evaluando 100 de ellas de forma aleatoria en cuatro repeticiones. El riego fue realizado mediante la técnica de microaspersión con una frecuencia de un minuto y medio cada dos horas la primera semana y dos minutos cada cuatro horas en la segunda semana. Se efectuó una aplicación foliar del fertilizante nitrogenado Urea (46-0-0) con una mochila. Para todos los experimentos la variable *salida del*

cepellón se evaluó de la siguiente forma (se tomaron las muestras correspondientes para cada experimento y se pesó el volumen de sustrato extraído por la planta, determinando por diferencia con el volumen total de cada alveolo el porcentaje de sustrato que se adhería firmemente a la plantas *in vitro*. La escala utilizada para la evaluación fue la siguiente (Agramonte *et al.*, 1999):

Grado 3: sale más del 75% del cepellón.
Grado 2: sale entre el 50-75% del cepellón.
Grado 1: sale del 25-50% del cepellón.
Grado 0: sale menos del 25% del cepellón.

Para la formulación de los sustratos se utilizaron los siguientes materiales (Tabla 1)

Tabla 1. Composición química de los materiales utilizados para la elaboración de sustratos para la aclimatación de plantas *in vitro* de papa (Granulometría < 4 mm).

Materiales	Características
Casting	Origen: Humus elaborado en el IBP empleando la lombriz californiana. Para la alimentación se utilizó cachaza con 6 meses en descomposición y pH estable en la neutralidad (7.1). Composición química: %N 1.16, %P 0.48, %K 0.14, % Ca 4.71, % Mg 0.35, Cu 0.52 ppm, Zn 155 ppm, Mn 503 ppm, % M.O. 25.4
Compost	Origen: procedente del CAI Quintín Banderas, cachaza con más de tres años en descomposición. pH: 7.4. Composición química: % N 1.20, % K 0.57, % Ca 2.95, % Mg 3.26, % MO 29.24, R. C/N 3.4
Zeolita	Origen: procedente de la planta de tazajera en Villa Clara, alta capacidad de intercambio catiónico (CIC), superior a 200 meq/100g de zeolita, cede lentamente los elementos a la planta en dependencia de las necesidades del cultivo para su crecimiento. pH: 7.8 Composición química: SiO ₂ 66.2, Al ₂ O ₃ 11.2, Ti O ₂ 0.5, Fe ₂ O ₃ 2.2, FeO 0.3, MgO 0.6, CaO 4.5, K ₂ O 1.3, P ₂ O ₅ 0.07, H ₂ O 4.7;

Procesamiento Estadístico

Las variables fueron analizadas en forma independiente mediante diferentes modelos del paquete estadístico SPSS Versión 6. 1. 3 para Windows.

1. Influencia de la altura de las plantas *in vitro* en la fase de aclimatación

Con el objetivo de definir la altura adecuada de las plantas *in vitro* para ser llevadas a la fase de aclimatación se realizó una comparación entre los siguientes grupos: Plantas mayores de 4.0cm Tratamiento 1), plantas de 2.0 – 4.0cm (Tratamiento 2) y menores de 2.0cm (Tratamiento 3).

Las variables evaluadas a los quince días en aclimatación fueron: Supervivencia (%), número de entrenudos y número de hojas. La longitud del

tallo y el grado de salida del cepellón se evaluaron a los diez, doce y quince días.

2. Evaluación de las formulaciones de sustratos

Se formularon diferentes sustratos con el objetivo de evaluar el efecto de los mismos sobre el crecimiento de las plantas (Tabla 2).

Las variables evaluadas fueron las siguientes: Supervivencia (%), longitud del tallo, número de entrenudos y grado de salida del cepellón.

3. Efecto de diferentes bioestimuladores sobre el crecimiento de las plantas

En este experimento se estudió el efecto de diferentes microorganismos sobre el crecimiento de las plantas *in vitro* en la fase de aclimatación de forma comparativa con la fertilización

nitrogenada, el brasinoesteroide Biobras-6 (0.05 mg.l⁻¹ de agua) + ANA (10 mg.l⁻¹ de agua) y un testigo sin aplicación de bioestimuladores:

1. *Azotobacter chroococcum* (Biostin). (aplicación diaria durante la primera semana de 0.5 ml por planta de una solución a concentración de 1x10⁸ u.f.c).
2. *Azospirillum brasiliense* (cepa 1). (aplicación diaria durante la primera semana, 0.5 ml por cada plantas *in vitro* de la solución a una concentración de 1x10⁸ u.f.c).
3. Micorrizas (*Glomus mosseae*) (MICOFERT)

(dosis de 13 kgm⁻³ de sustrato, mezclado con el sustrato antes de la plantación).

4. Fertilización nitrogenada (dosis de 2.5 g.l⁻¹ de agua, dos aplicaciones semanales).
5. Biobras-6 (Brasinoesteroide en una solución de 0.05 mg.l⁻¹ de agua) + ANA(10 mg.l⁻¹ de agua) aplicados por inmersión de las raíces durante diez minutos antes de la plantación).
6. Testigo (sin aplicación).

Se evaluó la supervivencia, longitud del tallo, peso fresco y peso seco de las plantas a los 15 días de sembradas en la fase de aclimatización.

Tabla 2. Formulaciones de sustratos para la aclimatización de plantas *in vitro* de papa.

Tratamientos	Casting	Compost	Zeolita
1	-	100	-
2	-	85	15
3	-	75	25
4	-	60	40
5	100	-	-

4. Influencia del manejo de la iluminación sobre el desarrollo de las plantas *in vitro* en la fase de aclimatización.

Se evaluaron algunos parámetros del desarrollo de las plantas *in vitro*, en la fase de aclimatización las cuales recibieron diferentes

porcentajes de iluminación en la primera y segunda semana (Tabla 3).

Los parámetros evaluados a los quince días del ciclo de aclimatización fueron: Supervivencia (%), longitud del tallo, número de hojas y número de entrenudos.

Tabla 3. Manejo de la iluminación durante la aclimatización de las plantas *in vitro* de papa.

Tratamientos	% Iluminación	
	1ra semana	2da semana
1	25	25
2	25	25
3	50	50
4	50	75
5	75	75

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Influencia de la altura de las plantas *in vitro* en la fase de aclimatización

Los resultados obtenidos (Tabla 4) muestran el porqué de la selección atendiendo a la longitud. Las diferencias significativas entre las plantas *in vitro* fueron marcadas en las diferentes variables relacionadas, con valores superiores en el tratamiento de plantas *in vitro* mayores de 4.0cm.

Estas diferencias también fueron observadas en la fase de aclimatización y posteriormente en campo por otros autores en diferentes especies Orellana (1994) y Pérez (1998) en plátanos y bananos; así como Marrero (1996) en caña de azúcar. Por otra parte Daniels (1997) evaluó poblaciones de plantas *in vitro* de papa procedentes de ápices y entrenudos con diferencias entre ellas desde la fase *in vitro* hasta la plantación en campo según su longitud.

Tabla 4. Comportamiento de los grupos de plantas *in vitro* de papa en la fase de aclimatización.

Tratamientos	Longitud del tallo (cm)			Supervivencia (%)	No. entren.	Grado de Salida del cepellón		
	10 días	12 días	15 días			10 días	12 días	15 días
plantas <i>in vitro</i> mayores de 4.0cm	5.7 a	6.4 a	7.2 a	97.3 a	6.6 a	1.23 a	1.59 a	1.95 a
plantas <i>in vitro</i> de 2.0 – 4.0cm	4.5 b	5.3 b	6.0 b	95.5 ab	5.7 b	0.96 b	1.17 b	1.38 b
plantas <i>in vitro</i> menores de 2.0cm	3.3 c	4.0 c	4.6 c	90.1 b	4.3 c	0.87 b	1.02 b	1.14 c
M.G. +/- E.S.	4.5 +/- 0.16	5.23 +/- 0.24	5.93 +/- 0.23	94.3 +/- 5.03	5.53 +/- 0.18	1.02 +/- 0.12	1.26 +/- 0.16	1.49 +/- 0.19

(a,b,c,), letras no comunes difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según el test de Duncan.

En el proceso de propagación comercial es necesario el conocimiento de las diferencias en el comportamiento de las plantas *in vitro* a partir de la selección de las mismas de acuerdo a la altura, antes de llevarlas a condiciones de campo; lo que permite realizar manejos diferenciados para lograr homogeneidad en las poblaciones en la fase de aclimatización y posteriormente en campo.

2. Evaluación de las formulaciones de sustratos

Como se puede observar en la tabla los mejores resultados con relación a todas las variables evaluadas se obtuvieron en los tratamientos de

compost 85% + zeolita 15% y casting 85% + zeolita 15% sin diferencias con los tratamientos de compost 100% y casting 100%. Se aprecia que con las proporciones altas de zeolita los resultados fueron inferiores (tratamientos 4, 8, 9 y 10). La supervivencia no presentó diferencias significativas entre los tratamientos. Carrazana (1995) realizó estudios de combinaciones de sustratos orgánicos e inorgánicos en plátanos y bananos para los cuales el casting y compost con adición de zeolita 30% mostraron los mejores resultados. Las variables evaluadas en este experimento indicaron que se pueden emplear indistintamente como sustratos el compost y casting 100%, casting o compost 85% + zeolita 15%.

Tabla 5. Resultados de las evaluaciones de las formulaciones de sustratos.

Tratamientos	Longitud del tallo (cm)	Número de entrenudos	Salida del cepellón
1- compost 100%	9.33 ab	5.36 a	2.04 a
2- compost 85% + zeolita 15%	9.35 ab	5.28 ab	2.08 a
3- compost 75% + zeolita 25%	9.28 b	5.07 bc	1.89 b
4- compost 60% + zeolita 40%	9.17 bc	4.83 c	1.71 bc
5- casting 100%	9.39 a	5.31 a	2.07 a
6- casting 85% + zeolita 15%	9.44 a	5.33 a	2.11 a
7- casting 75% + zeolita 25%	9.21 b	5.19 b	1.94 b
8- casting 60% + zeolita 40%	8.87 c	5.06 bc	1.83 b
9- compost 20% + casting 20% + zeolita 60%	8.62 c	5.01 bc	1.68 c
10- zeolita 100%	7.74 d	4.54 d	0.88 d
M.G	9.04	5.09	1.82
E.S	0.38	0.19	0.06

(a,b,c,d), letras no comunes difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según el test de Duncan.

La composición química de estos sustratos orgánicos permite un crecimiento rápido y vigoroso de las plantas *in vitro* en esta etapa lo cual es muy favorable para realizar el posterior trasplante a condiciones de campo y obtener altos rendimientos. La zeolita favorece la aireación, absorción de nutrientes y un mejor suministro del agua (Agramonte, 2000) y por otra parte las propiedades de los materiales orgánicos empleados conducen a obtener una planta de excelente calidad fisiológica en la fase de aclimatización. Almaguer *et al.* (1999) señalaron el efecto del humus de lombriz sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo de la yuca

reafirmando las excelentes propiedades nutricionales de este sustrato orgánico.

3. Efecto de diferentes bioestimuladores sobre el crecimiento de las plantas

Con todos los bioestimuladores se lograron resultados superiores al testigo con diferencias significativas. El mejor efecto en la estimulación del crecimiento correspondió a la fertilización nitrogenada sin diferencias significativas con el tratamiento de biobras-6 + ANA (Tabla 6), en tanto, la supervivencia, el número de entrenudos y la salida del cepellón no presentaron diferencias significativas.

Tabla 6. Resultados de la acción de los estimuladores sobre el crecimiento de las plantas *in vitro* de papa en la fase de aclimatización.

Tratamientos	Longitud del tallo (cm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
<i>Azotobacter choocccun</i>	7.0 b	0.77 a	0.46 a
<i>Azospirillum brasiliense</i>	6.8 b	0.66 b	0.39 b
Micorrizas (MICOFER)	6.2 c	0.64 b	0.36 b
Biobras-6 + ANA	7.5 a	0.77 a	0.48 a
Fertilización nitrogenada	7.9 a	0.79 a	0.50 a
Testigo	6.0 c	0.61 b	0.34 b
M.G. ± E.Est.	6.9 ± 0.2	0.70 ± 0.08	0.42 ± 0.09

(a,b,c), letras no comunes difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según el test de Duncan.

La fertilización nitrogenada ha sido descrita como muy efectiva en estadios iniciales de las plantaciones de diversos cultivos Cairo y Fundora (1994). Asimismo, Daniels (1997) logró incremento en el rendimiento en campo después de aplicar una fertilización nitrogenada de 5 g.l^{-1} de agua sobre plantas *in vitro* de papa en condiciones de aclimatización, esta dosis también ha sido descrita para plantas *in vitro*

de caña de azúcar en la aclimatización Marrero (1996).

4. Influencia del manejo de la iluminación

Los resultados en la tabla 7 muestran que el manejo de la iluminación influyó de forma significativa en la supervivencia y la longitud del tallo de las plantas *in vitro* de papa en la fase de aclimatización.

Tabla 7. Influencia de la iluminación sobre plantas *in vitro* de papa en la fase de aclimatización.

Tratamientos *	Supervivencia (%)	Longitud del tallo (cm)
1- 25% + 25%	93.6 a	7.45 b
2- 25% + 75%	93.1 a	7.62 ab
3- 50% + 50%	92.8 a	7.89 a
4- 50% + 75%	92.4 a	8.01 a
5- 75% + 75%	80.3 b	7.33 b
Media gen. +/- E. estandar	88.4 +/- 1.43	7.33 +/- 0.37

(a,b,c), letras no comunes difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según el test de Duncan.

Se observaron los mejores resultados de la variable supervivencia cuando la iluminación fue menor de 75% en la primera semana de desarrollo de las plantas *in vitro* (tratamientos 1, 2, 3 y 4) lo

cual presenta estrecha relación con el efecto del cambio de las condiciones *in vitro* a las condiciones *in vivo*. Las variaciones de los porcentajes de iluminación no ocasionaron diferencias significativas

entre las plantas para las variables número de hojas y entrenudos. De forma general los resultados fueron similares con iluminación del 25 ó 50% en la primera semana y 50 ó 75% en la segunda, correspondientes a los tratamientos 2, 3 y 4. Pérez, (1998) refirió que la variación de la iluminación en diferentes etapas de la micropropagación determina diferencias en el crecimiento y rendimiento en campo de plantas *in vitro* de papa, Nutman (1973) hizo referencia a que los excesos de iluminación solar tenían efectos negativos sobre la fotosíntesis y la tasa de asimilación neta las cuales podían ser mayores regulando la luminosidad.

CONCLUSIONES

El estudio de la aclimatización de plantas *in vitro* de papa permitió definir la metodología para el manejo de las mismas, que recoge los siguientes aspectos:

Seleccionar plantas *in vitro* mayores de 4.0cm para la plantación en la fase de aclimatización.

Emplear los sustratos constituidos por casting o compost indistintamente solos o al 85% con adición de zeolita 15%.

Realizar la fertilización nitrogenada con urea (2.5 g.l⁻¹) dos veces en la semana.

Regular la intensidad de la iluminación durante la primera semana a 25 ó 50% e incrementar la misma al 50 ó 75% en la segunda semana.

REFERENCIAS

Acosta, M, Alvarado Y, Herrera L y Dita MA (1995). Uso de bioestimulantes en plantas *in vitro* de papa, banano y caña de azúcar. Revista Centro Agrícola 2/95 : 54-67

Agramonte, D, Ramírez D, Pérez M, Gutiérrez O, y Jiménez FA (1999). Estudio de diferentes manejos en la fase de multiplicación en clones de plátanos y bananos (*Musa sp.*), FHIA-21(AABB) y Gran Enano (AAA). Revista Centro Agrícola. 3/99 : 81-84

Agramonte, D (2000). Métodos biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.) var. Désirée. Tesis de Doctorado. IBP Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara

Almaguer, J, Brunett EN, Espinosa W, León GJ y Moreno B (1999). Efecto del humus de lombriz combinado con la fertilización mineral y su residualidad en el cultivo de la yuca. Revista Centro Agrícola 4/99 : 45-48

Cairo, P y Fundora O (1994). Edafología, pp. 474-476. Editorial Pueblo y Educación, Ciudad de la Habana

Carrazana, V (1995). Estudio comparativo de diferentes formulaciones de sustrato para la aclimatización de plantas *in vitro*. Trabajo de Diploma. IBP- UCLV Santa Clara, Cuba

Daniels, D (1997). Efecto del cultivo *in vitro* en la tuberización de la papa (*Solanum tuberosum* L.), var. Désirée. Trabajo de Diploma. IBP- UCLV. Santa Clara, Cuba

Marrero, D, Gómez C y Martínez Y (1996). Manejo de plantas *in vitro* de caña de azúcar en la Fase IV. Ponencia al XI Forum Nacional de Ciencia y Técnica. Ciudad de La Habana, Cuba

Nuñez, M (1997). Empleo de brasinoesteroides en la micropropagación. Informe de investigación terminada. pp. 18-19 INCA. La Habana

Nutman, JF (1973). Studies on physiology of coffee leaves under natural conditions. Annals of Botany, I : 353-357

Orellana, P (1994). Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa spp.* Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, pp. 40-52. IBP Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara

Pérez, JN (1998) Aumento de la eficiencia en la micropropagación. En: Pérez, JN (Ed) Propagación y mejora de plantas por biotecnología, pp. 179-191. IBP, Santa Clara