

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
Escuela de Ingeniería Agronómica**

**EVALUACIÓN DE LA MICROTUBERIZACIÓN DE LOS CULTIVARES DE PAPA
INIAP - VICTORIA Y SUPERCHOLA, BAJO SISTEMAS DE INMERSIÓN
TEMPORAL**

**TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
AGRÓNOMA**

MARÍA AUGUSTA PIEDRA BURBANO

**QUITO – ECUADOR
2014**

7. RESUMEN

En la actualidad la producción de semilla de categorías iniciales se la hace a través de plántulas *in vitro*, generando muchas de las veces grandes pérdidas de material vegetal por el difícil manejo de estas en lo relacionado a transporte, manipulación y traslado, que puede acarrear desecación y muerte de las mismas, por lo que se buscan nuevas técnicas que permitan solucionar este inconveniente; una de ellas es la producción de microtubérculos que provoca ventajas en el almacenamiento y transporte de tubérculos libres de patógenos, mayor facilidad en el manejo de estos 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, (Jiménez *et al.*, 2001). Las técnicas de microtuberización por métodos convencionales presentan varias limitantes relacionadas principalmente con un bajo número de microtubérculos y el pequeño tamaño de los mismos, lo que limita la plantación directa en condiciones de campo, el alto uso de mano de obra calificada y la escasa posibilidad de automatización de los procesos, esto sin duda, incrementa los costos de producción, (Jiménez *et al.*, 2001). Las investigaciones realizadas sobre la microtuberización con el uso de sistemas de inmersión temporal demuestran que esta es una técnica óptima para la producción de semilla, dado que, posibilita un mayor contacto de la biomasa vegetal con el medio de cultivo, la existencia de un intercambio gaseoso y la posibilidad de controlar la composición del medio y de la atmósfera, reflejándose estas características en un mayor número de microtubérculos, en la calidad y en el aumento del tamaño y peso de los mismos, que a su vez permiten reducir los costos de producción (Ziv, 1995). La técnica de inmersión temporal asociada a la producción masiva de microtubérculos *in vitro*, es una alternativa a los actuales métodos de propagación masiva de esta especie así como, para la introducción de nuevos genotipos. Esta técnica consiste básicamente en colocar los explantes de papa en uno de los frascos y en el otro se coloca el medio de cultivo líquido, este es transferido en una frecuencia y periodo de tiempo específico hacia el frasco que contiene los explantes; transcurrido un tiempo se cambia el medio de crecimiento por medio un de tuberización (Paredes, 2005). Las variedades que fueron utilizadas en esta investigación son de mucha importancia para el INIAP, en el caso de Superchola, esta es una de las variedades de gran demanda comercial, por sus características tanto agronómicas como culinarias, por lo que se necesita generar gran cantidad de semilla e INIAP-Victoria al ser una variedad recientemente lanzada por el Instituto, requiere un mayor impulso y difusión, debido a sus excelentes cualidades con respecto a su tolerancia a *Phytophthora infestans*, precocidad y alto rendimiento (INIAP, 2011). Para lograr una microtuberización eficiente en la actualidad se están usando inductores de tuberización, los cuales permiten aumentar el número de microtubérculos obtenidos, entre los más usados se encuentran el ácido jasmónico, la sucrosa y el cloruro de clorocolina. La validación de esta tecnología en dos cultivares de papa de gran demanda, permitirá innovar en el corto plazo el sistema de producción de semilla pre-básica a partir de plantas *in vitro*. Por lo expuesto anteriormente, se plantearon los siguientes objetivos: evaluar la respuesta de la microtuberización de los cultivares de papa INIAP- Victoria y Superchola, utilizando el Sistema de Inmersión Temporal y evaluar la eficiencia de tres inductores de tuberización a dos dosis en la microtuberización de dos cultivares de papa.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional

Autónomo de Investigaciones Agropecuarias ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Mejía, parroquia de Cutuglahua, altitud de 3058 m s.n.m.

Los factores en estudio fueron: Cultivares c1= INIAP – Victoria y c2= Superchola; Inductores de Tuberización i1= sacarosa, i2= ácido jasmónico e i3= cloruro de clorocolina; Dosis para sacarosa d alta= 80 000 mg/litro y d baja= 40 000 mg/litro; para el ácido jasmónico d alta= 1.05 mg/litro y d baja= 0.105 mg/litro y para el cloruro de cloro colina d alta= 500 mg/litro y d baja= 250 mg/litro.

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar con un arreglo factorial 2x3x2 que se dispuso en tres observaciones por cada tratamiento. La unidad experimental estuvo conformada por dos frascos transparentes de tres litros de capacidad interconectados por mangueras de silicona, el primero contenía 250 ml de medio de cultivo líquido y el otro frasco contenía diez brotes con seis yemas cada uno.

Las variables estudiadas fueron: número de microtubérculos, diámetros de los microtubérculos, peso fresco, peso seco y la relación peso fresco/peso seco.

El presente ensayo se lo manejó en tres etapas: la primera etapa incluyó la introducción de explantes de los cultivares de papa INIAP-Victoria y Superchola en medios semi-sólidos, posteriormente se realizó la micropropagación convencional de los brotes; al mismo tiempo se fue eliminando el material contaminado; en la segunda etapa se sembraron los explantes obtenidos de la micropropagación para someterlos al sistema de inmersión temporal, en un medio de cultivo de crecimiento; en la tercera etapa se cambió el medio de crecimiento por el medio de tuberización que contenía los diferentes inductores de tuberización (sucrosa, ácido jasmónico y cloruro de clorocolina) según el tratamiento y se tapó con fundas de color negro a los frascos que contenían a las plántulas dejándolos tuberizar.

El Sistema de Inmersión Temporal empleado fue el propuesto por Alvard *et al.*, en 1993, con algunas modificaciones, como recipientes se utilizaron frascos de vidrio transparente de tres litros de capacidad, los cuales se interconectaron por parejas mediante mangueras de silicona, en un frasco se colocó el medio de cultivo líquido y en el otro los brotes. Cada frasco se conectó a un sistema de entrada de aire proveniente de un compresor, el cual era accionado por un programador automático para el control de la frecuencia, la duración de las inmersiones, la luminosidad y el flujo de gases. El aire entrante o saliente se esterilizó a través de filtros hidrófobos con un diámetro de poro de 0.2 μm , de tal manera que cada recipiente se manipulo independientemente sin riesgos de contaminación. Todo el material fue previamente esterilizado en una autoclave a 121 ° C por 20 minutos.

Los explantes de papa se multiplicaron en medio líquido MS (Murashige y Skoog), que se suplementó con 2 ppm de pantotenato de calcio, y 30 % de sucrosa, el pH se ajustó a 5,56 antes de la esterilización a 121 ° C por 20 minutos. Para permitir el crecimiento de los explantes, éstos se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con luz artificial, a una temperatura de 20 \pm 2 °C y posteriormente se reemplazó este medio de cultivo líquido por otro, el cual contenía según fue el caso sucrosa, ácido jasmónico o cloruro de clorocolina en la dosis que correspondía al tratamiento y se procedió a tapar con fundas de color negro a cada uno de los frascos donde se encontraban las plántulas y se los mantuvo a una temperatura de 20 °C.

La frecuencia de inmersión en el SIT fue de 3 minutos cada 4 horas (Castro *et al.*, 2011) para la fase de crecimiento y de cada 3 minutos por 12 horas para la fase de tuberización (Paredes, 2004).

De la presente investigación se obtuvieron los siguientes resultados:

El mejor tratamiento para las variables número de tubérculos, diámetro, peso fresco y peso seco fue clinda (INIAP – Victoria con sacarosa a una dosis de 80 000 mg / litro), con promedios de 6.93 microtubérculos, 7.72 mm, 2.63 g y 1.35 g, respectivamente, el cultivar INIAP – Victoria respondió de mejor manera a la microtuberización con el uso de un Sistema de Inmersión Temporal; el uso del inductor de tuberización sacarosa dio mejores resultados debido a la mejor utilización de este por parte de la planta y su transformación en nutrientes lo que conllevó a un mejor diámetro y peso de los microtubérculos. Para la variable relación peso seco / peso fresco el mejor tratamiento fue c2i2da (Superchola con ácido jasmónico a una dosis de 1.05 mg / litro), con un promedio de 69.39 % de materia seca, debido a que el cultivar Superchola utiliza de mejor forma los nutrientes asimilados para convertirlos en materia seca.

Con base a lo anteriormente analizado se hicieron las siguientes recomendaciones:

Usar la sacarosa con inductor de tuberización a una dosis alta (80 000 mg / litro), ya que se lograron obtener los mejores resultados en cuanto al número de microtubérculos, el diámetro, peso fresco y seco.

Usar cultivares de la especie *tuberosum* en un Sistema de Inmersión Temporal ya que fueron los que mejor respuesta presentaron a la microtuberización.

8. SUMMARY

Currently seed production makes initial categories through *in vitro* plantlets, generating many times great loss of plant material for the difficult management of these in relation to transport, handling and transfer, which can lead to desiccation and death of them, so look for new techniques to overcome this problem, one of which is the production of microtubers which causes advantages in storage and transport of pathogen-free tubers, greater ease in handling these and possibility of planting without prior acclimatization, so it is possible to use this method of propagation as a possible technique for obtaining high seed potato plant quality (Jiménez *et al.*, 2001). Microtuberization techniques by conventional methods have several limitations mainly related to a low number of microtubers and the small size of them, limiting direct planting in field conditions, the high use of skilled labor and the limited possibility of process automation, this certainly increases production costs, (Jimenez *et al.*, 2001). Investigations into the microtuberization using temporary immersion systems show that this is an optimum technique for seed production because, allows greater plant biomass contacted with the culture medium, the existence of a gas exchange and the possibility of controlling the composition of the medium and the atmosphere, these characteristics reflected in a higher number of microtubers, the quality and increasing the size and weight thereof, which in turn can reduce the costs of production (Ziv, 1995). The temporary immersion technique associated with the mass production of microtubers *in vitro*, is an alternative to current methods of mass propagation of this species as well as for the introduction of new genotypes. This technique is basically potato explants placed on one of the bottles and the other is placed on the liquid culture medium, this is transferred to a frequency and time specific to the flask containing the explants; elapsed time is changing the growth medium through one of tuber (Walls, 2005). Varieties were used in this investigation are very important for INIAP Superchola in case this is a large varieties of commercial demand for agronomic characteristics such as cooking, so it needs to generate large amount of seed and INIAP - Victoria to be a variety newly launched by the Institute requires momentum and diffusion, due to its excellent properties with respect to their tolerance to *Phytophthora infestans*, earliness and high yield (INIAP, 2011). To achieve an efficient microtuberization currently being used tuberización inductors, which allow increasing the number of microtubers obtained, the most used are jasmonic acid, sucrose and chlorocholine chloride. The validation of this technology in two cultivars of potato demand, will innovate in the short run the production system pre-basic seed from plants *in vitro*. By the above, the following objectives were proposed: evaluating microtuberization response of potato cultivars and Superchola INIAP-Victoria, using the temporary immersion system and evaluate the efficiency of three tuber inducing two doses in microtuberization of two cultivars of potato.

The research was conducted at the Laboratory of Plant Tissue Culture National Department of Biotechnology, Santa Catalina Experimental Station of the National Institute of Agricultural Research Contract located in the province of Pichincha, Mejia canton, parish Cutuglahua, altitude of 3058 m.

The factors studied were: Cultivars c1 = INIAP - Victoria and c2 = Superchola; Tuberization Inductors i1 = sucrose, i2 = jasmonic acid and i3 = chlorocholine chloride; Dose sucrose d high = 80 000 mg/liter and d low = 40 000 mg/liter, for jasmonic acid d high= 1.05 mg/liter and d low = 0.105 mg/liter and chlorocholine chloride d high = 500 mg/liter and d low = 250 mg/liter.

We used a completely randomized design with a factorial 2x3x2 became available on three observations per treatment. The experimental unit was made up of two transparent glass bottles liter three interconnected by silicone tubing, the first containing 250 ml of liquid culture medium and the other vial contained ten buds sprout six each.

The variables studied were: number of microtubers, microtubers diameter, fresh weight, dry weight and the ratio fresh/dry weight.

This essay is handling it in three stages: the first stage included the introduction of explants of potato cultivars Superchola INIAP-Victoria and semi-solid media, subsequently performed conventional micropropagation of shoots and at the same time it was removing the contaminated material, the second stage seeded explants obtained for submission to micropropagation temporary immersion system in a growth medium, in the third stage the medium was replaced by growth medium containing the tuber different inducing tuberization (sucrose, jasmonic acid and chlorocholine chloride) by treatment and covered with black color covers the flasks containing the seedlings leaving tuberizar.

The Temporary Immersion System used was proposed by Alvard *et al.*, in 1993, with some modifications, as vessels used clear glass jars three-liter capacity, which are interconnected in pairs by silicone tubing in a bottle was placed the liquid culture medium and in the other outbreaks. Each bottle was connected to an air intake system from a compressor, which was driven by an automatic timer to control the frequency, the duration of the immersion, the brightness and the flow of gases. The incoming or outgoing air sterilized through hydrophobic filter with a pore diameter of 0.2 microns, so that each container is independently manipulated without risk of contamination. All material was previously sterilized in an autoclave at 121 °C for 20 minutes.

Potato explants multiplied in liquid MS (Murashige and Skoog) which supplemented with 2 ppm of calcium pantothenate, and 30 % sucrose, pH adjusted to 5.56 before sterilization at 121 °C for 20 minutes. To allow the growth of the explants, they were kept in a growth room under artificial light at a temperature of 20 ± 2 °C and subsequently replaced this liquid culture medium for another, containing as was the case sucrose, jasmonic acid or chlorocholine chloride in doses corresponding to treatment and proceeded to cover with black color covers each of the jars where they were seedlings and were kept at a temperature of 20 °C.

The frequency of immersion in the SIT is 3 minutes every 4 hours (Castro *et al.*, 2011) for the growth phase and once every 3 minutes for 12 hours for the phase of tuber (Smart, 2004).

In the present investigation the following results were obtained:

The best treatment for variables tuber number, diameter, fresh weight and dry weight was c1i1da (INIAP - Victoria with sucrose at a dose of 80 000 mg/liter), with averages of 6.93 microtubers, 7.72 mm, 2.63 g and 1.35 g respectively, cultivar INIAP - Victoria responded microtuberization best way to using a temporary immersion system, the use of sucrose tuber inducing gave better results due to the better utilization of this by the processing plant and its nutrient which led to a better diameter and weight of the microtubers and variable ratio dry weight/wet weight was the best treatment c2i2da (Superchola jasmonic acid at a dose of 1.05 mg/liter), with an average of 69.39 % of area dry because Superchola cultivar used to better assimilated nutrient to become dry matter.