



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL**

**Trabajo de Graduación**

**Producción de microtubérculos de papa (*Solanum  
tuberosum* L.), cultivar Burren en Biorreactores  
Económicos de Inmersión Temporal**

**AUTORES**

**Br. Mirna Indiana Ortiz Zelaya**

**Br. Johnston Erizaet Zeledón Rodríguez**

**ASESORES**

**MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga**

**Ing. Roxana Yadira Cruz Cardona**

**Managua- Nicaragua**

**Abril, 2016**



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL**

**Trabajo de Graduación**

**Producción de microtubérculos de papa (*Solanum  
tuberosum* L.), cultivar Burren en Biorreactores  
Económicos de Inmersión Temporal**

**AUTORES**

**Br. Mirna Indiana Ortiz Zelaya  
Br. Johnston Erizaet Zeledón Rodríguez**

**ASESORES**

**MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga  
Ing. Roxana Yadira Cruz Cardona**

**Presentado a la consideración del honorable tribunal examinador como  
requisito final para optar al grado de Ingeniero Agrónomo**

**Managua, Nicaragua  
Abril, 2016**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN		PÁGINA
	<b>DEDICATORIA</b>	<b>i</b>
	<b>AGRADECIMIENTO</b>	<b>iii</b>
	<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>v</b>
	<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>vi</b>
	<b>RESUMEN</b>	<b>vii</b>
	<b>ABSTRACT</b>	<b>viii</b>
<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
	Objetivo general	<b>4</b>
	Objetivo específicos	<b>4</b>
<b>III</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>5</b>
<b>3.1</b>	Ubicación del área de estudio	<b>5</b>
<b>3.2</b>	Esterilización de materiales y equipos	<b>5</b>
<b>3.3</b>	Establecimiento de ápices meristemáticos	<b>5</b>
3.3.1	Selección del material vegetativo	<b>5</b>
3.3.2	Preparación y desinfección del material vegetativo	<b>5</b>
3.3.3	Siembra <i>in vitro</i> del material vegetativo	<b>6</b>
<b>3.4</b>	Fase de multiplicación	<b>7</b>
3.4.1	Medios de cultivo	<b>8</b>
<b>3.5</b>	Microtuberización	<b>8</b>
3.5.1	Medios de cultivo	<b>8</b>
<b>3.6</b>	Brotación de yemas de microtubérculos	<b>10</b>
<b>3.7</b>	Diseño experimental y análisis estadístico	<b>11</b>
3.7.1	Experimento de fase de multiplicación	<b>11</b>
3.7.1.1	VARIABLES EVALUADAS	<b>12</b>
3.7.2	Experimento fase de microtuberización	<b>12</b>
3.7.2.1	VARIABLES EVALUADAS	<b>13</b>
3.7.3	Formación de plantas	<b>13</b>

3.7.3.1	VARIABLES EVALUADAS	13
<b>IV</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>14</b>
<b>4.1</b>	Fase de multiplicación	<b>14</b>
4.1.1	Efecto de los medios de cultivos en longitud y número de entrenudos por planta	<b>14</b>
4.2.1	Efecto de los medios de cultivos en el número de hojas y número de brotes axilares por planta	<b>14</b>
<b>4.3</b>	Fase de microtuberización	<b>16</b>
4.3.1	Peso fresco de microtubérculos	<b>17</b>
4.3.2	Diámetro de microtubérculos	<b>17</b>
4.3.3	Longitud de microtubérculos	<b>17</b>
<b>4.4</b>	Plantas formadas	<b>21</b>
<b>V</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>24</b>
<b>VI</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>25</b>
<b>VII</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>26</b>

## **DEDICATORIA**

Este trabajo de graduación se lo dedico a Dios por darme vida, salud, entendimiento y permitirme llegara hasta el día de hoy.

A mi padre Juan Ortiz Rugama y a mi madre Mirna Zelaya Siles que es el amor de mi vida y uno de mis más grandes tesoros, por brindarme todo su apoyo cariño y sobre todo por su confianza, por estar conmigo en cada uno de los momentos difíciles de mi carrera, por haberme dado su apoyo incondicional en cada día de mi vida por todos sus sacrificios para que yo pudiera alcanzar mi más grande sueño.

Quiero dedicar también a mis hermanos Luis Jiménez, Juan Ortiz y Rosario Flores por haberme apoyado y darme fuerzas en los momentos duros, a mis sobrinos Jonathan y Eliam Jiménez Masis.

**Br. Mirna Indiana Ortiz Zelaya**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de culminación de estudios, una etapa muy importante en mi vida primeramente a Dios todo poderoso creador y dador de vida, que medio cada suspiro de vida para poder llegar hasta donde estoy y poder culminar mis estudios.

A mi madre María Auxiliadora Rodríguez Romero, a mi padre Ronald Antonio Zeledón Aráuz, por ser los dos pilares donde siempre me sostuve después de Dios para poder finalizar mis estudios con su apoyo y consejos constantes y por siempre estar a mi lado en los buenos y malos momentos de todas mis etapas de estudios y vida y porque son mi mayor bendición.

Dedico este trabajo a mis asesores MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga e Ing. Roxana Yadira Cruz Cardona, por su apoyo y confianza que tuvieron en nosotros para concedernos este tema de tesis, también en agradecimiento a la Ing. Rosario Loáisiga por su amistad y apoyo en los trabajos dentro del laboratorio cuando más lo necesite.

A Mirna Indiana Ortiz Zelaya por confiar en mí al momento de seleccionarme como su compañero de tesis y por su amistad.

A Irayda Guadalupe Castillo Mena una persona muy especial en mi vida y querida por mi persona, además de ser una gran amiga y consejera, también por apoyarme siempre en los buenos y malos momentos.

**Br. Johnston Erizaet Zeledón Rodríguez**

## AGRADECIMIENTO

Primeramente quiero agradecer a DIOS, por el don maravilloso de la vida, por permitirme cumplir con cada fase de este trabajo.

A mis padres Juan Ortiz y Mirna Zelaya Siles, por ser los medios que utilizaste señor para darme el milagro de existir y sé que con gran esfuerzo, amor y dedicación han llevado con éxito la tarea de ser no solo excelentes padres, sino mis mejores amigos.

A mis Abuelos Cristina Rugama y Francisco Ortiz a mis sobrino, (Jonathan y Eliam Jiménez) mis hermanos (Luís Jiménez, Juan Ortiz y Rosario Flores). Que con su apoyo, comprensión, cariño y esfuerzo me motivaron a seguir adelante a pesar de las muchas dificultades que se nos presentaron a lo largo de mi carrera.

A mis asesores el Ing. MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga por su apoyo al guiarnos en nuestro trabajo y poder culminarlo de manera exitosa, por su paciencia y comprensión. A la Ing. Agr. Roxana Yadira Cruz Cardona por el apoyo brindado a lo largo de este trabajo de tesis.

A la Universidad Nacional Agraria, quien brindó los docentes necesarios para darme el pan de la enseñanza en mi formación profesional. A la Dirección de Vida Estudiantil por darme la oportunidad de gozar de beca externa los cinco años de mi carrera, ya que sin esta no hubiese sido posible estudiar.

A mi compañero de tesis Johnston Erizaet Zeledón Rodríguez por su apoyo, comprensión y amistad durante toda mi carrera.

A mi mejor amigo Carlos Manuel Rocha Tórrez por su amistad, cariño, sinceridad y su apoyo incondicional en los momentos más difíciles de mi vida. A mis amigas Rosario Flores García, Yaoscar Natalie Sánchez Machado y Carelia Moreno Centeno

**Br. Mirna Indiana Ortiz Zelaya**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco principalmente a Dios por darme la vida y fuerzas para ser constante y no dejarme vencer en todas estas etapas de estudios para poder llegar a este momento y finalizar mis estudios universitarios.

Agradezco a mis dos mayores bendiciones que Dios me ha dado, mi madre María Auxiliadora Rodríguez Romero y mi padre Ronald Antonio Zeledón Arauz por estar siempre a mi lado, apoyándome en todo momento y dando los mejores consejos para poder lograr mis metas y no caer en eslabones que pudieron irrumpir mi culminación de estudio.

A mis asesores MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga e Ing. Roxana Yadira Cruz Cardona por todo su apoyo y constancia en nuestro trabajo para lograr terminar nuestro trabajo académico uno de los principales requisitos para optar a nuestro título de Ingeniero Agrónomo y también agradezco a la Ing. Rosario Loáisiga por todo su apoyo y amistad.

A mi compañera de tesis Mirna Indiana Ortiz Zelaya, por su apoyo y amistad que me ha brindado desde que nos conocimos, a Carlos Manuel Rocha Torrez y Yaoscar Sánchez Machado también por su apoyo en todo este proceso.

Agradezco al MSc. Álvaro Benavides Gózales por su apoyo al momento de solicitar su ayuda en el análisis de datos a pesar de todo su arduo trabajo que presenta siempre en la universidad nunca nos día la espalda y siempre nos facilitó ese trabajo el cual es complicado y tedioso.

A Irayda Guadalupe Castillo Mena por su apoyo en todo este proceso, una persona muy especial y querida por mi persona, también quiero agradecer a todas esas persona que trataron de desanimarme en todo el proceso de mi tesis para que dejara de luchar les agradezco porque eso me ayudo a sobre llevar todo obstáculo que se nos presentó para lograr lo que hoy en día logramos con mi compañera Mirna Ortiz.

**Br. Johnston Erizaet Zeledón Rodríguez**



## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO</b>		<b>PÁGINA</b>
<b>1</b>	Variantes de medios de cultivo en fase de multiplicación.	<b>8</b>
<b>2</b>	Variantes de medios de cultivo en fase de microtuberización.	<b>10</b>
<b>3</b>	Efecto de GA <sub>3</sub> y BAP en longitud y número de entrenudos por planta del cultivar Burren en la fase de multiplicación.	<b>14</b>
<b>4</b>	Efecto del GA <sub>3</sub> y BAP en el número de hojas y número de brotes axilares del cultivar Burren en la fase de multiplicación.	<b>15</b>
<b>5</b>	Efecto de la sacarosa en la media de peso, diámetro y la longitud de microtubérculos.	<b>17</b>
<b>6</b>	Medias de longitud de planta, número de hojas y número de brotes de tres diámetros de microtubérculos del cultivar Burren a los 15 días de la siembra en macetas.	<b>22</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>		<b>PÁGINA</b>
<b>1</b>	<b>A.</b> Segmentos de tubérculos del cultivar Burren. <b>B.</b> Brotación de yemas.	<b>6</b>
<b>2</b>	Plantas de cultivar Burren obtenidas en medio de multiplicación.	<b>7</b>
<b>3</b>	BEIT cubierto con lámina de aluminio para evitar la entrada de luz.	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>A.</b> Microtuberización con diámetros de 4-7.9 mm, 8-10 mm, y > 10 mm del cultivar Burren. <b>B.</b> siembra en macetas.	<b>11</b>
<b>5</b>	Tallo principal y brotación axilar de yemas en plantas <i>in vitro</i> del cultivar Burren.	<b>12</b>
<b>6</b>	Microtubérculos del cultivar Burren a las ocho semanas en BEIT.	<b>18</b>
<b>7</b>	Efecto de la sacarosa en promedio de microtubérculos por planta en el cultivar Burren.	<b>20</b>
<b>8</b>	Microtubérculos del cultivar Burren.	<b>21</b>
<b>9</b>	Porcentaje de supervivencia de microtubérculos del cultivar Burren a los 15 días de la siembra.	<b>22</b>
<b>10</b>	Brotación de microtubérculos del cultivar Burren a los 8 días después de la siembra.	<b>23</b>

## RESUMEN

El estudio de microtuberización del cultivar de papa Burren se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad Nacional Agraria entre los meses de junio a diciembre del 2015. Se estudiaron las fases de multiplicación y formación de microtubérculos en Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal (BEIT). En la fase de multiplicación se evaluó la formación de plantas completas cuando se sembraron 70 microesquejes en cinco variantes de medios de cultivo. Se empleó un diseño de Bloques Completos al Azar con arreglo unifactorial con réplicas conformadas por 2 BEIT, y para definir las diferencias estadísticas entre las medias (ANDEVA) de los tratamientos se realizó la prueba de rangos múltiples de Duncan-Waller ( $\alpha = 0.05$ ). En la formación de plantas se evaluaron la longitud de plantas, número de hojas y número de brotes que se les realizó la prueba de medias de diferencia mínima significativa con  $\alpha = 0.05$ , se calculó el porcentaje de supervivencia. Como resultado se obtuvo en las variantes de medios de cultivo que contenían  $0.20 \text{ mg l}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  con  $0.50 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP y  $0.10 \text{ mg l}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  con  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP, se obtuvieron medias respectivas en número de entrenudos de 6.32-5.7 y en número de hojas por planta de 7.37-6.93. Adiciones de sacarosa de  $80 \text{ g l}^{-1}$  y  $110 \text{ g l}^{-1}$  favorecieron la formación de microtubérculos de peso fresco con medias entre 0.69-0.75 gramos. La adición de sacarosa entre  $80 \text{ g l}^{-1}$  y  $120 \text{ g l}^{-1}$  no se registró diferencias estadísticas significativas entre las medias de las variables diámetro y longitud de microtubérculos. Con microtubérculos con diámetro mayor a los 10 mm se obtuvieron medias en longitud de planta, número de hojas y número de brotes de 21, 16.35 y 5.65 cm respectivamente y con diámetros entre 8-10 mm las medias respectivas fueron de 16.37, 11.35 y 5.35 cm.

**Palabras claves:** BEIT, microtuberización, ANDEVA

## ABSTRACT

The study of microtuberización of the potato cultivar Burren was carried out at the tissue culture laboratory of the Universidad Nacional Agraria between June and December 2015. multiplication and formation of microtubers phases in Temporary Immersion Economic Bioreactors Economic (BEIT) were studied. In the multiplication phase response from whole plants when 70 microcuttings five variants were planted in culture media was evaluated. design completely randomized (BCA) unifactorial blocks formed in accordance with replicas of two BEIT and to define the statistical differences between treatment means the multiple range test of Duncan Waller ( $\alpha = 0.05$ ) was performed was used. In the formation of plants variable length of plants (ANOVA), number of leaves and number of buds are done the mean test least significant difference with  $\alpha = 0.05$ , the survival rate was calculated. As a result we are obtained in the variants of culture media containing  $0.20 \text{ mg l}^{-1} \text{ GA}_3$  with  $0.50 \text{ mg l}^{-1} \text{ BAP}$  and  $0.10 \text{ mg l}^{-1} \text{ GA}_3$  with  $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BAP}$ , respective means were obtained number of internodes 6.32 and 5.7 and the number of leaves per plant of 7.37 and 6.93. Additions sucrose  $80 \text{ g l}^{-1}$  and  $110 \text{ g l}^{-1}$  favored the formation of microtubers fresh weight means between 0.69 and 0.75 grams. When concentrations of sucrose were added  $80 \text{ g l}^{-1}$  and  $120 \text{ g l}^{-1}$ , no significant statistical difference between the means of the variable diameter and length of microtubers were recorded. With microtubers more than 10 mm diameter averages were obtained in plant length, number of leaves and number of shoots of 21 cm, 16.35 and 5.65 respectively and with diameters from 8-10mm the respective means were 16.37, 11.35 and 5.35 cm.

**Keywords:** Temporary Immersion Bioreactors Economic, microtuberization.

## I. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los alimentos más importante tanto en Europa como en América y es uno de los cuatro cultivos básicos a nivel mundial, no solo por la superficie que se destina para su cultivo sino por la importancia que presenta en el mercado mundial. En los últimos 100 años la ha tomado cada vez mayor importancia y su cultivo se ha intensificado en los últimos 20 años. A nivel mundial ocupa el cuarto lugar en producción, superada solo por el maíz, trigo y arroz, se siembra en una superficie de 22 millones de hectáreas de la que se obtiene una producción de 290 millones de t ha<sup>-1</sup> con un rendimiento promedio de 13.81 t ha<sup>-1</sup>(Cepeda y Gallegos, 2003).

En el 2010 la producción de papas frescas en Nicaragua era deficitaria en comparación a la demanda global, considerando un per cápita de 8 kg en el consumo anual. El país depende de las importaciones que oscilan en 40% y que provienen principalmente del área centroamericana para satisfacer el déficit de cada año. Se proyectó la demanda insatisfecha a partir del año 2010 al 2020. La producción de papas registra los menores rendimientos por área y países debido a la baja calidad de la semilla, inadecuados métodos y técnicas de cultivo, de control de plagas y enfermedades y manejo post cosecha. En Nicaragua existen áreas agrícolas aptas para el rubro Estelí, Matagalpa, Jinotega. (Torrez, 2009).

Los tubérculos de papa son parte de la dieta de millones de personas a nivel mundial, contienen 80 % de agua y la materia seca constituida por carbohidratos, proteínas, celulosa, minerales, vitaminas A, C, y complejo B, lo que proporcionan una dieta balanceada. Además, son utilizados en la industria para la producción de almidón, comidas rápidas (papas a la francesa), chips (hojuelas) y puré (INTA, 2004)

La papa se reproduce de manera sexual y asexual, esta última es la forma más común y conlleva a que el progenitor herede su genotipo de forma invariable a sus descendientes. El tubérculo de papa es una estructura asexual especializada que da lugar al crecimiento de tallos subterráneos o yemas laterales que son empleados para la multiplicación de nuevas plantas (López *et al.*, 1984).

La propagación *in vitro* de papa se realiza mediante el subcultivo de yemas axilares. Se pueden obtener tanto plantas *in vitro* como microtubérculos (Agramonte, 1999). Los microtubérculos generalmente se originan en estructuras aéreas de la planta, aunque algunos pueden formarse en el medio de cultivo (Hussey y Stacey, 1984).

En Cuba, Perú y Chile, se han desarrollado sistemas de propagación en biorreactores con medios de cultivo líquidos, donde los tejidos se reproducen más rápido y significativamente en mayor cantidad para mejorar la eficiencia de la micro propagación de papa a partir de yemas apicales o axilares, que son una alternativa novedosa que garantiza plantas libres de enfermedades, la clonación rápida de plantas o de variedades élites (Pérez, 1998).

La técnica de inmersión temporal en biorreactores permite que todas las yemas axilares sean inducidas a formar microtubérculos y que estos, a su vez alcancen mayor tamaño (Jiménez, 1999). Teisson y Alvard, lograron la formación de microtubérculos empleando la técnica semi-automatizada en Recipientes de Inmersión Temporal (RITA) usando como medio básico el MS suplido con Cicocel ancymidol, ácido pantoténico y concentraciones altas de sacarosa.

Los BIT son sistemas semi-automatizados en la propagación *in vitro* y está basado en el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con los explantes por un corto período de tiempo y la consecuente renovación de la atmósfera gaseosa, para evitar la hiperhidricidad de los tejidos y la acumulación de gases tóxicos (Basail *et al.*, 2011).

Los BEIT presentan las siguientes ventajas. a) ensamblaje sencillo y económico. b) la reducción significativa de los costos de producción de las plantas *in vitro*. c) son tan eficientes o mejor que los biorreactores que se ofertan en el mercado internacional. d) la esterilización de recipientes de vidrio es efectiva para la eliminación de microorganismos contaminantes. e) permite la entrada de mayor cantidad y calidad de luz (Castro y Maradiaga, 2016).

Los microtubérculos son las papas de siembra en miniatura y representan una fase intermedia entre las plántulas *in vitro* y los minitubérculos. Los microtubérculos son la primera generación de semilla de papa producida por cultivo de tejidos, que se utiliza para resolver los problemas de trasplantar las plántulas de *in vitro* en condiciones *in vivo* (Saha *et al.*, 2013).

Los microtubérculos *in vitro* presentan las siguientes ventajas. a) Posibilidades de realizar producciones durante todo el año. b) Se obtienen semillas libres de plagas y enfermedades. c) Facilidad de plantación en campo. d) Realizar la siembra en fechas optimas de plantación. e) Se pueden almacenar en pequeños espacios. f) Se elimina la fase de aclimatación, por tanto se reducen los costos (Donnelly *et al.*, 2003).

## II. OBJETIVOS

### General:

- Producir microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) del cultivar Burren en 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 concentración de sacarosa que favorece la producción de microtubérculos con mayor peso fresco.
- Evaluar el crecimiento de plántulas obtenidas de microtubérculos de papa.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación del área de estudio**

El estudio se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía (FAGRO) en la Universidad Nacional Agraria, ubicado en el km 12 ½ carretera Norte, Managua, en el periodo comprendido entre mayo y diciembre del 2015.

#### **3.2. Esterilización de materiales y equipos**

En la limpieza de la cristalería se utilizó hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}_3$ ) al 1% con la inmersión de los BEIT durante 24 horas y posteriormente se eliminaron los residuos de cloro con agua. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120 °C a una atmósfera de presión durante 20 minutos. Los platos petri, pinzas y bisturíes se esterilizaron en el horno a temperaturas de 180 °C durante una hora. Previo a la siembra de los tejidos. El área de trabajo de la cámara de flujo laminar se desinfectó con  $\text{NaClO}_3$  al 1% y después se expuso a luz ultravioleta durante 30 minutos.

#### **3.3. Establecimiento de ápices meristemáticos**

##### **3.3.1. Selección del material vegetativo**

Los tubérculos, fuente de material vegetativo se obtuvieron de semilla certificada con categoría básica importada de Francia, que presentaban buenas condiciones fitosanitarias.

##### **3.3.2. Preparación y desinfección del material vegetativo**

En el laboratorio los tubérculos se dividieron en segmentos cada uno conteniendo una o más yemas en estado dormante con un cuchillo desinfectado con  $\text{NaClO}_3$  al 1%. Inmediatamente se sumergieron por 20 minutos en Benomil a razón de 3 g por litro de agua. Luego se dejaron reposar en papel toalla durante 5 minutos. Posteriormente se procedió a sembrar de cuatro segmentos en cajas transparentes de plástico rectangulares con un largo de 21 cm de ancho y alto de 8 cm que contenía un sustrato de arena de construcción desinfectada con agua hervida. La división de los tubérculos se realizó para estimular la brotación de un mayor número de yemas por tubérculo (**Figura 1A**). A los 15 días ocurrió la brotación de una o más yemas de los segmentos del tubérculo

(Figura 1B) y se extrajeron con bisturí, posteriormente se colocaron en beaker de 200 ml con 150 ml de agua.



**Figura 1.A:** Segmentos de tubérculos del cultivar Burren **B:** Brotación de yemas.

### 3.3.3. Siembra *in vitro* del material vegetativo

Las yemas obtenidas de los segmentos de tubérculos se desinfectaron durante 5 minutos con  $\text{NaClO}^3$  al 1% en la cámara de flujo laminar, luego se procedió a eliminar los residuos del desinfectante con tres pases de agua estéril. Luego se extrajeron los ápices meristemáticos con pinzas y bisturíes y se sembraron individualmente en tubos de ensayo de 15 cm de longitud y un cm de diámetro, que contenían 10 ml del medio de cultivo sales MS (Murashige y Skoog, 1962) 0.2 mg l<sup>-1</sup> de ANA y 0.1 mg l<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>.

Los explantes se llevaron al cuarto de crecimiento con condiciones de  $22 \pm 3$  °C con exposición a luz natural durante aproximadamente 12:12 horas luz-oscuridad. Después de 30 días los ápices meristemáticos generaron plantas completamente formadas con las que se inició el proceso de reproducción a través de la multiplicación por microesquejes e incrementar la cantidad de material necesario para definir la variante de medio de cultivo apropiado para la multiplicación del cultivar Burren.

### 3.4. Fase de multiplicación

En el experimento se empleó el medio MS con diferentes concentraciones de ácido giberélico y 6-BAP. Como tejido de reproducción se emplearon microesquejes que se cortaron con una longitud aproximada de un cm y se inocularon en BEIT de 3000 ml, adicionando 700 ml por variante de medio de cultivo. Se sembraron 70 microesquejes por BEIT que crecieron a 20-24 °C, 12:12 horas luz-oscuridad. Se suministró un riego de inmersión de tres minutos por día. En **la Figura 2** se observan plantas del cultivar Burren desarrolladas en los BEIT.



**Figura 2.** Plantas del cultivar Burren obtenidas en medio de multiplicación.

### 3.4.1. Medios de cultivo

Las variantes de medio de cultivo que se estudiaron en la fase de multiplicación se presentan en el **Cuadro 1**.

**Cuadro 1.** Variantes de medios de cultivo en fase de multiplicación.

<b>Variante de medio de cultivo MS (1962)</b>	<b>* GA<sub>3</sub> (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>**BAP (g l<sup>-1</sup>)</b>
<b>1</b>	0.00	0.00
<b>2</b>	0.10	0.50
<b>3</b>	0.10	1.00
<b>4</b>	0.20	0.50
<b>5</b>	0.20	1.00

\*GA<sub>3</sub>: Acido Giberélico

\*\*BAP: N-6 Benzilaminopurina

### 3.5. Microtuberización

Una vez evaluadas las plantas del experimento de multiplicación (acápite 3.4), se seleccionó la variante del medio de cultivo en base a la mejor respuesta estadística de las variables longitud de planta y número de hojas. De las plantas formadas se extrajeron 30 yemas apicales y/o axilares que se sembraron en la mejor variante de medio de cultivo de la fase de multiplicación, donde crecieron durante dos semanas bajo condiciones de  $22 \pm 3$  °C, 12:12 horas luz-oscuridad con un riego de inmersión al día. Las plantas formadas después de este periodo se transfirieron a los BEIT de 3000 ml y se adicionaron a cada uno 700 ml de medio de cultivo de las variantes definidas para inducir a la microtuberización.

#### 3.5.1. Medios de cultivo

Después de dos semanas en un mismo medio de multiplicación, se reemplazó este medio por variantes que contenían cinco concentraciones diferentes de sacarosa en el medio de cultivo basal sales de MS. El contenido de medio de cultivo líquido de los BEIT decantándolos para lograr transferir completamente al beaker de 1000 ml. Cuatro semanas después se realizó el procedimiento descrito, se reemplazaron los medios de cultivo por medio fresco, esta vez

conservando la concentración de sacarosa en el BEIT correspondiente. Los BEIT fueron cubiertos con papel aluminio para obtener una mejor respuesta de las plantas a la microtuberización por efecto de la oscuridad, de acuerdo a lo reportado por autores como Jiménez (1999) y permanecieron bajo condiciones de oscuridad hasta completar las ocho semanas (**Figura 3**).



**Figura 3.** BEIT cubierto con lámina de aluminio para evitar entrada de luz.

El cuarto de crecimiento tuvo temperaturas  $20 \pm 3$  °C durante las 8 semanas. Las variantes de medio de cultivo para la microtuberización se presentan en el **Cuadro 2**.

**Cuadro 2.** Variantes de medios de cultivo en fase de microtuberización.

<b>Número de variante</b>	<b>% de Sacarosa (g l<sup>-1</sup>)</b>
<b>1</b>	80.0
<b>2</b>	90.0
<b>3</b>	100.0
<b>4</b>	110.0
<b>5</b>	120.0

### **3.6. Brotación de yemas de microtubérculos**

Se evaluaron los microtubérculos seleccionados de acuerdo a los diámetros 4-7.9, 8-10 y >10 mm como se presenta en la **Figura 4A**. Los microtubérculos se sembraron en macetas de metal de 20.8 cm de diámetro y 19 cm. De acuerdo a la categoría de diámetro de los microtubérculos fueron sembrados en un sustrato de compost en número de 5 por maceta a una profundidad de 2 cm (**Figura 4B**). Finalizada la siembra fueron colocadas dentro de un micro túnel protegido con tela para evitar la presencia de afidos para mantener la humedad del sustrato se suministró un riego por día con regadora (12 litros de agua).



**Figura 4.** A Microtubérculos del cultivar Burren con diámetros de 4.0-7.9 mm, 8-10 mm y >10 mm. B Siembra en macetas.

### 3.7. Diseño experimental y análisis estadístico

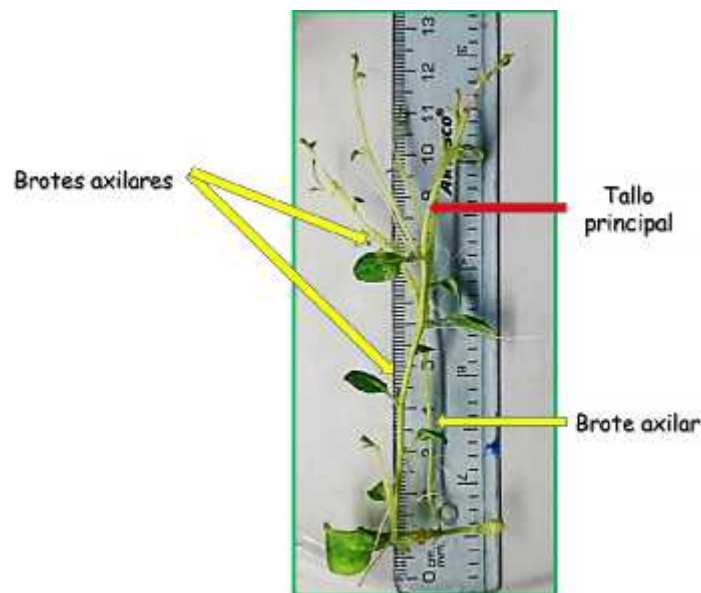
#### 3.7.1 Experimento de fase de multiplicación

Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA) con arreglo unifactorial, cada bloque conformado por 3 BEIT. A los datos de longitud de planta, número de hojas, número de entrenudos y brotación de yemas axilares se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos se hizo la prueba de rangos múltiples de Duncan-Waller ( $\alpha=0.05$ ). Los datos fueron procesados y analizados repeticiones con Statistical Analysis System (SAS) versión 15.

### 3.7.1.1 Variables evaluadas

A las cuatro semanas de establecido el experimento se realizaron las evaluaciones de las siguientes variables.

- a. Longitud de planta principal, medida desde la base al ápice
- b. Número de hojas
- c. Número de entrenudos
- d. Brotación de yemas axilares



**Figura 5.** Tallo principal y brotación axilar de yemas en plantas *in vitro* del cultivar Burren.

### 3.7.2. Experimento fase de microtuberización

Se utilizó un diseño BCA con arreglo unifactorial, cada bloque conformado por tres BEIT, cada uno conteniendo 30 plantas y un total de cinco bloques. Los datos de las variables número de microtubérculos por planta, número de brotes, diámetro, longitud y peso fresco de los microtubérculos se les realizó ANDEVA. Para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos se practicó la prueba de rangos múltiples de Duncan-Waller ( $\alpha = 0.05$ ). Los datos fueron procesados y analizados en paquetes estadísticos con SAS versión 15.



### **3.7.2.1. Variables evaluadas**

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

- a. Número de microtubérculos por planta
- b. Diámetro y longitud (mm)
- c. Peso fresco (mg)
- d. Número de brotes por microtubérculos

### **3.7.3. Formación de plantas**

Se conformaron tres bloques cada uno constituido por cinco repeticiones distribuidas al azar con tres diámetros de los microtubérculos (4.0-7.9, 8.0-10 y >10 mm).

Se utilizó el Diseño Completos al Azar (DCA) con arreglo unifactorial, cada uno conteniendo 5 microtubérculos por categoría de diámetro y un total de cinco macetas. A los datos de las variables longitud de la planta (cm), número de hojas, número de brotes y germinación (%) Se les realizó un ANDEVA, para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos y se practicó la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) con  $\alpha = 0.05$ . El procesamiento de datos fue analizado por el paquete estadístico (SAS) versión 15.

### **3.7.3.1. Variables evaluadas**

A los 15 días de la siembra de los microtubérculos se evaluaron las siguientes variables:

- a. Longitud de la planta (cm)
- b. Número de hojas
- c. Número de brotes
- d. Supervivencia (%)

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Fase de multiplicación

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

En los medios de cultivo que contenían BAP y GA<sub>3</sub> no hubo diferencia estadística entre las medias de longitud de plantas, pero todas estas variantes superaron estadísticamente al tratamiento testigo (**Cuadro 3**). Las medias de número de entrenudos que únicamente resultaron con similar respuesta estadística fue en las variantes de medio de cultivo que contenían 0.20 mg l<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> con 0.50 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 0.10 mg l<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> con 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP en las que se obtuvieron medias respectivas de 6.32 y 5.71, aunque entre esta última variante de medio de cultivo y las demás medias de número de entrenudos no difirieron significativamente. Los resultados se presentan en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Efecto del GA<sub>3</sub> y BAP en longitud y número de entrenudos por planta del cultivar Burren en la fase de multiplicación.

Variantes de medios de cultivo	Reguladores de crecimiento		Longitud de planta	Número de entrenudos por planta
	GA <sub>3</sub>	BAP		
	( mg l <sup>-1</sup> )			
1	0.0	0.0	6.76 b	5.01 b
2	0.10	0.50	8.42 a	5.29 b
3	0.10	1.00	8.48 a	5.71 ba
4	0.20	0.50	9.09 a	6.32 a
5	0.20	1.00	8.02 a	5.24 b

Medias con letras desiguales en una columna difieren según la prueba de Duncan-Waller para p<0.05.

#### 4.2.1 Efecto de los medios de cultivos en el número de hojas y número de brotes axilares por planta.

Los medios de cultivo que contenían 0.20 mg l<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> con 0.50 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 0.10 mg l<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> con 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP resultaron con similar respuesta estadística en medias de número de hojas por planta con medias respectivas de 7.37 y 6.93, aunque entre esta última variante y las otras medias de número de hojas no difirieron significativamente.

Medias de número de entrenudos por planta que se formaron en las variantes de medios de cultivo que se les agregaron BAP y GA<sub>3</sub> en combinación, obtuvieron similar respuesta estadística entre sí, pero resultaron con mejor respuesta estadística en relación al tratamiento testigo. **(Cuadro 4).**

**Cuadro 4.** Efecto del GA<sub>3</sub> y BAP en número de hojas y número de brotes axilares del cultivar Burren 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 <sub>3</sub>	BAP		
	( mg l <sup>-1</sup> )			
1	0.0	0.0	6.11 bc	0.80 b
2	0.10	0.50	6.43 bc	2.17 a
3	0.10	1.00	6.93 ba	2.39 a
4	0.20	0.50	7.37 a	2.28 a
5	0.20	1.00	5.74 c	2.48 a

Medias con letras desiguales en una columna difieren según la prueba de Duncan - Waller para p<0.05.

Sánchez y Rocha (2015) experimentaron con el cultivar Servane en la fase de multiplicación con similares variantes de medios de cultivo a los empleados en este estudio y obtuvieron medias superiores de número de hojas y número de brotes axilares por planta, resultados que denotan la posible respuesta genotípica del cultivar Servane a las adiciones de la citoquinina BAP.

Los promedios de las variables longitud y número de entrenudos obtenidos en el cultivar Burren en el sistema BEIT fueron inferiores comparado con los resultados logrados por Jiménez *et al.*, (1999) en los cultivares Désiré y Atlantic en el Sistema Inmersión Temporal (SIT) con recipientes de 4000 ml. Igual que Sánchez y Rocha (2015) estos resultados pueden explicarlos el empleo de un sistema de control automático programado del suministro de aireación forzada, así como de las frecuencias y del tiempo de inmersión (ocho inmersiones por día, por cinco minutos), que incrementan la concentración del oxígeno dentro de los SIT que lo hace más fácilmente disponible para los tejidos dentro de los medios de cultivo.

Un medio de cultivo que contribuya al incremento de las variables número de hojas y número de brotes axilares por planta es el objetivo de la fase de multiplicación. En el cultivar Burren esas variables se favorecieron con la adición de  $0.20 \text{ mg l}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  y  $0.50 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP. Este mismo medio de cultivo se debe emplear para formar plantas vigorosas que serán requeridas para la inducción de microtuberización, de esta forma se garantizará que se formen microtubérculos con mayores dimensiones y mayor peso fresco.

#### **4.3. Fase de microtuberización**

El sistema de producción *in vitro* de microtubérculos consiste esencialmente en colocar segmentos nodales de plantas *in vitro* o plantas completas en un medio de cultivo para la inducción de la tuberización caracterizado por un alto contenido de sacarosa y en algunos casos complementado con sustancias reguladoras del crecimiento. Los explantes nodales tuberizan sincrónicamente cuando se cultivan *in vitro*, en condiciones de oscuridad y en un medio de cultivo con contenido de nitrógeno reducido y concentración de sacarosa óptima (Jackson y Prat, 1996).

La inducción y desarrollo de los microtubérculos pueden ser influenciados por varios factores, como la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, las condiciones del cultivo, la temperatura, el fotoperiodo, la intensidad de la luz, la formulación del medio de cultivo, así como la consistencia y el genotipo de papa (Garner y Blake, 1989). Uno de los factores más importantes para inducir la microtuberización en papa es la fuente de carbono en el medio de cultivo; tanto en su tipo y concentración tienen efecto directo en el crecimiento de los tubérculos. La sacarosa es considerada como la fuente de carbono óptima en comparación con la glucosa y la fructosa (Khuri y Moorby, 1995).

Al igual que con la tuberización *in vivo* de papa, la tuberización *in vitro* es un sistema de desarrollo que abarca una serie de importantes procesos biológicos regulado por la expresión diferencial de genes. La hinchazón de las yemas axilares pueden ser detectadas 5 días después de la inducción y la morfología de los microtubérculos es evidente después de 6 días del cultivo (Désiré *et al.*, 1995) y Rosell (1987), citados por Yu *et al.* (2000).

Pruski *et al.*, (2003) afirman que los microtubérculos de papa producidos en biorreactores de inmersión temporal con mayor tamaño y masa fresca, son los más deseados para la producción

comercial, porque pueden ser usados para obtener minitubérculos en condiciones de casa de cultivo o pueden ser plantados en campo sin previa fase de aclimatación, o almacenados durante un período determinado de tiempo, sin pérdida excesiva de masa fresca que puedan afectar su brotación. Igarza, *et al.*, (2011) destacan que la técnica de biorreactores de inmersión temporal no sólo induce más tubérculos por planta que en medio de cultivo semi-sólido, sino que también aumenta el tamaño y el peso de los tubérculos

#### 4.3.1. Peso fresco de microtubérculos

La adición de cinco concentraciones de sacarosa al medio de cultivo constituido por las sales de MS, se obtuvieron medias en el peso de los microtubérculos entre 0.69-0.75 g, aunque no se registraron diferencias significativas por efecto de la sacarosa (**Cuadro 5**).

#### 4.3.2. Diámetro de microtubérculos

Las medias en diámetro de los microtubérculos que se obtuvieron en las cinco concentraciones de sacarosa resultaron sin diferencias estadísticas significativas, cuyas medias presentaron un rango entre los 0.85-0.92 cm (**Cuadro 5**).

#### 4.3.3. Longitud de microtubérculos

No hubo diferencia significativa en la variable longitud de microtubérculos en las diferentes concentraciones de sacarosa que se adicionaron al medio de cultivo (**Cuadro 5**).

**Cuadro 5.** Efecto de la sacarosa en la media de peso, diámetro y la longitud de microtubérculos.

Variante del medio MS (1992)	Sacarosa (g l <sup>-1</sup> )	Peso promedio de microtubérculos (g)	Diámetro (cm)	Longitud (cm)
1	80	0.69 <sup>a</sup>	0.92a	1.10a
2	90	0.71 <sup>a</sup>	0.88a	1.17a
3	100	0.62 <sup>a</sup>	0.87a	1.09a
4	110	0.75 <sup>a</sup>	0.85a	1.05a
5	120	0.63 <sup>a</sup>	0.85a	1.04a

Medias con letras desiguales en una columna difieren según la prueba de Duncan - Waller para  $p < 0.05$ .



**Figura 6.** Microtubérculos del cultivar Burren a las ocho semanas en BEIT.

Khuri y Moorby (1995) y Akita y Takayama (1994) recomiendan que en los biorreactores se deben adicionar una concentración relativamente alta de sacarosa ( $80 \text{ g l}^{-1}$ ) 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. Sin embargo, el mantenimiento de una alta concentración de sacarosa es muy difícil debido a la rápida hidrólisis de la sacarosa en los biorreactores. Yu *et al.*, (2000) menciona que 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.

Sánchez y Rocha (2015) en el cultivar Servane obtuvieron microtubérculos presentaron medias en peso fresco entre los 0.4-0.6 g en un medio de cultivo que se agregaron concentraciones de sacarosa de 80, 90, 100 y  $110 \text{ g l}^{-1}$ . Estos resultados fueron inferiores a las medias de peso fresco que se

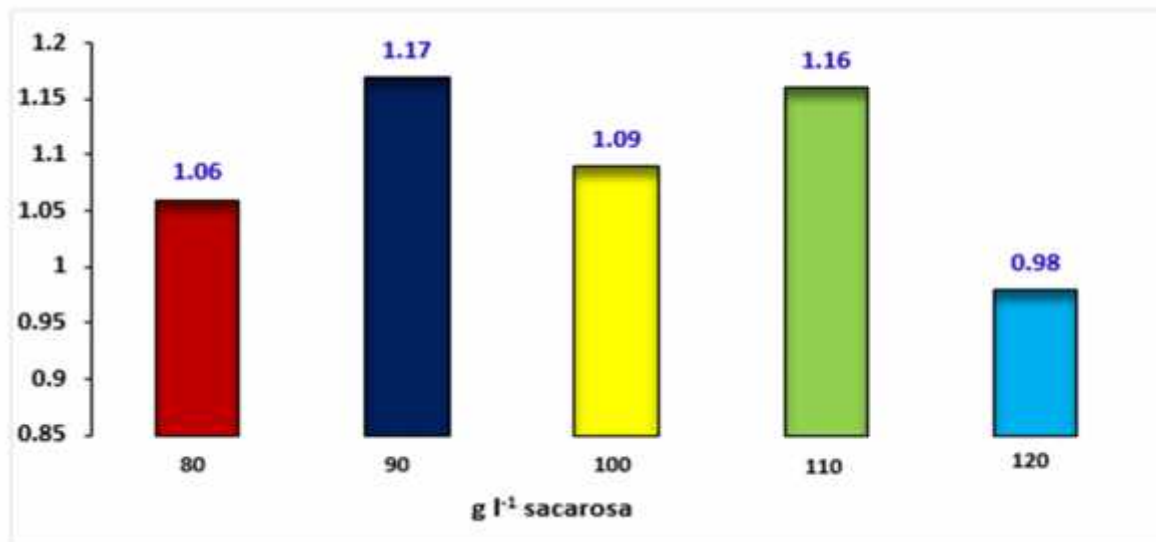
alcanzaron en el cultivar Burren cuyo rango de peso fresco fue entre 0.62-0.75 g. Mientras que en diámetro de los microtubérculos obtuvieron medias en un rango entre los 0.53-0.57cm, y en el presente estudio con el cultivar Burren las medias resultaron superiores con diámetros entre los 1.04-1.17 cm. La respuesta diferente en los dos cultivares, ya que en el cultivar Burren a las cuatro semanas de iniciada la microtuberización se realizó el refrescamiento de cada variante de medio de cultivo (cambio por un medio fresco), medida que contribuyó a mejorar el mantenimiento de la sacarosa y a retardar su hidrólisis en glucosa y fructosa.

Yu *et al.*, (2000) afirman que los microtubérculos producidos en un biorreactor de rotación crecieron a un ritmo más rápido y alcanzaron mayor peso cuando el medio de cultivo se reemplazó frecuentemente. Aunque el número total de microtubérculos no se vio afectado, el número de microtubérculos de más de un g se cuadruplicó cuando se sustituyó el 75% del medio de cultivo cada dos semanas en comparación cuando el medio de cultivo no fue reemplazado durante el proceso de microtuberización.

Así mismo Ziv y Shemenst (1996); citados por Igarza *et al.*, (2012) evaluaron para la microtuberización de la papa en biorreactores, el efecto de la renovación del medio de cultivo. Estos autores reemplazaron cada dos semanas el medio de cultivo y lograron un rápido crecimiento de los microtubérculos, debido a los altos niveles de sacarosa que son necesarios en el medio de cultivo para el desarrollo de la microtuberización.

El sistema de biorreactores por inmersión temporal en la producción de microtubérculos de papa tiene ventajas en comparación con el sistema tradicional de producción en medios de cultivo de consistencia semisólida. Wazir *et al.*, (2015), emplearon un medio de inducción para la microtuberización del cultivar Désiré que contenía las sales de Murashige y Skoog (1962) MS más el suministro de  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  Ca-pentotenoato,  $0.25 \text{ mg l}^{-1}$  ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ), con cinco diferentes concentraciones de sacarosa 0, 3, 6, 8, y 11%, y reportan medias de peso fresco entre 0.055-0.097 gramos y diámetros entre 0.53-0.68 cm, resultados que son significativamente inferiores a los obtenidos en este estudio con el cultivar Burren que presentó medias de peso fresco entre 0.62-0.75 g y diámetros entre 1.04-1.17 cm. Estos mismos autores reportan mejores resultados en promedio de microtubérculos por planta entre 1.90-2.10, superiores al promedio obtenidos con el

cultivar Burren en un rango entre 0.98-1.17 microtubérculos promedio por planta. El mejor promedio de microtubérculos por planta en el medio semisólido evidentemente afecta su desarrollo, además diferentes autores reportan que los microtubérculos de tamaño pequeño tienen alta dormancia, por tanto su empleo para la producción de semilla no es recomendada. En la **Figura 7** se presenta el resultado en promedio de microtubérculos por planta del cultivar Burren.

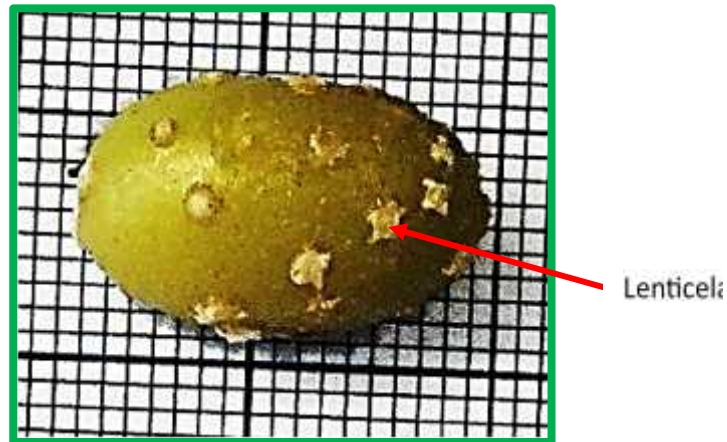


**Figura 7.** Efecto de la sacarosa en promedio de microtubérculos por planta en el cultivar Burren.

En el cultivar Burren prevaleció la forma de microtubérculos esféricos que presentaban lenticelas prominentes de color blanco con aspecto de callo en la epidermis. Zósimo (1986) detalla que en la superficie de la piel de los tubérculos de papa se encuentran distribuidas las lenticelas (poros respiratorios) 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. Por otra parte Donnelly *et al.* (2003) observaron que en presencia de BAP y Cicocel en los medios de cultivo en el cultivar Désiré causó anomalías incluyendo elongación de los tubérculos, reducción del número de ojos (yemas), aumento del tamaño de lenticelas y desorganización del periderma. Rivera *et al.* (2008) reportan que algunas accesiones de papa presentaron buena producción de microtubérculos mostraron hiperhidratación en los medios de propagación de inducción líquidos. 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; al parecer estuvieron relacionados con concentraciones de los inductores de tuberización BAP/CCC (Cicocel), principalmente en la dosis alta (o cuando se empleó solamente CCC. En la Figura 8 se observan lenticelas en microtubérculos del cultivar Burren.



**Figura 8.** Microtubérculos del cultivar Burren

#### 4.4. Plantas formadas

Cuando se cosechan los tubérculos de papa se encuentran en una fase de dormancia en la que puede impedir la germinación, incluso cuando existan condiciones ambientales favorables. Esta misma condición se produce en los microtubérculos obtenidos a partir de cultivo de tejidos. Igarza *et al.* (2014) plantaron directamente en campo microtubérculos de papa del cv. Andinita producidos en sistemas de inmersión temporal y obtuvieron en promedio 8.5-9.5 tubérculos por planta.

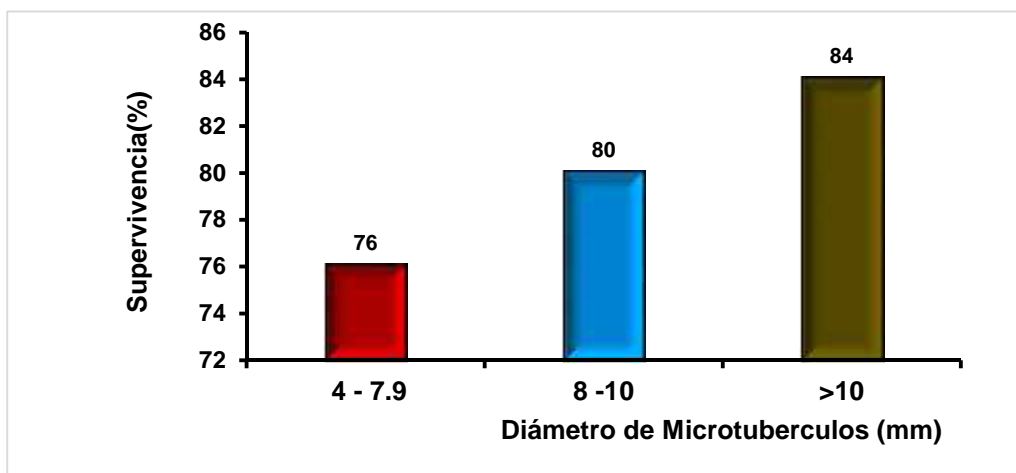
El diámetro de los microtubérculos tuvo influencia en la longitud de planta, número de hojas y número de brotes de acuerdo a las medias registradas de estas variables en microtubérculos con diámetro  $>10$  de mm que resultaron significativamente superiores a las medias obtenidas con la siembra de microtubérculos con diámetro entre 4 -7.9 mm. En base a la diferencia entre medias, los microtubérculos con diámetro  $>10$  de mm, únicamente superaron en número de hojas a los microtubérculos con diámetro entre 8 - 10 mm. Se presentan los resultados en el **Cuadro 6**.

**Cuadro 6.** Medias de longitud de la planta, número de hojas y número de brotes de tres diámetros de microtubérculos del cultivar Burren a los 15 días de la siembra en macetas.

Diámetro de microtubérculos (mm)	Longitud de planta (cm)	Número de hojas	Número de brotes
>10	21.00 a	16.35a	5.65 a
8 -10	16.37 ab	11.35b	5.35 ab
4 -7.9	13.35 b	7.92b	4.22.b

Medias con letras desiguales en una columna difieren según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para  $p < 0.05$ .

Con la siembra de los microtubérculos en macetas, se obtuvieron porcentajes de supervivencia entre el 76 y el 84%, resultados determinados por el diámetro del microtubérculos, así a mayor diámetro, mayor será la cantidad de reserva de agua y carbohidratos que contengan los microtubérculos al momento de la siembra en condiciones *ex vitro*, por tanto mayor será la supervivencia. (Figura 9).



**Figura 9.** Porcentaje de supervivencia de microtubérculos cultivar Burren a los 15 días de la siembra.

Los microtubérculos no resultaron afectados por la dormancia, por tanto no es necesario aplicar tratamientos hormonales o de bajas temperaturas de almacenamiento previo a la siembra (**Figura 10**). Igarza, *et al.* (2014), con la siembra directa en campo de microtubérculos del cultivar Andinita con diámetros entre 4 y 6.9 mm, 7 y 10 mm y mayores de 10 mm, a los 21 días lograron el 63.3, 76.7 y 93.3% de supervivencia respectivamente.



**Figura 10.** Brotación de microtubérculos del cultivar Burren a los 8 días después de la siembra.

## V. CONCLUSIONES

En el cultivar Burren en las variantes de medios de cultivo que contenían  $0.20 \text{ mg l}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  con  $0.50 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP y  $0.10 \text{ mg l}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  con  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP, se obtuvieron medias respectivas en número de entrenudos de 6.32 y 5.7 y en número de hojas por planta de 7.37 y 6.93.

Adiciones al medio de cultivo de  $80 \text{ g l}^{-1}$  y  $110 \text{ g l}^{-1}$  de sacarosa favorecieron la formación de microtubérculos de peso fresco con medias entre 0.69 y 0.75 gramos.

No se registraron diferencias estadísticas significativas entre las medias de las variables diámetro y longitud de microtubérculos cuando se adicionaron concentraciones de sacarosa entre  $80 \text{ g l}^{-1}$  y  $120 \text{ g l}^{-1}$ .

Las variables evaluadas en los microtubérculos producidos en el sistema BEIT, sembrados en un sustrato de compost y recipiente de maceta no fueron afectadas por la dormancia, lográndose microtubérculos con diámetro mayor a los 10 mm, medias en longitud de planta, número de hojas y número de brotes de 21, 16.35 y 5.65 cm respectivamente y con diámetros de microtubérculos entre 8 y 10mm las medias respectivas fueron de 16.37, 11.35 y 5.35 cm.

El mejor porcentaje de brotación se obtuvo con microtubérculos con diámetro mayor a los 10 mm con el 84%.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Para la inducción de microtubérculos del cultivar Burren adicionar al medio de cultivo 80 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y para reducir el proceso de degradación de la sacarosa por efecto de la hidrólisis, reemplazar el medio de cultivo a las cuatro semanas.

Estudiar el efecto del tiempo y frecuencia de inmersión en el sistema BEIT en la microtuberización del cultivar Burren.

Evaluar el comportamiento agronómico de los microtubérculos del cultivar Burren para la producción de minitubérculos en condiciones de casas malla o de siembra directa en condiciones de campo.

Estudiar el comportamiento de microtubérculos de variedad Nicaragüenses o ya adaptadas en Nicaragua.

## VII. LITERATURA CITADA

- Akita M y Takayama S. 1994. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Rep* 13:184–187.
- 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 Marta Abreu de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba.
- Basail M, Medero V, Otero E, Torres M, Cabrera M, López J, Santos A, Rayas A, Bauta M, Páz E, Beovidez Y, Ortega A, Enrique J. 2011. Multiplicación *in vitro* de ‘FHIA-25’ (Musa spp., AAB) en Sistemas de Inmersión Temporal. *Revista Biotecnología Vegetal* 11(1): 27-31.
- Castro, S. E. y Maradiaga, E. E. 2015. Micro propagación tradicional y del empleo de Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal en el cultivar de plátano (Musa spp.) CEMSA ¾. (Tesis) Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. NC.2- 140 p.
- Cepeda, M. y Gallegos G. 2003. La papa el fruto de la tierra. México, Mx. Ed trillas. Pág. 9-11.
- Come, D. and Corbineau, F.1992. Les semences et le froid. *Les végétaux et le froid*, Hermann, Paris, 401-461.
- Donnelly, D; Coleman, W y Coleman, S. 2003. Potato microtuber production and performance: A review. *Am Potato J* 80:103-115.
- Garner, N y Blake J. 1989. The induction and development of potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. *Ann. Bot.* 63: 663-674.
- Hussey, G y Stacey NJ. 1984. Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann Bot* 53: 565-578.
- Igarza J.C, Agramonte. D, Alvarado. Y, De Feria. M, Pugh. T. 2012. Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos (CISAT). Laboratorio de Biotecnología
- Igarza, J.; Agramonte. D.; De Feria, M.; Jaime J y Pérez, M. 2014. Obtención de microtubérculos de papa cv. ‘Andinita’ en Sistemas de Inmersión Temporal. En: *Biotecnología Vegetal* Vol. 11, No. 1: 59 -62.

- INTA (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria) 2004. Manejo Integrado de Plagas. Consultado el 19 de enero de 2016. Disponible en <http://cenida.una.edu.ni/relectronicos/RENH10M722.pdf>.
- Jiménez E. 1999. Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) en sistema de inmersión temporal. Universidad de 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
- Jackson, S.D y Prat S. 1996 Control of tuberisation in potato by gibberellins and phytochrome B. *Physiol Plant* 98: 407-412.
- Khuri S y Moorby J. 1995. Investigation into the role of sucrose in potato cv. Estima microtuber production in vitro. *Ann Bot* 75:295–303.
- Torrez P. 2009. Potencial de mercado de la papa en Nicaragua. Consultado el 19 de enero de 2016. Disponible en: <http://www.lamjol.info/index.php/CALERA/article/view/15>
- López, M., E. Vásquez y López, R. 1984. Raíces y Tubérculos. (eds) R, Ojeda; González, L. y Mora L. La Habana, Cuba: pp 98-221.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Pruski, K, Astatkie T, Duplessis P, Stewart L, Nowak J y Struik PC. 2003 Manipulation of microtubers for direct eld utilization in seed production. *Am. J. Potato Res.* 80: 173-181
- Pérez, J. N. 1998. Aumento de la Eficiencia en la Micropropagación En: Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. (Ed.). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba. Pág. 380
- 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.
- 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.
- Saha S, M. Ahmed, M. M. Islam, R. N. Remme y M. R. Ali. 2013. *Journal of Agriculture and Veterinary Science.* Volume 4. Pág. 58-62.

- Wazir. A, Gul. Z, Hussain. M, Ullah Khan. Z, Saleem. M y Khurshid.I.2015. Effect of sucrose on inducing *in vitro* microtuberización in potato without using any growth hormone Pakistan ed. Research Paper. Pág.119-122
- Yu, WC P.J. Joyce, D.C. Cameron, B.H. McCown. 2000. Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. Plant Cell Reports: 19:407–413.
- Zósimo H.1986. Botánica sistémica y morfología de la papa Lima, Perú. Boletín de información técnica 6. Pág. 14- 23.