



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL

Trabajo de Graduación

**Microtuberización del cultivar de papa (*Solanum
tuberosum* L.) Banba en Biorreactores Económicos de
Inmersión Temporal**

AUTORES

Br. Dorian Adiact Amaru González Castillo

Br. Maynor Abell Chavarría Reyes

ASESORES

MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga

Ing. Roxana Yadira Cruz Cardona

Managua, Nicaragua
Julio, 2016



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL

Trabajo de Graduación

Microtuberización del cultivar de papa (*Solanum tuberosum* L.) Banba en Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal

AUTORES

Br. Dorian Adiact Amaru González Castillo

Br. Maynor Abell Chavarría Reyes

ASESORES

MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga

Ing. Roxana Yadira Cruz Cardona

Presentado

A la consideración del honorable tribunal examinador como requisito para optar
al grado de Ingeniero Agrónomo

Managua, Nicaragua
Julio, 2016

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1. General	3
2.2. Específicos	3
III. MATERIALES Y MÉTODOS	4
3.1. Localización del experimento	4
3.2. Esterilización de materiales y equipos	4
3.3. Selección del material vegetativo	4
3.4. Preparación y desinfección del material vegetativo	4
3.5. Siembra del material vegetativo	5
3.6. Medios de cultivo	6
3.7. Fase de multiplicación	6
3.8. Fase de microtuberización	7
3.9. Diseño experimental y análisis estadístico	9
3.9.1. Fase de multiplicación	9
3.9.2. Fase de microtuberización	10
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4.1. Fase de multiplicación	11

4.1.1. Efecto de los medios de cultivos en altura y número de entrenudos por planta	11
4.1.2. Efecto de los medios de cultivos en el número de hojas y número de brotes axilares	12
4.2. Fase de microtuberización	14
4.2.1. Microtubérculos producidos por planta	14
4.2.2. Diámetro de los microtubérculos	16
4.2.3. Longitud de los microtubérculos	18
4.2.4. Peso fresco de microtubérculos	19
V. CONCLUSIONES	20
VI. RECOMENDACIONES	21
VII. LITERATURA CITADA	22

DEDICATORIA

El presente trabajo de graduación es dedicado a mi hijo, cuya sonrisa *é a luz da minha alma*.

A mis padres cuyo amor semejante *à força de mil sóis esplêndidos* me enseñaron a recorrer los caminos arduos de la vida.

Finalmente, a mi amada esposa a quien no me canso de decirle que *por ela eu faria tudo de novo mil vezes*.

Br. Dorian Adiact Amaru González Castillo

DEDICATORIA

Con la culminación de mi trabajo de tesis es un orgullo dedicársela en primera instancia a:

Dios Misericordioso. Motivo de mi inspiración y esfuerzo. Me diste la pasión, la tenacidad y empuje para llegar hasta aquí. Siempre me das la oportunidad de empezar de nuevo, haciendo las cosas cada vez mejor.

María, Madre de la Misericordia. Por llevarme siempre a Jesús a través de las pequeñas cosas cotidianas de la vida e interceder a cada momento por mí.

Mis padres, hermano y amigos. Este trabajo es el fruto de personas extraordinarias para mí, que me animaron y estuvieron conmigo, en los diferentes momentos de mi vida. Son seres que irradian el amor que me tienen, lo cual me motiva siempre a seguir.

Br. Maynor Abell Chavarría Reyes

AGRADECIMIENTOS

Al culminar nuestro trabajo de investigación queremos manifestar nuestros más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que fueron parte de este proceso de formación y culminación de nuestra carrera:

A Dios por guiarnos a cada momento y brindarnos su apoyo incondicional en cada etapa de nuestra vida.

Al MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga, por habernos apoyado en nuestra tesis, compartiendo sus conocimientos, experiencia y confianza, facilitando así nuestra culminación de estudio.

A la Ingeniera Roxana Cruz Cardona, por habernos acompañado en toda la investigación, motivándonos y aportando de su experiencia para el buen desarrollo de todas las etapas.

Al Ingeniero Álvaro Benavidez por habernos ayudado y guiado a través de los análisis estadísticos y brindarnos sus más claras interpretaciones.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Cultivo de Tejido que nos sirvieron de guías, brindándonos consejos y recomendaciones en la realización del experimento.

Br. Dorian Adiact Amaru González Castillo

Br. Maynor Abell Chavarría Reyes

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Variante de medios de cultivos en la fase de multiplicación.	7
2. Variantes de medios de cultivo en la inducción de microtuberización del cultivar Banba.	9
3. Efecto del GA ₃ y el BAP en altura y el número de entrenudos por planta del cultivar Banba en la fase de multiplicación en los BEIT a las 4 semanas.	11
4. Efecto del GA ₃ y el BAP en el número de hojas y número de brotes axilares del cultivar Banba en la fase de multiplicación.	13
5. Efecto de la sacarosa y el BAP en promedio, diámetro y la longitud de los microtubérculos.	18

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Preparación y desinfección del material vegetativo para la inducción de brotación de yemas.	5
2. Desinfección de las yemas extraídas con NaClO ₃ al 1%.	6
3. Plantas formadas a las cuatro semanas en el medio de multiplicación en los BEIT.	8
4. Microtubérculos del cultivar Banba con lenticelas como puntos de color blanco	16
5. Tamaño de Microtubérculos del cultivar Banba en la fase final	16
6. Comportamiento de los microtubérculos del cultivar Banba de tres categorías de peso fresco producidos en cinco concentraciones de sacarosa combinadas con 1 mg l ⁻¹ de BAP cada una	19

RESUMEN

El trabajo se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Nacional Agraria (UNA) de mayo a septiembre de 2015. El mismo pretende sentar las bases de la producción de semilla básica con un método innovador, al producir microtubérculos de papa del cultivar Banba en BEITs y determinar la mejor variante de medio de cultivo en la fase de multiplicación y microtuberización. Se buscaron las características morfológicas deseadas, mediante el efecto de cinco variantes de medios de cultivos (0.10 y 0.20 mg l⁻¹ de GA₃ con 0.5 y 1 mg l⁻¹ de bencilaminopurina (BAP)). Posteriormente se utilizaron cinco variantes de medios con BAP para la etapa de microtuberización en BEIT con 3000 ml de medio de cultivo en condiciones de crecimiento de 20 ± 3 °C, 16 horas luz y 8 de oscuridad con intensidad de luz de 2000 lux. El ensayo se estableció en BCA unifactorial con tres repeticiones. Para determinar las diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos se realizó la prueba de medias de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con ($\alpha = 0.05$). En los medios de multiplicación para las características altura de planta y número de brotes axilares, presentó mejor desempeño el medio con 0.10 mg l⁻¹ de GA₃ y 0.50 de BAP. Para el número de entrenudos no hubo diferencias significativas y para el número de hojas la mejor respuesta se obtuvo con 0.10 mg l⁻¹ de GA₃ y 0.50 g l⁻¹ de BAP. En microtuberización se obtuvieron buenos resultados en microtubérculos por planta, diámetro y longitud en el medio de cultivo con 1 mg l⁻¹ de BAP y 11% de sacarosa, así como microtubérculos esféricos superiores a los 0,6 g de peso en 36%.

Palabras Claves: *Solanum tuberosum* L., Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal, microtuberización, medios de cultivo.

ABSTRACT

The research was performed at tissue culture laboratory of Universidad Nacional Agraria (UNA) between May and September 2015. It pretends lay the foundation for the production of basic seed, with an innovative method to produce microtubers of potato, variety Banba in BEITs and determine the best variant of culture medium on the phase of multiplication and microtuberization. Were sought the desired morphological characteristics, by means of the effect of five variants of culture medium (0.10 and 0.20 mg l⁻¹ of 0.5 GA₃ with 1 mg l⁻¹ of benzyl amino purine (BAP)). Subsequently five variants of medium with BAP were used to the stage of microtuberization in BEITs with 3000 ml of culture medium under conditions of 20 ± 3 ° C, 16 h light and 8 darkness with light intensity of 2000 lux. The essay was established in unifactorial RBD with three repetitions. To determine statistical difference between the average in treatments was carried out test of minimum significant difference (LSD) of Fisher with (α = 0.05). In the multiplication medium for the length and number of axillary buds, the best performance was by the medium with 0.10 mg l⁻¹ GA₃ and 0.50 g l⁻¹ of BAP. For the number of internodes didn't show significant difference and for the number of leaves, the best response were the mediums with 0.10 mg l⁻¹ GA₃ and 0.50 g l⁻¹ of BAP. In microtuberization worthy results were obtained in microtubers per plant, diameter and length in the culture medium with 1 mg l⁻¹ BAP and 11% sucrose, as well as spherical microtubers higher than 0,6 g of weight in 36%.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., Economical Bioreactors of Temporary Immersion, microtuberization, culture medium.

I. INTRODUCCIÓN

Después del descubrimiento de América, la papa (*Solanum tuberosum* L.) ha sido considerada como uno de los cultivos de mayor difusión en el mundo, figurando entre los más importantes en la producción de alimentos (Muñoz, 1996).

Según FAO (2008) a nivel mundial la papa ocupa el cuarto lugar de importancia, como un cultivo de alto consumo, con una producción anual de 300 mil toneladas, Asia y Europa son los principales productores. A nivel regional, América del Norte ha obtenido un buen desempeño en la producción de este cultivo.

En Nicaragua las plagas y enfermedades más recurrentes en el cultivo de papa son la gallina ciega (*Phyllophaga* spp.), gusano alambre (*Aeolus* spp.), psílido de la papa (*Paratrioza cockerelli*), tizón tardío (*Phytophthora infestans*), Rizoctoniasis (*Rhizoctonia solani*), roña de la papa (*Spongospora subterranea*) y el mildiú polvoso (*Erysiphe cichoracearum*) (Molina *et al.*, 2004).

Otros problemas para los productores de papa del país son la falta de semilla básica libre de patógenos, así como la variación en el tamaño de los tubérculos, factores que inciden en los bajos rendimientos de la producción y consecuente a esto el alza permanente del precio de la papa (Aguilar *et al.*, 2013).

La propagación convencional por medio de tubérculos, tiene algunas desventajas como la transmisión de enfermedades virales y bacterianas, costos por transportes de tubérculos pesados y voluminosos, y brotes de tubérculos antes de la temporada de la plantación (Oropeza, 2012). A través del cultivo de tejidos se puede conservar germoplasma que le confieran resistencias a enfermedades y mejoren las características agronómicas de la papa. Para esto la propagación *in vitro* de planta vía micropropagación es un prerequisite. Se ha reportado para diferentes variedades una eficiente regeneración de plantas a partir de una gama de explantes tisulares, incluyendo hoja, tallo y tubérculos (Oropeza, 2012).

Moreno (2012) utilizó la micropropagación de papa para la multiplicación rápida de clones libres de enfermedades y la obtención de microtubérculos sanos para ser usados como semillas. Con el propósito de mejorar la calidad y el número de los microtubérculos por planta se deben efectuar cambios en algunos componentes del medio de cultivo, la manipulación de las condiciones del cultivo como la temperatura, el fotoperiodo y el uso de medios líquidos en tubos o biorreactores en agitación (Arellano *et al.*, 2010).

De acuerdo con Teisson *et al.*, (1997), entre las ventajas de la inmersión temporal de las plántulas se encuentran: evitan la inmersión continua del material vegetal en el medio de cultivo, proveen una adecuada transferencia de oxígeno, facilitan los cambios secuenciales y automatizados del medio de cultivo, reducen la contaminación microbiana y tiene bajo costo.

En el cultivo de papa 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 (Pérez *et al.*, 2008).

El empleo de los Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal (BEIT) desarrollado en la UNA en el laboratorio de cultivo de tejidos para la producción masiva de plantas *in vitro* de diferentes especies, reduce el tiempo y el costo de transporte de microtubérculos de bajo peso y volumen, contribuyendo a pequeña escala de producción a la mejora de la calidad genética y fitosanitaria de estos cultivos en diferentes regiones de Nicaragua (Aguilar *et al.*, 2013).

II. OBJETIVOS

General:

- Producir microtubérculos de papa del cultivar Banba en Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal (BEIT).

Específicos:

- Evaluar la respuesta en la formación de plantas reproducidas a partir de microesquejes por efecto de cinco variantes de medios de cultivo.
- Determinar la mejor variante de medio de cultivo que favorezca la inducción de microtubérculos en el sistema BEIT.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del experimento

El estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Agronomía (FAGRO) perteneciente a la UNA, ubicado en el km 12 ½ carretera Norte, Managua. El estudio se llevó a cabo en el periodo comprendido entre mayo y septiembre del 2015.

3.2. Esterilización de materiales y equipos

Para el lavado de los BEIT se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO_3) al 1% sumergidos 24 horas, posteriormente se eliminaron los residuos de cloro en enjuagues con agua del grifo y se dejaron escurrir durante 30 min. Previo a la siembra de los tejidos *in vitro*, los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120 °C a 1.0 atmósfera de presión por 20 minutos. Los platos petri, pinzas y escalpelos se esterilizaron en el horno a temperaturas de 180 °C durante 1 hora. Para purificar el aire del área de trabajo de la cámara de flujo laminar se desinfectó con NaClO_3 al 1%, posteriormente se expuso a luz ultravioleta durante 30 minutos.

3.3. Selección del material vegetativo

Como fuente de material vegetativo se obtuvieron tubérculos del cultivar Banba de papa de semilla certificada con categoría básica importada de Francia que presentaron buenas condiciones fitosanitarias.

3.4. Preparación y desinfección del material vegetativo

Con un cuchillo desinfectado con NaClO_3 al 1% se dividieron los tubérculos en cuatro segmentos que fueron sumergidos durante 20 minutos en una solución de Benomil diluido a razón de 3 gramos por litro de agua (Figura 1).

La división de los tubérculos se realizó para inducir a la brotación de un mayor número de yemas por segmento de tubérculo. Cuatro trozos se sembraron en cajas transparentes de plástico de forma rectangular con un largo de 21 cm, ancho y alto de 8 cm que contenía un sustrato de arena desinfectada con agua hervida. Una vez que el agua se enfrió se procedió a la siembra. A los 15 días se extrajeron las yemas brotadas con la ayuda de un escalpelo y posteriormente se colocaron en beacker de 200 ml.



Figura 1. Preparación y desinfección del material vegetativo para la inducción de brotación de yemas.

3.5. Siembra del material vegetativo

Las yemas brotadas de los tubérculos se desinfectaron durante 5 minutos con NaClO_3 al 1%, luego se eliminaron los residuos de cloro con tres pases sucesivos de agua estéril. Con escalpelos se extrajeron ápices meristemáticos que se sembraron individualmente en tubos de ensayos con dimensiones de 15 cm de longitud y 1 cm de diámetro a los que se les adicionó 10 ml de medio de cultivo que contenía las sales MS con 0.2 mg l^{-1} de ANA y 0.1 mg l^{-1} de GA_3 (Figura 2). Los explantes sembrados se trasladaron al cuarto de crecimiento en condiciones de $22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ y luz natural. A 30 días del establecimiento, con las plantas formadas se inició la multiplicación de microesquejes para contar con el material necesario que permitiría definir la variante de medio de cultivo apropiada para la multiplicación del cultivar Banba.



Figura 2. Desinfección de las yemas extraídas con NaClO_3 al 1%.

3.6. Medios de cultivo

Como medio básico se utilizó 100% de las sales de Murashige y Skoog, (MS, 1962) en los experimentos de multiplicación y de microtuberización. En la fase de multiplicación se agregaron GA_3 y 6-BAP incorporadas a las variantes de medios de cultivo solas o combinadas, mientras que en el experimento de microtuberización se adicionaron diferentes concentraciones de sacarosa combinadas con 1 mg l^{-1} de 6-BAP. En todas las variantes de medios de cultivo de multiplicación y microtuberización se adicionaron 100 mg l^{-1} de carbón activado.

3.7. Fase de multiplicación

Se realizó un experimento en donde se definió el medio de cultivo que permitiera obtener las mejores plántulas con las características morfológicas deseadas que produzcan mayor cantidad de material vegetativo (4 variables), mediante el efecto de cinco variantes de medios de cultivo (Cuadro 1).

De las plantas formadas se seccionaron 70 microesquejes de 1 cm de longitud y se inocularon en los BEIT de 3000 ml, culminada la siembra se trasladaron a condiciones ambientales de 20 a 24 °C, con frecuencia y tiempo de riego de 3 minutos, tres veces al día y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas en oscuridad con una intensidad de luz de 2000 lux.

Cuadro 1. Variante de medios de cultivos en la fase de multiplicación.

Variante del medio	GA₃ (mg l⁻¹)	BAP (mg l⁻¹)
1	0.00	0.00
2	0.10	0.50
3	0.10	1.00
4	0.20	0.50
5	0.20	1.00

3.8. Fase de microtuberización

La variante de medio de cultivo en la fase de multiplicación se seleccionó de acuerdo a la respuesta estadística de las características morfológicas y fisiológicas que presentaron las plantas evaluadas. Se extrajeron microesquejes de 1 cm de longitud y se establecieron en la variante de medio de cultivo de multiplicación que produjo mayor cantidad de material vegetativo para garantizar plantas con óptimas características morfológicas y fisiológicas después de las cuatro semanas. Se inocularon 70 microesquejes por cada BEIT y se utilizaron 3 BEIT por cada variante de medio de cultivo y un total de 1050 microesquejes en 15 BEIT. Se distribuyó la misma cantidad de medio de cultivo y BEIT de la misma capacidad como en la fase de multiplicación.

Las condiciones ambientales en las que crecieron los microesquejes fueron similares a las que se definieron en la fase de multiplicación, de 20 a 24 °C con frecuencia y tiempo de riego de 3 minutos, tres veces al día y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas en oscuridad con una intensidad de luz de 2000 lux (Figura 3).



Figura 3. Plantas formadas a las cuatro semanas en el medio de multiplicación en los BEIT.

A las cuatro semanas se extrajeron los residuos de medio de cultivo en cada BEIT y las plantas formadas se emplearon para el experimento de microtuberización.

En el estudio de microtuberización se definieron cinco variantes de medios de cultivo que consistieron en la combinación de 1 mg l^{-1} de BAP con cuatro concentraciones de sacarosa. Las condiciones de crecimiento fueron de temperatura de $20 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y durante 8 semanas los BEIT se cubrieron con lámina de aluminio para impedir la entrada de luz a las plantas y favorecer el proceso de microtuberización según lo reporta Jiménez (1999). Las variantes de medio de cultivo para la microtuberización se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Variantes de medios de cultivo en la inducción de microtuberización del cultivar Banba.

Variante del medio	BAP (mg l⁻¹)	Sacarosa (g l⁻¹)
1	0.0	80
2	1	80
3	1	90
4	1	100
5	1	110

3.9. Diseño experimental y análisis estadístico

3.9.1. Fase de multiplicación

En esta fase se realizó un diseño de bloques completos al azar (BCA) unifactorial y tres réplicas conformada por 3 BEIT. En cada réplica se sembraron 70 plantas y por cada variante de medio de cultivo se sembraron un total de 210 plantas. Las variables altura de planta, número de hojas, número de entrenudos y brotación de yemas axilares se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para determinar las diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos se realizó la prueba de medias de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con ($\alpha = 0.05$); se procesaron con Statistical Analysis System (SAS) versión 15.

Variables evaluadas

A las cuatro semanas de establecido el experimento se evaluaron las siguientes variables:

- a. Altura de planta (cm)
- b. Número de brotes axilares por planta
- c. Número de entrenudos por planta
- d. Número de hojas por planta

3.9.2. Fase de microtuberización

Cada unidad experimental se constituyó de 70 plantas para cada variante de medio de cultivo. Se utilizó un BCA con arreglo unifactorial, cada bloque conformado por 3 BEIT. A datos de las variables diámetro y longitud del microtubérculo se les realizó un ANDEVA y la prueba de medias de diferencia mínima significativa (LSD) con $\alpha = 0.05$ para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos. Se utilizó el mismo paquete estadístico descrito en el acápite 3.8.1. El peso fresco de los microtubérculos se registró de acuerdo a la distribución porcentual en tres categorías en cada variante de medio de cultivo.

VARIABLES EVALUADAS

A las ocho semanas de establecido el experimento se evaluaron las siguientes variables:

- a. Número de microtubérculos por planta
- b. Diámetro de microtubérculos (cm)
- c. Longitud de microtubérculos (cm)
- d. Peso fresco en tres categorías de peso (<0.4 g, 0.4-0.6 g y >0.6 g)

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Fase de multiplicación

4.1.1. Efecto de los medios de cultivos en altura y número de entrenudos por planta

La media de altura de planta en el medio que contenía 0.10 mg l⁻¹ de GA₃ y 0.50 mg l⁻¹ de BAP con 10.24 cm, superó significativamente a la media obtenida en la variante que no se adicionaron reguladores de crecimiento con 8.38 cm. (Cuadro 3).

No hubo diferencias significativas entre las medias registradas en el número de entrenudos producidos entre los tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto del GA₃ y el BAP en altura y el número de entrenudos por planta del cultivar Banba en la fase de multiplicación en los BEIT a las 4 semanas.

Variantes de Medios de cultivo	Reguladores de crecimiento		Altura de planta	Número de entrenudos por planta
	GA ₃	BAP		
	(mg l ⁻¹)			
1	0.0	0.0	8.38 b	7.00 a
2	0.10	0.50	10.24 a	7.37 a
3	0.10	1.00	8.96 ab	8.08 a
4	0.20	0.50	9.71 ab	7.98 a
5	0.20	1.00	10.01 ab	6.91 a

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p \leq 0.05$.

Srivastava *et al.*, (2012) en estudios con seis cultivares de papa después de seis semanas reportaron elongación de tallos con medias entre 5.1 y 10.4 cm y número de nudos entre 4.8 y 8.5 en un medio de cultivo MS con adiciones de 2 mg l⁻¹ de D- pantotenato de calcio, 0.1 mg l⁻¹ de GA₃, 0.01 mg l⁻¹ de ANA y 30 g l⁻¹ de sacarosa y solidificado con agar 7.0 g l⁻¹. Comparando estos resultados con los logrados en el cultivar Banba, es evidente en el estudio con Banba que el sistema BEIT favorece que las plantas alcancen mayores alturas y número de entrenudos en menor tiempo de inoculación de las yemas axilares (cuatro semanas).

Moreno (2012) experimentando durante ocho semanas con el cultivar Arbolona negra cultivado en un medio semisólido e incubado bajo luz blanca continua en tubos de ensayo, encontró que con 25, 50 y 100 g l⁻¹ de sacarosa las medias de altura de plantas fueron diferenciadas a la del cultivar Granola, suponiendo que el efecto del genotipo influye en la dinámica de crecimiento de los tejidos y factores como los recipientes, la densidad de siembra, la consistencia de los medios de cultivo, fotoperiodo y la intensidad de luz, así como el tiempo de permanencia de los tejidos en medio de cultivo. La superficie de las hojas, la altura de la planta y de los entrenudos, pueden estar influenciadas por la intensidad de luz que reciben los tejidos tanto dentro del recipiente como en el cuarto de crecimiento, de forma tal que cuando es deficiente provoca adelgazamiento en las plantas, además se presenta el fenómeno de etiolación que produce características tales como hojas pequeñas, entrenudos alargados y pérdida del color verde en las hojas y tallos.

4.1.2. Efecto de los medios de cultivos en el número de hojas y número de brotes axilares

En las variantes de medios de cultivo que no se le agregó reguladores de crecimiento y a la que contenía 0.20 de GA₃ y 1.00 mg l⁻¹ de BAP produjeron la menor respuesta estadística de 8.12 y 8.02 hojas respectivamente. Las restantes variantes de medios de cultivo registraron rangos de 8.44 – 9.51 hojas por planta (Cuadro 4).

En el número de brotes axilares por planta con adiciones de 0.10 y 0.20 de GA₃ combinadas con 0.50 mg l⁻¹ de BAP se presentaron medias respectivas de 3.07 y 2.45 que resultaron significativamente similares. La menor respuesta estadística se registró con la adición de 0.10 de GA₃ y 1.00 mg l⁻¹ de BAP con media de 0.87 brotes axilares (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto del GA₃ y el BAP en el número de hojas y número de brotes axilares del cultivar Banba en la fase de multiplicación.

Variantes de Medios de cultivo	Reguladores de crecimiento		Número de hojas por planta	Número de brotes axilares por planta
	GA ₃	BAP		
	(mg l ⁻¹)			
1	0.0	0.0	8.12 b	1.94 b
2	0.10	0.50	8.44 a	3.07 a
3	0.10	1.00	9.15 a	0.87 c
4	0.20	0.50	9.51 a	2.45 ab
5	0.20	1.00	8.02 b	1.52 bc

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p \leq 0.05$.

Sánchez y Rocha (2015) experimentando en BEIT con el cultivar de papa Servane registraron una media de 8.52 hojas en el medio de cultivo que se le agregaron 0.10 mg l⁻¹ de GA₃ y 0.50 mg l⁻¹ de BAP, superando significativamente a la media de 7.41 hojas obtenida en un medio que contenía 0.20 mg l⁻¹ de GA₃ y 1 mg l⁻¹ de BAP. El cultivar Banba presentó un rango de medias entre 8.02 y 9.51 hojas superior al rango que se obtuvo con el cultivar Servane.

Sánchez y Rocha (2015) reportan en el cultivar Servane un rango de medias entre 3.18 y 3.73 brotes axilares en las variantes de medios de cultivo que agregaron GA₃ y BAP, que resultó superior al rango de medias de brotes axilares entre 0.87 y 3.07 logrado en el cultivar Banba. Lo ideal es que las plantas que se formen en la fase de multiplicación presenten un buen crecimiento, un aspecto vigoroso del tallo y hojas de tamaño grande, para que se favorezca el desarrollo de los microtubérculos aéreos como efecto del contenido de sustancias de reserva en las plantas. Ranalli (1997) en los cultivares de papa Red Pontiac y Shepody reporta que los microtubérculos producidos crecieron en la parte aérea de las plantas sobre el medio de cultivo.

Sarkar (2008) plantea que la reducción de los niveles de giberelinas, se acompañan de cambios en la morfología, metabolismo y la expresión de genes en las hojas de plantas inducidas a tuberizar. Así mismo, Orbe (2014) destaca que el inductor de crecimiento GA₃ utilizado en la fase de multiplicación favoreció al crecimiento y desarrollo de las plántulas en medio líquido lo que aparentemente parece generar mayor engrose de los microtubérculos, situación similar a lo ocurrido con la variedad Banba.

4.2. Fase de microtuberización

Los microtubérculos son semilla de papa en miniatura y representan una fase intermedia entre las plantas *in vitro* y los minitubérculos. Estudios del metabolismo de los carbohidratos en los tubérculos se han beneficiado con la utilización de sistemas de microtubérculos demostrando que la sacarosa es el sustrato externo de carbono obligatorio para la inducción y desarrollo de microtubérculos (Leclerc *et al.*, 1994).

Los microtubérculos se obtienen de forma aséptica en medios de cultivo definidos y en un ambiente controlado. Por ello, son un modelo atractivo para estudios bioquímicos y fisiológicos sobre la tuberización (Veramendi *et al.*, 1999).

La inmersión temporal es una opción valiosa para la producción de microtubérculos de papa. La técnica no sólo induce más tubérculos por planta que en medio de cultivo sólido, sino que también aumenta el tamaño y el peso de los tubérculos (Igarza *et al.*, 2011).

4.2.1. Microtubérculos producidos por planta

Producto de la falta de luz las plantas presentaron senescencia y la reserva de agua, nutrientes y otros compuestos orgánicos fueron empleados en una rápida formación de los microtubérculos según lo observado por Gopal *et al.*, (1998) que reportan una tasa más rápida de microtuberización acompañada de una senescencia temprana de las plántulas por efecto de la oscuridad.

A medida que se incrementó la concentración de sacarosa que se agregó en combinación con 0 y 1 mg l⁻¹ de BAP, también se incrementó la media de microtubérculos por planta. Únicamente en el medio que contenía 1 mg l⁻¹ de BAP con 110 g l⁻¹ de sacarosa la media de microtubérculos por planta alcanzó una media de 1 (Cuadro 5).

Los microtubérculos de Banba formados en los BEIT en condiciones de oscuridad crecieron en la parte aérea de las plantas sobre el medio de cultivo y presentaban lenticelas grandes en el peridermo (Figura 4). Esta respuesta resultó similar a lo observado por Ranalli (1997) en los cultivares de papa Red Pontiac y Shepody, quién además destaca que en condiciones de fotoperiodos 16 h luz y 8 de oscuridad, la formación de microtubérculos ocurrió dentro de los medios de cultivo mostrando lenticelas muy prominentes en comparación con los formados por encima del medio.

Huamán (1986) afirma que en la superficie de la piel de los tubérculos de papa se encuentran distribuidas las lenticelas por las cuales se efectúa el intercambio de gases entre el tubérculo y el ambiente. En condiciones húmedas, las lenticelas aumentan de tamaño y se ven como puntos blancos prominentes. Donnelly *et al.*, (2003) reportan que en presencia de BAP y cloruro de cloro colina (CCC) en los medios de cultivo en el cultivar Desiree provocaron la elongación de los tubérculos, reducción del número de ojos (yemas), aumento del tamaño de lenticelas y desorganización del periderma.

Rivera *et al.*, (2008) observaron que, en algunas accesiones de papa estudiadas, aunque presentaron buena producción de microtubérculos, estos mostraron hiperhidratación en medios de inducción de la microtuberización y de consistencia líquida. Además, observaron una reducción en el número de yemas, aumento en el tamaño de las lenticelas y formación de "callosidad" sobre el periderma de los microtubérculos; que al parecer estuvieron relacionadas con concentraciones de los inductores de tuberización BAP/CCC, principalmente en la dosis alta o cuando se empleó solamente CCC.

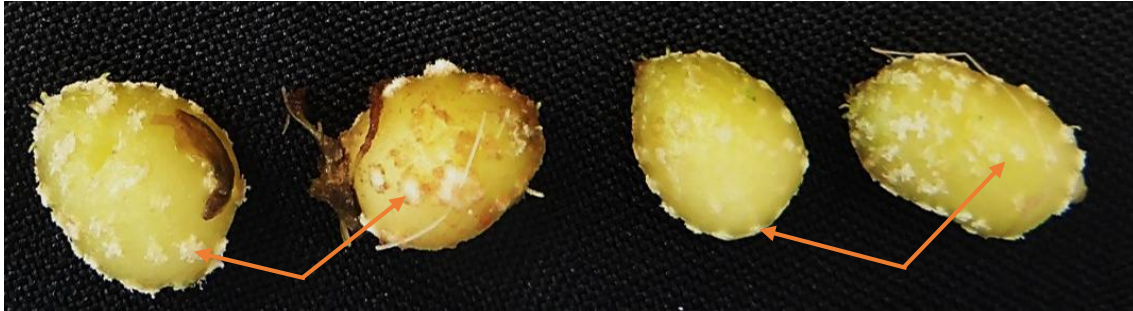


Figura 4. Microtubérculos del cultivar Banba con lenticelas como puntos de color blanco que favorece al intercambio gaseoso

4.2.2. Diámetro de los microtubérculos

Todos los medios de cultivo con excepción del medio de cultivo MS más 1 mg l^{-1} BAP más 80 g l^{-1} resultaron con diámetros de microtubérculos estadísticamente similares (Cuadro 5).

Comparando estos resultados con la información recopilada por Orbe (2014), que presentó un diámetro promedio de 0.52 cm , con un alargamiento de los microtubérculos y ciertas deformaciones en la variedad Superchola atribuidos al regulador de crecimiento BAP, lo que repercutió en el pequeño tamaño de los microtubérculos. En el cultivar Banba se produjeron microtubérculos de mayor diámetro y presentaron una forma esférica, como se observa en la figura 5.



Figura 5. Tamaño de los Microtubérculos del Cultivar Banba en la fase final

Moreno (2012) estudió el efecto de la composición del medio de cultivo y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa, cuyos resultados arrojaron en la producción de microtubérculos en la variedad Arbolona negra, un diámetro promedio de 0.38 cm para 1 mg l⁻¹ de BAP y 8 horas luz, mayor a la registrada en el mismo experimento para 1 mg l⁻¹ de BAP y 24 horas luz; la variedad Granola mostró diámetros promedio de 0.56 cm en 1 mg l⁻¹ de BAP y 24 horas luz. Ambos resultados menores a los mostrados por la variedad Banba, ambos experimentos fueron realizados a 8 semanas de duración, con la diferencia de la presencia de sacarosa y ausencia de luz total en el experimento con la variedad Banba.

Piedra (2014) concluyó tras haber utilizado 80 g l⁻¹ que la sacarosa es el mejor inductor de tuberización promoviendo un mayor número de microtubérculos, con un mejor diámetro, así como mejores pesos fresco y seco, reportando mejores resultados en diámetros de 0.55 cm y 0.43 cm para las variedades INIAP-Victoria y Superchola respectivamente, diámetros que resultaron inferiores a los logrados con el cultivar Banba cuando se empleó la misma cantidad de sacarosa y se incrementó cuando se suministraron mayores cantidades de sacarosa al medio de cultivo (Cuadro 5).

Khuri y Moorby J (1995) y Akita y Takayama (1994) recomiendan que a los biorreactores se les deben adicionar concentraciones relativamente altas 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. La hidrólisis de la sacarosa conduce a la producción de cantidades iguales de glucosa y fructosa, sin embargo, la concentración de glucosa es siempre inferior a la concentración de fructosa, lo que sugiere que la papa tiene una mayor preferencia por la absorción de glucosa que fructosa (Yu *et al.*, 2000).

4.2.3. Longitud de los microtubérculos

Con adiciones de 1 mg l⁻¹ de BAP combinadas con 100 y 110 g l⁻¹ de sacarosa, se obtuvieron medias de longitud de microtubérculos que superaron significativamente a las medias logradas en las otras variantes de medio cultivo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de la sacarosa y el BAP en promedio, diámetro y la longitud de los microtubérculos.

Variante del medio	BAP (mg l ⁻¹)	Sacarosa (g l ⁻¹)	Número de microtubérculos por planta	Diámetro (cm)	Longitud (cm)
1	0	80	0.76	0.73 ab	0.91 b
2	1	80	0.77	0.68 b	0.80 c
3	1	90	0.83	0.77 ab	0.91 bc
4	1	100	0.95	0.86 ab	1.06 a
5	1	110	1.02	1.05 a	1.02 ab

Sakha *et al.*, (2004) reporta el número de microtubérculos por planta en promedios, ya que producto de la etiolación que sufren las plantas al estar en condiciones de oscuridad no es posible determinar a qué planta pertenece cada tubérculo.

De acuerdo con Jaramillo *et al* (2012) para cuatro variedades de papa la mejor longitud de microtubérculo lo presentó el tratamiento que consistía en 8 horas luz, bencilaminopurina y CCC con 0.28 cm, inferior a los resultados de la variedad Banba en los ensayos, que registraron una longitud entre los 0.80 cm y 1.06 cm.

Medina *et al.*, (2012) mencionan que el CCC evita el crecimiento vegetativo excesivo, favorece los atributos de calidad de raíces tuberosas, sin afectar el rendimiento y mejora el índice de cosecha, sin embargo, el cultivar Banba se obtuvo buena longitud de los microtubérculos con la adición de sacarosa y BAP.

4.2.4. Peso fresco de microtubérculos

Medios con combinaciones de 1 mg l⁻¹ de BAP con 80 y 90 g l⁻¹ de sacarosa produjeron mayor porcentaje de microtubérculos con peso fresco menor de 0.4 g. En cambio, adiciones de 1 mg l⁻¹ de BAP con 100 y 110 g l⁻¹ de sacarosa produjeron mayor porcentaje de microtubérculos con peso fresco mayor a 0.6 g (Figura 6).

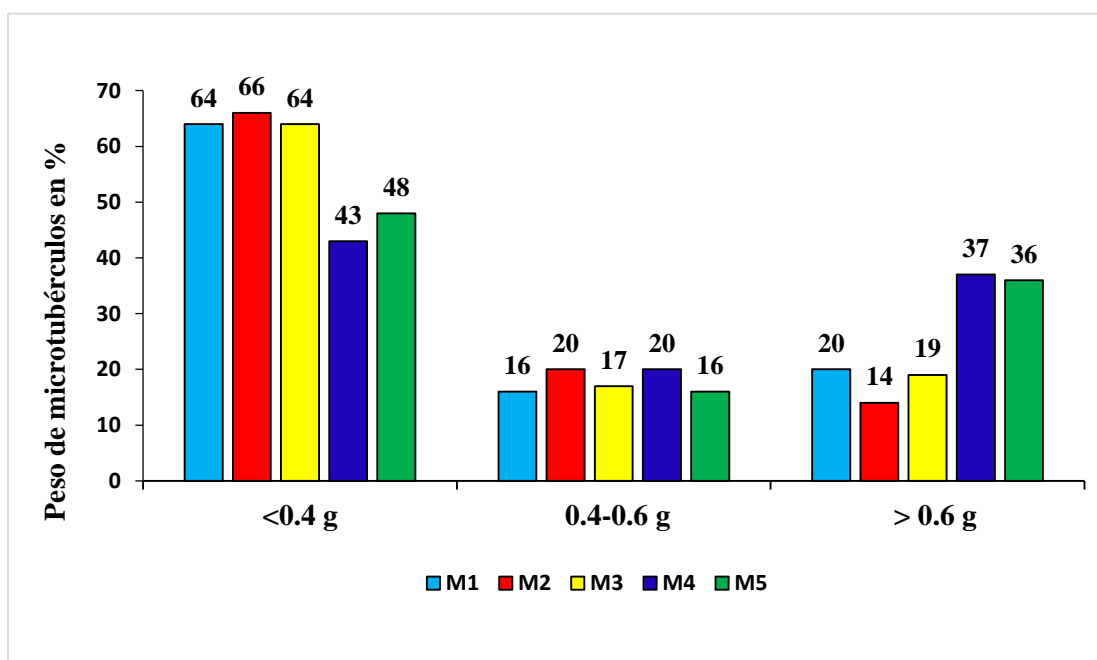


Figura 6. Comportamiento de los microtubérculos del cultivar Banba de tres categorías de peso fresco producidos en cinco concentraciones de sacarosa combinadas con 1 mg l⁻¹ de BAP cada una

Los resultados obtenidos de la cultivar Banba muestran que se obtuvieron pesos similares a los registrados por Moreno (2012) y Piedra (2014) lo que resalta la importancia de la sacarosa como inductor en el peso fresco de los microtubérculos.

V. CONCLUSIONES

El medio de cultivo MS más 0.10 mg l⁻¹ de GA₃ y 0.50 mg l⁻¹ resultó consistentemente con plantas con valores significativamente superiores en altura de planta, número de entrenudos, número de hojas y número de brotes axilares por planta.

El medio de cultivo MS más 1 mg l⁻¹ de BAP y 110 g l⁻¹ de sacarosa, resultó consistentemente superior estadísticamente en número de microtubérculos por explante, diámetro, longitud y peso fresco de los microtubérculos, estos con forma esférica.

VI. RECOMENDACIONES

Realizar ensayos con el propósito de evaluar diferentes frecuencias y tiempos de riego en los BEIT con un sistema automatizado.

Renovar el medio de cultivo en la microtuberización a las dos semanas con el fin de retardar la hidrólisis de la sacarosa.

Valorar los rendimientos y comportamiento ante plagas y enfermedades de los microtubérculos del cultivar Banba en siembra directa en campo.

VII. LITERATURA CITADA

- Aguilar, M. y Cruz, R. 2013. Empresa de producción de semilla de papa (*Solanum tuberosum* L.) de alta calidad genética y fitosanitaria para mejorar el nivel de vida y la actividad económica y productiva de agricultores de los departamentos de Estelí, Matagalpa y Jinotega. Proyecto de Innovación "Empresa de producción de semilla de papa (*Solanum tuberosum* L.)". Pp. 4-9. Managua, Nicaragua.
- Akita, M. y Takayama, S. 1994. Induction and development of potato. Tubers in a jar fermentor. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 36: 177-182.
- Arellano, M.; Villavicencio G.; y García, S. 2010. Producción de plántulas y semilla prebásica de variedades comerciales de papa libres de enfermedades. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México.
- Donnelly, D; Coleman, W.; y Coleman, S. 2003. Potato microtuber production and performance: A review. *Am Potato J* 80:103-115.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la alimentación). 2008. El mundo de la Papa. (en línea) FAOSTAT. Consultado el 25 de marzo 2015. Disponible en <http://www.fao.org/potato-2008/es/mundo/>.
- Gopal, J; Minocha J.L.; Dhaliwal H.S. 1998. Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Rep.* pp. 17:794–798.
- Huamán, Zósimo. 1986. Botánica sistémica y morfología de la papa Lima, Perú. *Boletín de información técnica* 6. Pág. 14- 23.
- Igarza, J.; Agramonte, D.; De Feria, M.; Jaime J.; y Pérez, M. 2011. Obtención de micro tubérculos de papa cv. "Andinita" en sistemas de Inmersión Temporal. pp. 1: 59-62. *Biotecnología Vegetal*.
- Jaramillo, S., A; Rivera G., M. de J.; Montaña R., H.; Lozano G., y J. J. 2012. Microtuberization *in vitro* of four potato varieties. (*Solanum tuberosum* L). Consultado el 4 de Enero de 2016. Disponible en <http://www.uaaan.mx/DirInv/Rdos2003/ecologia/microtuber.pdf>.

- Jiménez, E. 1999. Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) en sistema de inmersión temporal. Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. Consultado el 3 de Diciembre de 2015.
- Khuri, S. y Moorby, J. 1995. Investigations the role of sucrose in potato cv. Estima microtuber production in vitro. *Ann. Bot.*, 75: 295-303.
- Leclerc, Y.; D. Dolmelly; y J.E.A. Seabrook. 1994. Microtuberization of layered shoots and nodal cuttings of potato: The influence of growth regulators and incubation periods. *Plant Cell Tiss Org Cult.* pp. 37:113-120.
- Medina, R.; A. Burgos (ex aequo); V. Difranco; L. Mroginski; y P. Cenóz. 2012. Effects of chlorocholine chloride and paclobutrazol on cassava (*Manihot esculenta* Crantz cv. Rocha) plant growth and tuberous root quality. Disponible en http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-98X2012000100006.
- Molina, J. D.; Mairena S., B.; Aguilar B., L. 2004. Guía MIP en el cultivo de la papa. Cenida. Disponible en <http://cenida.una.edu.ni/relectronicos/RENH10M722.pdf>.
- Moreno P. y M. C. 2012. Efecto de la Composición del Medio de Cultivo y del Fotoperiodo sobre la Producción de Microtubérculos de Papa (*Solanum tuberosum* L.). Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Escuela de Biología. Caracas, Venezuela. Disponible en <http://saber.ucv.ve/jspui/bitstream/123456789/8159/1/Tesis%20Mayel%C3%AD%20Carolina%20Moreno.pdf>.
- Muñoz, G. D. 1996. Propagación *in vitro* y microtuberización de cultivares de *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum* Hawkes en medios líquidos. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. Valdivia.
- Orbe V., K. 2014. Estación Experimental Santa Catalina, Departamento Nacional de Biotecnología. Quito, Ecuador. Disponible en: <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/549/1/iniapscIABIOTECNOLOGIA2014.pdf>.

- Oropeza, M. P. 2012. Efecto de la composición del medio del cultivo y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa *Solanum tuberosum*. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias.
- Pérez, N. M.; Restrepo, D. C.; García, J. D.; y Giraldo, D. R. 2008. Tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.), variedad Diacol Capiro, en biorreactores de inmersión temporal y evaluación de su comportamiento en campo. Universidad Católica de Oriente, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Maracabo, Venezuela: CIENCIA.
- Piedra B., M. A. 2014. Evaluación de la micro tuberización de los cultivares de papa INIAP-victoria y Superchola, bajo sistemas de inmersión temporal. Universidad Central de Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. Quito, Ecuador. Disponible en <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/2490/1/T-UCE-0004-68.pdf>.
- Ranalli, P. 1997. Innovative propagation methods multiplication programmes. In: Potato Research 40 (1997). pp. 439 – 453.
- Rivera, Á. L, Valbuena, R. I, Hidalgo, R., y Moreno, J.D. 2008. Microtuberización *in vitro* de siete accesiones de papa de la colección central colombiana. En: Acta Agron. v.57 no.3 Palmira Colombia. 175-180.
- Sakha B M.; Bhatia A K.; y Batra V K. 2004. *In vitro* microtuberization in Potato (*Solanum tuberosum* L) cultivars. Department de vegetable Science. Agricultural University. In: India. J Exp Biol. 42 (12):1245-7.
- Sánchez y Rocha. 2015. Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L), cultivar Servane en Biorreactores económicos de inmersión temporal. Managua, Nicaragua. NIC. Pág. 58.
- Sarkar, D. 2008. The signal transduction pathways controlling in planta tuberization in potato: an emerging synthesis. Plant Cell Rep. 27: 1-8.
- Srivastava, A. K.; Diengdoh, L. C.; Rai, R.; Bag T. K. P. y Singh B. 2012. *In vitro* Micropropagation and Microtuberization Potential of Selected Potato Varieties. Indian Journal of Hill Farming 25(2):14-17.
- Teisson, C. y D. Alvarado, 1997. Técnicas de Avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas. BIOVEG 1997, Libro de Resúmenes. Pp. 25 – 26.

- Veramendi, J.; Willmitzer, L.; y Trethewey, R.N. 1999. In vitro grown potato microtubers are a suitable system for the study of primary carbohydrate metabolism. *Plant Physiol Biochem*, 37: 693-697.
- Yu, W.C.; Joyce, P.J.; Cameron, D.C.; y McCown, B.H. 2000. Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. *Plant Cell Rep.*, 19: 407-413.