

II REUNION NACIONAL SOBRE RECURSOS FITOGENETICOS

COLECCION, CONSERVACION,
EVALUACION, UTILIZACION,
CONTEXTO INTERNACIONAL



MEMORIAS

MEMORIAS DE LA
II REUNION NACIONAL SOBRE
RECURSOS FITOGENETICOS

E D I T O R E S:

R. CASTILLO, C. TAPIA y J. ESTRELLA
Departamento de Recursos Fitogenéticos
Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
Casilla 340

Quito - Ecuador
1991

**MEMORIAS DE LA II REUNION NACIONAL
SOBRE RECURSOS FITOGENETICOS**

Editores: Raúl Castillo, César Tapia y Jaime Estrella

Primera Edición: - Septiembre de 1991

Levantamiento del texto: - Rita Benitez

Impresión: - Empresa Editora Porvenir
Av. Colombia 248
Quito - Ecuador

Carátula: - Poster de la Reunión

© 1991 Departamento de Recursos Fitogenéticos - INIAP
Registro Nacional de Derechos de Autores No. 005890
ISBN 9978-82-151-1

PRODUCCION DE MICROTUBERCULOS IN VITRO DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.)

J. Estrella, R. Castillo, D. Estrella, G. García
Est. Exp. Santa Catalina - INIAP
Casilla 340, Quito - Ecuador

INTRODUCCION

El mayor problema para los agricultores es la obtención de semilla de papa de buena calidad y libre de patógenos, principalmente virus. Frente a ello, el INIAP ha desarrollado un modelo de certificación de semilla de papa, a partir de plantas propagadas *in vitro*, las mismas que se someten a multiplicación acelerada en invernadero, para obtener gran cantidad de esquejes y trasplantarlos al campo. En atención a las cualidades especiales de los microtubérculos, tales como su capacidad de producir plántulas vigorosas y su facilidad de transporte y manejo en invernadero, se estimó conveniente incorporar la tuberización *in vitro* para optimizar el esquema de producción acelerada de semilla de papa, libre de virus. Se plantearon cinco objetivos: 1) Producir microtubérculos libres de virus y otros patógenos a partir del cultivo *in vitro* de plantas de papa; 2) Determinar el tipo de recipiente óptimo para la elongación de yemas y la tuberización *in vitro*; 3) Determinar el mejor balance hormonal de los medios de inducción a tuberización; 4) Determinar el mejor método para interrumpir la dormancia y estimular la brotación; y, 5) Estudiar la tuberización *in vitro* como una técnica para la conservación de germoplasma.

MATERIALES Y METODOS

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de INIAP-"Santa Catalina" y abarcó tres fases: Elongación de Yemas, Tuberización y Ruptura de Dormancia

El material vegetal empleado provino de plántulas *in vitro* de alta calidad, libres de patógenos y virus. Cada plántula fue segmentada en sus respectivos nudos, eliminándoles su hoja, para luego sembrarlos en tubos de ensayo con medio de propagación. El material así micropropagado se mantuvo en cuarto de cultivo a 19.5°C, con 16 horas de fotoperíodo de 4000 lux de intensidad. Luego de 2 meses, a las plántulas jóvenes obtenidas se les eliminó el ápice, raicillas y hojas para obtener segmentos de tallo con 5 yemas activas. Estos explantes se sometieron a elongación, sembrando 6 segmentos con 5 nudos en recipientes conteniendo 15 ml de medio de elongación. Estas unidades experimentales se mantuvieron durante 21 días bajo las mismas condiciones ambientales descritas anteriormente.

Producción de microtubérculos de papa

A las tres semanas de elongación, las plántulas se sometieron a tuberización *in vitro*, para lo cual se retiró completamente el medio de elongación remanente de cada recipiente, y se lo sustituyó por 20 ml de medio de inducción a tuberización previamente esterilizado. En esta fase se probó tres tipos de recipientes: matraces Erlenmeyer de 250 ml, magentas de 360 ml y frascos Gerber de 450 ml; igualmente, se estudió tres medios de inducción a tuberización, los cuales contenían Cloruro de Clorocolina (CCC), 500 ppm; Coumarina, 25 ppm; y, Acido Abscísico (ABA), 1 ppm, como inductores, respectivamente. Las variedades en estudio fueron INIAP-Santa Catalina, INIAP-Esperanza e INIAP-Maria.

Todas las unidades experimentales se transfirieron a termostatos biológicos (incubadoras) con total oscuridad; 20° C constantes; humedad relativa similar a la del cuarto de cultivo; y, entrada y salida libres para O₂ y CO₂. A los 80 días los microtubérculos presentaron su máximo engrosamiento y se procedió a la cosecha y toma de datos. Inmediatamente se almacenaron en refrigeración a 7°C.

Además, se estudió tres métodos para interrumpir la dormancia: 1) Corte de Microtubérculos, que consistió en una incisión con bisturí en la superficie de los mismos y su inducción a brotación en medio de cultivo sólido con GA3 (0.25 ppm); 2) Método F-F-C, que incluyó dos períodos de frío a 7°C (el primero de ellos con fotoperíodo de 4 000 lux), y luego un período de calor de 19°C; y, 3) Método F-C, que es el más sencillo e incluye un período de bajas temperaturas (7°C) y luego uno de calor (19°C).

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Fase de Elongación de Yemas

Las variedades INIAP-Maria e INIAP-Esperanza son las que producen mayor cantidad de tallos, alcanzando promedios de 28.91 y 28.27 tallos por recipiente, respectivamente (Cuadro 1). Por otro lado, los frascos Gerber demostraron ser los más eficientes en esta fase, pues permiten la elongación del mayor número de tallos, así como los de mayor longitud (Cuadro 1).

Producción de microtubérculos de papa

CUADRO 1. Promedios y Prueba de Tukey al 5% para variedades y recipientes en las variables de la Fase de Klóngación de Yemas.

FACTORES	VALORES PROMEDIOS	
	NUMERO DE TALLOS ANTES DE LA INDUCCION	LONGITUD MEDIA DE TALLOS (mm)
v1: Santa Catalina	26.41 b	83.83 a
v2: Esperanza	28.27 a	81.24 a
v3: María	28.91 a	71.89 b
r1: Matraz Erlenmeyer	27.19 b	74.02 b
r2: Magenta	27.98 ab	73.73 b
r3: Frasco Gerber	28.42 a	89.21 a

2. Fase de Tuberización

El medio de inducción con Coumarina propició las mejores respuestas para la tuberización *in vitro*. En este medio, el número y peso de microtubérculos por recipiente y el porcentaje de tuberización presentan los más altos valores: 16.67, 0.93 g y 59.90%, respectivamente (Cuadro 2).

Los matraces Erlenmeyer demostraron ser los recipientes óptimos, pues, al usarlos, se redujeron los problemas por contaminación y se obtuvieron los máximos rendimientos (Cuadro 2).

Producción de microtubérculos de papa

CUADRO 2. Promedios y Prueba de Tukey al 5% para variedades, medios y recipientes en la Fase de Tuberización de Papa.

FACTORES	VALORES PROMEDIOS		
	NUMERO DE MICRO-TUBERCULOS POR RECIPIENTE	PESO DE MICRO-TUBERCULOS POR RECIPIENTE (g)	PORCENTAJE DE TUBERIZACION (%)
v1: Santa Catalina	19.83 a	0.81 b	75.23 a
v2: Esperanza	8.70 b	0.44 c	30.87 c
v3: Maria	18.87 a	1.27 a	65.33 b
m1: Medio con CCC	15.70	0.82 ab	57.95
m2: Medio con Comarina	16.67	0.93 a	59.90
m3: Medio con ABA	15.03	0.77 b	53.58
r1: Matraz Erlenmeyer	19.38 a	0.96 a	71.83 a
r2: Magenta	14.13 b	0.76 b	51.10 b
r3: Frasco Gerber	13.88 b	0.80 b	48.51 b

3. Fase de Ruptura de Dormancia

El Método de Corte de Microtubérculos provoca la brotación más precoz, con un promedio de 23 días desde la cosecha (Cuadro 3). Los Métodos F-F-C y F-C demostraron ser menos efectivos para la ruptura de dormancia (45 y 50 días, respectivamente). Además, el Corte de Microtubérculos estimula la emisión de los brotes más vigorosos y produce los más altos porcentajes de brotación (Cuadros 4 y 5).

Producción de microtubérculos de papa

CUADRO 3. Prueba de Tukey al 5% para variedades y métodos en la variable días a la brotación de los microtubérculos.

FACTORES	VALORES PROMEDIOS (días desde la cosecha)
v3: María	30.11 a
v1: Santa Catalina	41.72 b
v2: Esperanza	45.94 c
d1: Corte microtubérculos	23.06 a
d2: Método F-F-C	45.06 b
d3: Método F-C	49.67 c

CUADRO 4. Prueba de Tukey al 5% para variedades y métodos en la variable vigor del brote y los microtubérculos.

FACTORES	VALORES PROMEDIOS		
	EVALUACION A LOS 55 DIAS	EVALUACION A LOS 70 DIAS	EVALUACION A LOS 85 DIAS
v3: María	3.17 a	3.94 a	4.00 a
v2: Esperanza	1.39 c	2.83 b	3.17 b
v1: Santa Catalina	1.89 b	2.78 b	3.06 b
d1: Corte microt.	3.78 a	4.00 a	4.00 a
d2: Método F-F-C	1.56 b	2.78 b	2.94 c
d3: Método F-C	1.11 c	2.78 b	3.28 b

* Calificación usando la escala: 0 = sin brotación, 1 = malo
2 = vigor regular, 3 = bueno, 4 = vigor excelente.

Producción de microtubérculos de papa

CUADRO 5. Prueba de Tukey al 5% para variedades y métodos en la variable porcentaje de brotación.

FACTORES	VALORES PROMEDIOS (%)		
	EVALUACION A LOS 60 DIAS	EVALUACION A LOS 70 DIAS	EVALUACION A LOS 80 DIAS
v3: María	94.72 a	97.22 a	98.89 a
v2: Esperanza	77.78 b	91.67 ab	94.72 ab
v1: Santa Catalina	80.00 b	86.11 b	91.39 b
d1: Corte microt.	94.17 a	97.50 a	98.89 a
d2: Método F-F-C	81.39 b	91.39 ab	94.44 ab
d3: Método F-C	76.94 b	86.11 b	91.67 b

La técnica de la tuberización *in vitro* demostró ser otra alternativa adecuada para la conservación de germoplasma. Los microtubérculos producidos entran luego de la cosecha en un período de dormancia, que permite preservar a mediano plazo un amplio rango de variabilidad genética.

En el presente estudio se almacenaron microtubérculos en condiciones de completa oscuridad y a 7°C. Luego de 18 meses, dichos tubérculos *in vitro* habían desarrollado brotes muy alargados, los cuales permitieron obtener plántulas de papa vigorosas. Este material vegetal se puede destinar a los procesos de micropropagación, al trasplante a invernadero, o bien para el intercambio de germoplasma.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La tuberización *in vitro* debe emplear el Medio de Inducción con Coumarina y los matraces Erlenmeyer para propiciar los mejores rendimientos.
- Los frascos Gerber y las magentas constituyen una alternativa más económica. Su uso también es recomendable cuando es imperativo el ahorro de espacio físico y tiempo.
- Para incorporar rápidamente los microtubérculos a los esquemas de producción de semilla debe aplicarse el Método de Corte.

Produccion de microtubérculos de papa

- Las plántulas obtenidas mediante el Método de Corte pueden destinarse directamente al trasplante a invernadero; o bien, pueden servir como material de micropropagación.
- La producción masiva de microtubérculos permitirá abarcar en mayor proporción la demanda de semillas.
- La dormancia *in vitro*, adecuadamente manejada, permite la conservación a mediano plazo (18 meses) de germoplasma cultivado y silvestre.
- Los microtubérculos son material idóneo para el intercambio de germoplasma, toda vez que su período de dormancia los protege de problemas ambientales (transporte y almacenamiento prolongados, desaduanización, etc.).
- La tuberización permitiría detectar clones tolerantes al estrés por calor, a fin de determinar variedades para clima caliente.

BIBLIOGRAFIA

- Centro Internacional de la Papa. World potato facts. Lima. 1982 p. 3.
- Chandra, R., Dodds, J. y Tobar P. *In vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.): A review. s.n.t. 17 p.
- Estrada, R., Tovar, P. y Dodds, J. Induction of *in vitro* tubers in a broad range of potato genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 7 (1): 3 - 10. 1986.
- Ewing, L., Mc Murry, S y Ewing, E. Cutting as a method of breaking dormancy in microtubers produced *in vitro*. American Potato Journal 64(5): 329-332. 1987.
- Koda, y. y Okazawa, Y. Influences of environmental hormonal and nutritional factors on potato tuberization *in vitro*. Japanese Journal of Crop Science 52 (4): 582 - 591. 1983.
- Li, H., P. Potato physiology. New York, Academic Press, Inc., 1985. pp. 544 - 550.
- Staritsky, G. *In vitro* storage of aroid germplasm. Plant Genetic Resources Newsletter, IBPGR. 42(1) 25 - 27. 1980.