



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**EFFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE
CULTIVO Y DEL FOTOPERIODO SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE MICROTUBÉRCULOS DE PAPA
(*Solanum tuberosum* L).**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la Ilustre Universidad
Central de Venezuela, por la bachiller
Mayelí Carolina Moreno Peña como
requisito parcial para optar por el título
de Licenciada en Biología

Tutora: Profa. Maira Oropeza

CARACAS, VENEZUELA
OCTUBRE 2012

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por escuchar mis oraciones, por guiar mis pasos y por estar presente en los momentos más difíciles de mi carrera. A él le estaré infinitamente agradecida por regalarme lo más hermoso de mi vida, mis padres, de los que cada día me siento más orgullosa y bendecida por contar con ellos. Gracias mama por ser mi mejor amiga, mi consejera y mi paño de lágrimas. Eres una mujer cariñosa, consentidora, servicial, honesta y sobre todo eres la mejor madre del mundo. Gracias papa por ser para mí un ejemplo de profesionalismo con vocación, tú eres y siempre serás para mí, el mejor botánico y papá que existe sobre la Tierra. Gracias abuelita por estar siempre pendiente de mis estudios y por tus sabios consejos. Gracias mani (Rhy) por compartir conmigo tus experiencias, por apoyarme y por ayudarme a diseñar todas las presentaciones, carteles y portadas que he tenido desde que comencé a estudiar en el colegio. Gracias a mis tíos y primos por estar pendientes de mi desempeño universitario y ofrecerme su ayuda en todo momento.

Es verdad que durante la carrera me han salido ojeras, he tenido que pasar mil y una noches de traspasos y he aumentado de peso; sin embargo, si no fuese por ella no habría conocido a mí otra familia: mis profesores y mis amigos. Gracias profe Maira, por su asesoramiento y apoyo incondicional en este trabajo; usted además de ejercer su función como tutora, me brindó su amistad y confianza desde el primer día que comencé a trabajar. Gracias a mis jurados por el tiempo y el esfuerzo que dedicaron a la revisión crítica de este trabajo. Gracias a todos mis profesores de las materias electivas por hacer que cada día me enamorara más de la Botánica. Gracias al Programa de Estímulo a la Innovación e Investigación (PEII) por contribuir al financiamiento de este trabajo.

Una de las cosas más hermosas que me dejó esta primera etapa universitaria son mis amistades, para quienes mis palabras de agradecimiento quedan muy cortas. Gracias a Sandrita, Bea, Eder, Erick, Ingrid, Ana Karina, Giovanni e Indira, por convertir mis días de estrés en alegrías, gracias por ayudarme a cada momento para que todo saliera perfecto y por compartir conmigo mis cumpleaños. Los adoro, con ustedes no hay trabajo imposible, ni difícil, ni fastidioso.

Gracias Emily por convertirte en otra hermana para mí, una morocha que Dios me regaló. Gracias por regalarme tu amistad y cariño transparente, auténtico, sin una gota de interés. Gracias

Xol por ser también parte fundamental de mi vida, por brindarme tu amistad y tus consejos. A ustedes les debo gran parte de mis éxitos académicos, los cuales quizás no hubiese logrado sin formar parte del mejor grupo de estudio que he tenido en la vida. Gracias a todos mis amigos que han compartido alegrías, tristezas, angustias y noches en vela estudiando o haciendo informes: Gregory, Luigi, Ángela, Daniela, Victoria, Ruth, Norca, Juan Vicente, David, Marianny, Alejandra, Farilyn, María, Daznia, Clelia, Jorge, y muchos otros más. Gracias a mis alumnos y compañeros de las preparadurías, quienes la mayoría de ellos son ahora mis grandes amigos.

Por último, gracias Fer por creer en mí, por darme seguridad y confianza en mi trabajo. Mis padres, mi hermana, mi sobrinito, mis amigos y tú son el motor de mi vida. Pido a Dios que sus vidas sean maravillosas, así como ustedes han hecho maravillosa la mía.

A todos, MUCHÍSIMAS GRACIAS, los adoro con el corazón, que Dios los bendiga.

I. INDICE DE CONTENIDO	Págs.
I. Índice de contenido	I
II. Índice de tablas	iii
III. Índice de figuras	V
IV. Abreviaturas	viii
V. Resumen	ix
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1 Descripción botánica de la especie	4
2.2 Origen del cultivo de la papa	5
2.3 Morfología de la planta	5
2.4 Variedades de papa	6
2.5 Importancia de la papa en Venezuela	8
2.6 Cultivo convencional de la papa	10
2.7 Cultivo <i>in vitro</i> de la papa	11
2.7.1 Micropropagación y formación de microtubérculos	12
2.8 Factores que afectan la tuberización en campo e <i>in vitro</i>	15
2.8.1 El fotoperiodo	15
2.8.2 La temperatura	17
2.8.3 La consistencia del medio de cultivo	18
2.8.4 La concentración de sacarosa en el medio de cultivo	19
2.8.5 Las giberelinas y el PHYB en la microtubercización	20
2.8.6 La concentración de citoquininas	21
2.8.7 Efecto del Nitrato de plata en la microtubercización	22
3. Justificación	24
4. Objetivos	26
5. Materiales y métodos	27
5.1 Micropropagación del material vegetal que se usará como fuente de explantes	27
5.2 Efecto de la concentración de sacarosa, consistencia del medio de cultivo y condiciones lumínicas, sobre la producción de microtubérculos de papa.	27
5.3 Efecto de la concentración de Benciladenina (BA) y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa.	29
5.4. Efecto de la concentración de Giberelinas (GA ₃) y del fotoperiodo sobre la formación de microtubérculos de papa.	31
5.5 Efecto de la concentración de Nitrato de plata (AgNO ₃) y del fotoperiodo sobre la formación de microtubérculos de papa.	32
5.6 Tratamiento estadístico	33
6. Resultados y discusión	37
6.1 Micropropagación del material vegetal que se usará como fuente de explantes	37
6.2 Efecto de la concentración de sacarosa, consistencia del medio de cultivo y condiciones lumínicas, sobre la producción de microtubérculos de papa.	38
6.2.1 Plántulas cultivadas en medio semisólido, suplementado con tres concentraciones de sacarosa e incubadas bajo condiciones de luz blanca continua.	38
6.2.2. Plántulas cultivadas en medio semisólido, suplementado con tres	41

concentraciones de sacarosa e incubadas bajo oscuridad permanente.	
6.2.3. Plántulas cultivadas en medio líquido, suplementado con tres concentraciones de sacarosa e incubadas bajo condiciones de luz blanca continua.	43
6.2.4. Plántulas cultivadas en medio líquido, suplementado con tres concentraciones de sacarosa e incubadas bajo oscuridad permanente.	46
6.3 Efecto de la concentración de Benciladenina (BA) y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa.	48
6.3.1 Efecto del fotoperiodo y de la concentración de BA sobre el desarrollo de los vástagos	48
6.3.2 Fase de inducción de microtubérculos	50
6.4. Efecto de la concentración de Giberelinas (GA ₃) y del fotoperiodo sobre la formación de microtubérculos de papa.	54
6.4.1 Efecto del pre-tratamiento con Gas sobre el desarrollo de los vástagos	54
6.4.2 Fase de inducción de microtubérculos	56
6.5 Efecto de la concentración de Nitrato de plata (AgNO ₃) y del fotoperiodo sobre la formación de microtubérculos de papa.	60
6.5.1 Efecto del AgNO ₃ y del fotoperiodo sobre el desarrollo de los vástagos	60
6.5.2 Fase de inducción de microtubérculos	63
7. Conclusiones	68
8. Recomendaciones	71
9. Financiamiento	72
10. Bibliografía	73

III. INDICE DE TABLAS	Págs.
Tabla 1. Producción de papa por región, año 2010.	8
Tabla 2. Diseño experimental para estudiar el efecto de la consistencia del medio y la concentración de sacarosa, sobre la formación de microtubérculos de papa.	28
Tabla 3. Diseño experimental para evaluar el efecto de la concentración de Benciladenina y el fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa.	30
Tabla 4. Diseño experimental para evaluar el efecto de la concentración del nitrato de plata y del fotoperíodo sobre la producción de microtubérculos de papa.	33
Tabla 5. Definición de variables dependiente e independiente de los experimentos realizados.	34
Tabla 6. Diseño estadístico para evaluar el efecto de la concentración de BA y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa.	35
Tabla 7. Diseño estadístico para evaluar, el efecto de la concentración de GAs y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa.	36
Tabla 8. Diseño estadístico para evaluar; en cada variedad, el efecto de la concentración de AgNO ₃ sobre la formación de microtubérculos de papa.	36
Tabla 9. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la longitud de las plantas (LP) de dos meses de edad, y la cantidad de microtubérculos (CMPP), en las variedades Arbolona negra y Granola, cultivadas en medio semisólido e incubadas bajo luz blanca continua.	39
Tabla 10. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la longitud de las plantas (LP) de dos meses de edad, y la cantidad de microtubérculos (CMPP), en las variedades Arbolona negra y Granola, cultivadas en medio semisólido e incubadas bajo oscuridad permanente.	42
Tabla 11. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la longitud de las plantas (LP) de dos meses de edad, y la cantidad de microtubérculos (CMPP), en las variedades Arbolona negra y Granola, cultivadas en medio líquido e incubadas bajo luz blanca continua.	44
Tabla 12. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la longitud de las plantas (LP) de dos meses de edad, y la cantidad de microtubérculos (CMPP), en las variedades Arbolona negra y Granola, cultivadas en medio líquido e incubadas bajo oscuridad permanente.	46

Tabla 13. Efecto de diferentes concentraciones de BA y del fotoperiodo sobre la longitud de las plantas de Arbolona negra y Granola.	49
Tabla 14. Efecto de la concentración de BA y del fotoperiodo (FP) sobre la cantidad de microtubérculos/plantas (CMPP), diámetro (D), peso fresco (PF) y peso seco (PS) de los microtubérculos formados en plantas de dos meses de edad, variedades Arbolona negra y Granola.	50
Tabla 15. Efecto del pre-tratamiento con GA sobre la longitud de las plantas, de dos meses de edad, variedades Arbolona negra y Granola.	55
Tabla 16. Efecto de la concentración de giberelinas (GA) y del fotoperiodo (FP) sobre la cantidad de microtubérculos/plantas (CMPP), diámetro (D), peso fresco (PF) y peso seco (PS) de los microtubérculos formados en plantas dos meses de edad, variedades Arbolona negra y Granola.	57
Tabla 17. Efecto del AgNO ₃ sobre la longitud de las plantas de dos meses de edad, variedades Arbolona negra y Granola	61
Tabla 18. Efecto de la concentración de nitrato de plata y del fotoperiodo (FP) sobre la cantidad de microtubérculos/plantas (CMPP), diámetro (D), peso fresco (PF) y peso seco (PS) de los microtubérculos formados en plantas dos meses de edad, variedades Arbolona negra y Granola.	64

IV. INDICE DE FIGURAS	Págs.
Figura 1. Morfología de la planta de papa	6
Figura 2. Nutrientes de la papa por cada 100 g de papa.	9
Figura 3. Ejemplo de microtubérculos formados en segmentos de tallo con un nudo en respuesta a varios fotoperiodos.	17
Figura 4. La participación de los iones de cobre en la transducción de la señal del etileno	22
Figura 5. Hojas de plantas de papa <i>in vitro</i> con dos meses de edad, A. variedad Arbolona negra y B. variedad Granola (20X).	37
Figura 6. Detalles de hojas de Arbolona negra. A. Haz y envés, B. Hoja compuesta con 5 foliolos. C. Hoja inmadura, D. Detalle de los foliolos secundarios (20X).	38
Figura 7: Plántulas de Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivadas en medio semisólido suplementado con tres concentraciones de sacarosa (25, 50 y 100 g/L) e incubadas bajo luz blanca continua.	40
Figura 8: Microtubérculos formados en plántulas de Granola, con dos meses de edad, cultivadas en medio semisólido con 50g/L de sacarosa y bajo luz blanca continua.	40
Figura 9: Plántulas de Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivadas en medio semisólido suplementado con tres concentraciones de sacarosa (25, 50 y 100 g/L) e incubadas bajo oscuridad permanente.	42
Figura 10: Plántulas de Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivadas en medio líquido suplementado con tres concentraciones de sacarosa (A: 25 g/L, B: 50 g/L y C: 100 g/L) e incubadas bajo luz blanca continua.	45
Figura 11. Microtubérculos formados en plántulas de Arbolona negra (A y B) y Granola (C y D), con dos meses de edad, sembradas en medio líquido con 50g/L de sacarosa y bajo luz continua.	45
Figura 12. Plántulas de Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivadas en medio líquido suplementado con tres concentraciones de sacarosa (A: 25 g/L, B: 50 g/L y C: 100 g/L) e incubadas bajo oscuridad permanente.	47
Figura 13: Análisis de la interacción condición lumínica–concentración de sacarosa–consistencia del medio de cultivo sobre la cantidad, diámetro, peso fresco y peso seco de los microtubérculos de papa.	48
Figura 14. Plantas de Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivadas bajo días cortos y tres concentraciones de BA: A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 5 mg/L.	49
Figura 15. Plantas de Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivadas bajo luz blanca continua y tres concentraciones de BA: A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 5 mg/L.	49

- Figura 16.** Análisis de la interacción condición lumínica – BA sobre la cantidad, diámetro, peso fresco y peso seco de los microtubérculos de papa. 51
- Figura 17.** Microtubérculos de Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivadas bajo condiciones fotoperiódicas de días cortos y tres concentraciones de BA: A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 5 mg/L. 52
- Figura 18.** Microtubérculos de Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivadas bajo condiciones de luz blanca continua y tres concentraciones de BA: A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 5 mg/L. 52
- Figura 19.** Plantas de Arbolona negra y Granola de dos meses de edad, cultivadas bajo fotoperiodo de días cortos, pretratadas con 0,25 mg/L de GA y posteriormente subcultivadas en tres concentraciones de BA: A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 5 mg/L. 52
- Figura 20.** Plantas de Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivadas bajo luz blanca continua, pretratadas con 0,25 mg/L de GA₃ y posteriormente subcultivadas en tres concentraciones de BA: A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 5 mg/L. 56
- Figura 21.** Análisis de la interacción condición lumínica – BA sobre la cantidad, diámetro, peso fresco y peso seco de los microtubérculos de las plantas de papa pretratadas con GA. 58
- Figura 22.** Microtubérculos de Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivados bajo fotoperiodo de días cortos, pretratados con 0,25 mg/L de GA₃ y subcultivados en medios suplementados con tres concentraciones de BA: A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 5 mg/L. 58
- Figura 23.** Microtubérculos de Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivados bajo condiciones de luz blanca continua pretratados con 0,25 mg/L de GA₃ y subcultivados en medios suplementados con tres concentraciones de BA: A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 5 mg/L. 59
- Figura 24.** Plantas de Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivadas bajo fotoperiodo de días cortos y tres concentraciones de AgNO₃: A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 1,5 mg/L. 62
- Figura 25.** Plantas de Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivadas bajo condiciones de luz blanca continua y tres concentraciones de AgNO₃: A. 0 mg/L, B. 2,5 mg/L y C. 5 mg/L. 62
- Figura 26.** Detalle de plantas de Granola cultivadas en medio líquido sin AgNO₃ (A') y en medio líquido suplementado con 5 mg/L de AgNO₃ (C'). 63

- Figura 27.** Detalle de hojas con hiperhidricidad, tomadas de plantas de Granola cultivadas con 5 mg/L de AgNO_3 bajo luz blanca continua por 2 meses. 63
- Figura 28.** Análisis de la interacción condición lumínica– AgNO_3 sobre la cantidad, diámetro, peso fresco y peso seco de los microtubérculos de las plantas de papa. 65
- Figura 29.** Microtubérculos de Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivados bajo fotoperiodo de días cortos y dos concentraciones de AgNO_3 : A. 0 mg/L, B. 2,5 mg/L y C. 5 mg/L. 66
- Figura 30.** Microtubérculos de Granola, de dos meses de edad, cultivados bajo luz blanca continua y dos concentraciones de AgNO_3 : A. 0 mg/L, B. 2,5 mg/L y C. 5 mg/L. 66
- Figura 31.** Microtubérculos de Granola cultivados en medio con 2,5 mg/L de AgNO_3 , bajo luz blanca continua. 67

IV.ABREVIATURAS

GA: Giberelinas

BA: Benciladenina

K: Cinetina

AIA: Ácido Indol Acético

AgNO₃: Nitrato de plata

Sac.: Sacarosa

FP: Fotoperiodo

MS: Murashige y Skoog

CMPM: Cantidad de microtubérculos/planta

D: Diámetro de los microtubérculos

PF: Peso fresco de los microtubérculos

PS: Peso seco de los microtubérculos

PHYB: Fitocromo B

MAT: Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras

CIP: Centro Internacional de la papa

V. RESUMEN

En la actualidad, la papa (*Solanum tuberosum* L.) es el cuarto alimento básico en el mundo luego del arroz, el trigo y el maíz. En Venezuela, los productores de papa de la región Andina, siembran principalmente las variedades Granola, procedente de Alemania y en menor proporción, la variedad nativa Arbolona negra, procedente del estado Mérida. El cultivo de papa es altamente susceptible al ataque de patógenos que pueden afectar significativamente la producción de los tubérculos semilla; en consecuencia, ha sido necesario implementar metodologías *in vitro* para la producción de plantas de papa y de microtubérculos libres de patógenos. Se ha reportado que la microtuberización puede verse afectada por factores ambientales tales como la luz, la temperatura y el fotoperíodo, así como también por la composición y consistencia del medio de cultivo. En este sentido, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo y del fotoperíodo sobre la producción de microtubérculos de papa variedades Arbolona negra y Granola. Para ello, se micropropagaron plantas de papa variedades Arbolona negra y Granola, utilizando el medio de cultivo semisólido o líquido, propuesto por Murashige y Skoog (1962), suplementado con sacarosa, benciladenina, giberelina y nitrato de plata. Estas plantas se incubaron en diferentes condiciones lumínicas y se determinó la longitud de las plantas y la cantidad, diámetro, peso fresco y peso seco de los microtubérculos. Los resultados muestran que el cultivo en medio semisólido y medio líquido, bajo condiciones de oscuridad permanente no favoreció la formación de microtubérculos en ninguna de las variedades ensayadas. Las plántulas de Granola y Arbolona negra cultivadas en medio líquido suplementado con 5 mg/L de BA e incubadas bajo condiciones de días cortos produjeron la mayor cantidad de microtubérculos por planta (3,80 y 1,90 respectivamente), y de mayor peso seco. El pre-tratamiento con GA incrementó la longitud de los vástagos de ambas variedades; sin embargo, la cantidad de microtubérculos obtenidos no superó la cantidad obtenida en las plantas que no fueron pre-tratadas con GA. La aplicación de nitrato de plata al medio de cultivo líquido redujo considerablemente la longitud de los vástagos de plantas de ambas variedades, mostrando hiperhidricidad y crecimiento anormal de las plantas. La mayor cantidad de microtubérculos en ambas variedades se obtuvo sin la adición de nitrato de plata al medio de cultivo, tanto en plantas incubadas en luz blanca continua como en fotoperíodo de días cortos.

1. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es un miembro de la gran familia de las Solanáceas, a la cual pertenecen según Badillo & col. (2005) otras especies como el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y la berenjena (*Solanum melongena* Mill.). De acuerdo con el Centro Internacional de la Papa (CIP), ubicado en Lima, el cultivo de la papa tuvo su origen probablemente en las cercanías del lago Titicaca en el Alto Perú, hace más de 8 mil años (CIP, 2012). Con el tiempo su consumo fue creciendo y su cultivo se expandió a todo el mundo hasta posicionarse actualmente como uno de los principales alimentos para el ser humano.

En el año 2010, la producción mundial fue de aproximadamente 300 megatoneladas de papa, registrada principalmente en el continente Asiático y Oceanía. En tanto que, el mayor rendimiento se obtuvo en el continente Latinoamericano (FAOSTAT, 2010). En Venezuela, las áreas más importantes de producción de papa se encuentran situadas principalmente en los estados Lara, Mérida y Trujillo (Romero & Monasterios, 2008). En un informe realizado por el Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras (2011), se reportó que la producción nacional alcanzó aproximadamente 512.544 toneladas métricas.

Como fuente de alimento, la papa es un cultivo rico en carbohidratos principalmente por su alto contenido de almidón, el cual conforma el 80% de la materia seca. A través del consumo de papa hay una importante contribución de proteínas, minerales como el hierro y el fósforo, y vitaminas como la C y las del complejo B, de gran importancia en la nutrición del ser humano (Poehlman & Allen, 2003).

La papa tiene la diversidad genética más abundante de cualquier otra planta cultivada. Los recursos genéticos de las papas de los Andes Suramericanos incluyen variedades silvestres, especies autóctonas cultivadas, variedades producidas por los agricultores locales e híbridos de plantas cultivadas y plantas silvestres. La diversidad genética les ha conferido características importantes, como la resistencia a plagas y enfermedades, valor nutritivo, gusto y adaptación a condiciones climáticas extremas (Bachem & col. 1996)

El CIP reporta que existen más de 4000 variedades nativas que crecen en los Andes de Perú, Bolivia y Ecuador. En Venezuela, las variedades de papa más comúnmente sembradas son: Sebago, Red Pontiac, Alpha, Kennebec, Merideña y Arbolona negra (originarias de Venezuela) y Granola, de origen alemán. Precisamente, estas dos últimas variedades, son objeto de estudio en esta investigación.

Hay dos maneras de obtener plantas de papa en campo, bien por vía reproductiva, con la participación de los órganos sexuales masculinos y femeninos en la flor, o por vía vegetativa mediante la siembra de los tubérculos (Lindorf & col. 2006). Cuando las papas se reproducen en forma vegetativa, como clones, está garantizada una propagación estable. Sin embargo, los tubérculos que se toman de plantas enfermas transmiten la enfermedad a las plantas que se desarrollan a partir de ellos. Para evitarlo, el tubérculo que se usa como semilla tiene que producirse en condiciones de estricto control de las enfermedades, lo que encarece el costo del material de propagación, limitando su disponibilidad para los agricultores de los países en desarrollo. Una alternativa para superar este problema, es el cultivo *in vitro* (Huaman, 1986).

Las técnicas de cultivo *in vitro* propuestas por G. Haberlandt a comienzos del siglo XX, se basaron en el principio de la totipotencia celular y el balance hormonal. Estas técnicas no sólo han contribuido a mejorar la comprensión de los eventos de diferenciación celular, sino también a la utilización de tales eventos en el mejoramiento genético, la conservación de germoplasma y la obtención de plantas libres de virus. En el caso particular de la papa, el cultivo *in vitro* ofrece una solución económica al problema de la presencia de patógenos en el tubérculo semilla. Las plántulas se pueden micropropagar *in vitro* un número ilimitado de veces, cortándolas en fracciones llamadas explantes y sembrándolas en un medio de cultivo rico en nutrientes. Con las plántulas se pueden producir pequeños tubérculos en recipientes, o transplantarse al terreno donde crecen y producen papas semilla económicas y sin enfermedades. Esta técnica es muy popular y se utiliza comercialmente en muchos países en vías de desarrollo (Villalobos & Thorpe 1993).

La micropropagación es quizás la manera más fácil de obtener plantas *in vitro*, en comparación con la organogénesis o la embriogénesis somática, en las cuales existe la

posibilidad de que las células del explante deban pasar por una fase de dediferenciación para luego rediferenciarse en nuevos tejidos. Durante los años 50, se crearon métodos elementales de cultivo tisular y desde finales del siguiente decenio se utiliza comercialmente la micropropagación para multiplicar materiales de siembra. Se estima que todos los años se obtienen por micropropagación, no sólo plantas de papa, sino cientos de millones de individuos vegetales agrupados en miles de variedades. (Villalobos & Thorpe 1993).

Sin embargo, es importante destacar que el éxito de la micropropagación depende de la composición del medio en donde sean cultivados los explantes y la atmósfera gaseosa en donde se desarrollen. Entre los factores más comunes que afectan la micropropagación en papa, se mencionan: la temperatura, el fotoperiodo, la concentración de sacarosa, el balance hormonal y la adición de algún otro compuesto químico como el nitrato de plata utilizado para inhibir la toxicidad del etileno que se concentra en frascos cerrados (Morales, 2006; Rodríguez-Falcón & col., 2006; Sakar, 2010).

Este trabajo tiene la finalidad de comparar el efecto de la composición del medio de cultivo y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.), entre las variedades Arbolona negra (nativa) y Granola (comercial).

2. ANTECEDENTES

En esta sección del trabajo se describen algunos aspectos relacionados con la investigación realizada. Se inicia con la descripción botánica de la especie *Solanum tuberosum* y el probable origen de la misma. Seguidamente se hace referencia a la morfología de la planta y las variedades estudiadas en este trabajo. Por otra parte, se destaca la importancia del cultivo de papa en Venezuela y se explica cómo es el cultivo convencional de la papa. Por último, se destacan las técnicas de cultivo *in vitro* y los factores que afectan la microtuberización.

Descripción botánica de la especie

A continuación se presenta la ubicación de la papa en un sistema jerárquico de categorías taxonómicas, de acuerdo con Badillo & col. (2005):

Reino: Vegetal

División: Magnoliophyta

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Subfamilia: Solanoideae

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum tuberosum* L.

Subespecies: *S. tuberosum* subsp. *andigena*

S. tuberosum subsp. *tuberosum*

Según Huamán (1986), el juego de cromosomas de la papa consta de 12 cromosomas. Las células somáticas de las especies cultivadas de papa pueden variar entre el nivel diploide y hexaploide (74,6% son diploides, el 3,8% son triploides, el 14,8% son tetraploides, el 1,6 % son pentaploides y el 5,2% son hexaploides) en donde *S. tuberosum* ssp. *andigenum* y *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* se ubican dentro del grupo de tetraploides.

S. tuberosum ssp. *andigenum* es nativa de los Andes del Perú y se distribuye desde Venezuela hasta el norte de Argentina mientras que *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* se cultiva en todo el mundo (Huamán, 1986). Las diferencias morfológicas entre las dos subespecies de *S. tuberosum* son muy pequeñas. La principal de ellas es que *S. tuberosum* ssp. *andigenum* depende de un fotoperiodo corto para tuberizar mientras que *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* tuberiza bajo días largos o cortos. *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* tiene plantas, hojas y tubérculos más grandes, por esta razón se cultiva más. Además de estas diferencias morfológicas, ambas subespecies se hallan netamente diferenciadas genéticamente, tanto a nivel del genoma del cloroplasto como el nuclear (Castro & col., 2012)

Origen del cultivo de la papa

Los investigadores del CIP afirman que la historia de este cultivo comenzó hace unos 8.000 años, cerca del lago Titicaca, ubicado a 3.800 metros sobre el nivel del mar, en la cordillera de los Andes, en la frontera entre Bolivia y Perú. Según esta organización, las comunidades de cazadores y recolectores que habían poblado el sur del continente por lo menos unos 7.000 años antes, comenzaron a domesticar las plantas silvestres de papa que se daban en abundancia en los alrededores del lago. La invasión española en 1532, puso fin a la civilización inca, pero no a la papa, porque a lo largo de toda la historia andina, la papa, en todas sus formas, ha sido por excelencia el "alimento del pueblo" y ha desempeñado un papel central en el comercio de todos los países de esta región (CIP, 2012).

Morfología de la planta

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una planta herbácea, tuberosa, perenne, de tallo erecto que puede medir hasta 1 metro de altura. Las hojas en su madurez son compuestas imparipinadas y se disponen de forma helicoidal a lo largo del tallo. Sus inflorescencias son cimosas, con flores púrpuras o blancuzcas de 3 a 4 cm de diámetro, 5 sépalos y 5 pétalos unidos, ovario súpero. Los tallos aéreos son herbáceos, suculentos y pueden alcanzar de 0,6 a 1,0 m de longitud. El sistema radical es fibroso, ramificado y extendido superficialmente, pudiendo penetrar hasta 0,8 m de profundidad. Los tubérculos son tallos modificados y constituyen los principales órganos de almacenamiento de la planta de papa. Un tubérculo

tiene dos extremos: el basal, ligado al estolón, llamado talón, y el extremo opuesto que se llama extremo apical o distal. Los ojos se distribuyen sobre la superficie del tubérculo siguiendo un espiral. Se concentran hacia el extremo apical y están ubicados en las axilas de hojas escamosas llamadas cejas.

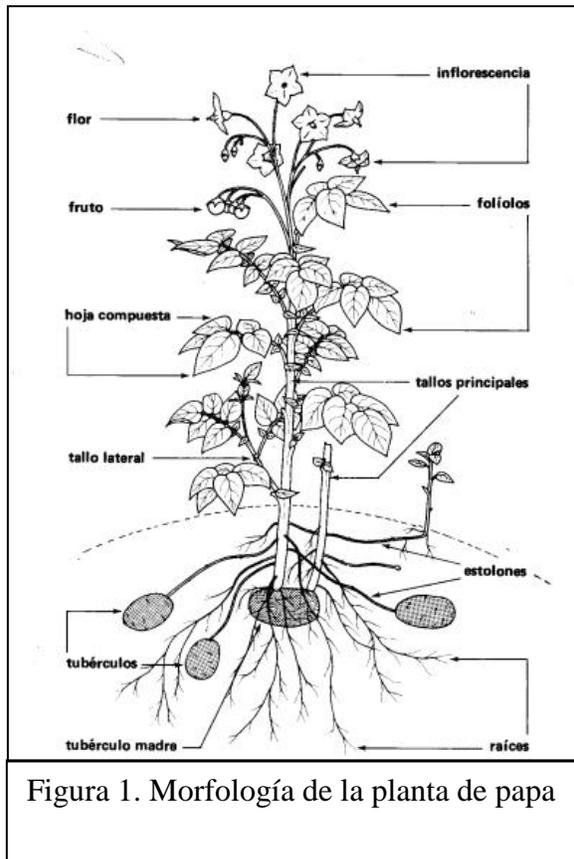


Figura 1. Morfología de la planta de papa

Morfológicamente, los ojos del tubérculo corresponden a los nudos de los tallos, las cejas representan las hojas y las yemas de los ojos representan las yemas axilares. Los tubérculos pueden presentar una forma alargada, redondeada y oblonga, y su color puede ser blanco, amarillo, violeta, rojizo, entre otros (Poehlman & Allen, 2003).

Variedades de papa

Un aspecto importante a considerar es la disponibilidad de cultivares o variedades para la multiplicación de la papa. Según Romero (2007), se considera que una variedad es elegible cuando por sus características agronómicas y tecnológicas reúne las condiciones necesarias como para ser plantada en el país, de manera que satisfaga las necesidades económicas del agricultor, así como las de la industria nacional. El CIP (2012) reporta que actualmente existen más de 4.000 variedades de papas nativas que crecen en los Andes de Perú, Bolivia y Ecuador.

De acuerdo con este Centro, existen 226 especies silvestres distribuidas en 10.000 km de longitud, desde el suroeste de Estados Unidos hasta el sur de Chile, con la mayoría de las especies concentradas en Perú y Bolivia. Ellas crecen en diferentes suelos y climas, desde el árido desierto a lo largo de la costa peruana, pasando por los valles interandinos, hasta

altitudes de 4.200 msnm. Estas especies, no comestibles, son los antepasados originales de las papas cultivadas hoy en día. Los tubérculos silvestres son más pequeños que las papas cultivadas y poseen una gran variedad de formas y colores.

Según Romero (2007), en Venezuela los productores de papa siembran principalmente las variedades Granola, procedente de Alemania y Arbolona negra, procedente del estado Mérida, y en menor proporción, se cultivan otras variedades tales como Caribay, Diacol capiro, Monserrate, Atlantic, Kennebec, Alpha, entre otras.

La variedad Granola, perteneciente al grupo *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, es de alta preferencia en el mercado, con la limitante antes señalada de su alta susceptibilidad al Oomycete *Phytophthora infestans*, causante de la enfermedad del tizón tardío, que ocasiona grandes pérdidas en la producción. La planta desarrolla 3 a 5 tallos y posee hojas medianas de color verde pálido. En los primeros 15 a 20 días presenta una formación lenta del follaje, que luego acelera su tasa de crecimiento cubriendo bien el terreno. Los tubérculos de esta variedad se adaptan a zonas medias y altas de cultivo en nuestro país, pueden demorar de 3 a 4 meses para poder ser cosechados, son de tamaño mediano a grande, forma ovalada, piel de color amarilla, pulpa amarilla clara (Salas & col., 2000).

Por otra parte, Arbolona Negra es una variedad nativa agrupada dentro de las conocidas “papas negras” y perteneciente al grupo *S. tuberosum* ssp. *andigena*. Se cultiva significativamente en algunas comunidades del estado Mérida (Gavidia, Pueblo Llano y en el Páramo del Pajarito). La flor de Arbolona negra es de color morado intenso y es muy resistente a las heladas. Los tubérculos tienen una corteza de color oscuro y son resistentes a la mayoría de las enfermedades que atacan este cultivo, principalmente al ataque de *Phytophthora infestans*, pero por su maduración tardía, esta variedad ha sido reemplazada en campo. Su maduración ocurre a los 7 o 9 meses, luego de este tiempo se cosechan los tubérculos y se comercializan, siendo sus cualidades principales: alta calidad y diversidad en los sabores y texturas, además de la capacidad para permanecer en almacenamiento por varios periodos de tiempo sin dañarse (Romero & Monasterio, 2008).

Importancia de la papa en Venezuela

El uso de la papa en la alimentación se inició hace aproximadamente 7.000 años, cultivándose desde el nivel del mar hasta los 4.200 msnm en las montañas andinas del Perú, Bolivia y Ecuador. Su mayor producción se concentra en latitudes de 25 a 55 grados norte-sur, es decir, en regiones templadas de todo el mundo (Romero, 2007).

En la actualidad, la papa es el cuarto alimento básico en el mundo luego del arroz, el trigo y el maíz. Figura entre los diez alimentos más importantes producidos en los países en vías de desarrollo. Hasta inicios de la década de los 90, casi la totalidad de las papas se producían y consumían en Europa, América del Norte y en los países de la antigua Unión Soviética. En la actualidad, se cultivan papas en 18,6 hectáreas de tierras agrícolas en 149 de los 167 países del mundo. En el año 2010, la producción mundial fue de aproximadamente 300 megatoneladas de papa, concentrándose en el continente Asiático y Oceanía. En tanto que, el mayor rendimiento se obtuvo en el continente Latinoamericano (ver Tabla 1). Actualmente China es el primer productor de papa a escala mundial, seguido de India, Federación Rusa y Estados Unidos (FAOSTAT, 2010).

Tabla 1. Producción de papa por región, año 2010.

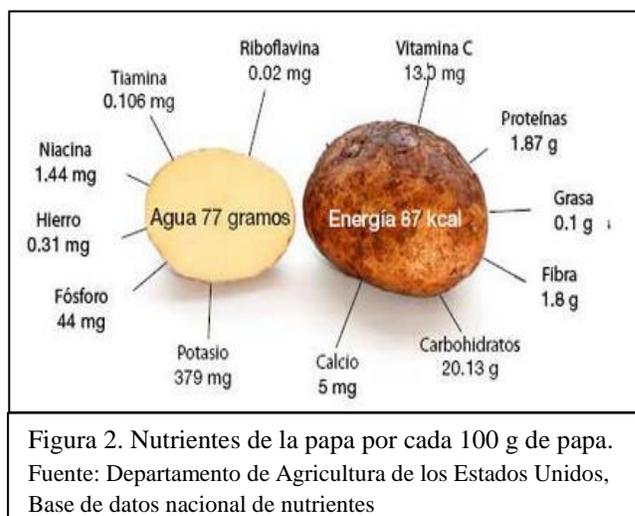
	Área Cosechada (ha)	Cantidad (Ton)	Rendimiento (Ton/ha)
África	1.805.921	23.467.851	12,99
Asia/Oceanía	9.131.245	154.064.837	53,39
Europa	6.103.799	107.473.229	17,61
Latinoamérica	1.008.725	16.737.002	62,97
Norteamérica	546.533	22.438.970	41,06
MUNDO	18.596.223	324.181.889	17,43
China	5.077.504	74.799.084	14,73
Rusia	2.109.100	21.140.500	10,02
India	1.835.300	36.577.300	19,93
USA	406.588	18.016.200	44,31

Fuente: FAOSTAT

En Venezuela, el cultivo de papa se centra principalmente en la región andina donde las condiciones ambientales son favorables para su desarrollo, siendo considerado como el producto básico decimosexto y el primer producto de tubérculos de importancia para el país. En el año 2010, de las 1.252.443 toneladas métricas de tubérculos producidos en un

área de 105.442 hectáreas, 512.544 toneladas métricas correspondieron a la producción de papa en una superficie aproximada de 28,99 hectáreas.

En Venezuela, el estado Mérida es el que posee el mayor rendimiento (22 ton/ha) y la mayor superficie sembrada (9.213 ha), seguido por el estado Táchira con una superficie cultivada de 2.719 ha (Romero, 2007). Sin duda, la papa es el principal rubro entre los que sustentan la economía rural de las zonas andinas (MAT, 2011).



El cultivo de papa es de suma importancia en nuestro país, no solo por el bajo costo de producción, lo que lo hace accesible a los estratos poblacionales de bajos ingresos, sino también por ser una fuente sana de alimento dado su alto valor nutricional. La papa produce alrededor de 80 Kcal/100g de peso fresco y tiene cerca del 2% de

proteínas (peso del producto fresco), el contenido más elevado de proteínas de la familia de los cultivos de raíces y tubérculos. El contenido vitamínico de la papa es similar al de otras hortalizas: 100 g de papa hervida suministran cerca del 10% de la cantidad total diaria recomendada de tiamina, niacina, ácido ascórbico, de 5 al 10% de ácido fólico o pantoténico y cerca de la mitad de la ingesta diaria recomendada de vitamina C. Además la papa es una fuente de minerales tales como: hierro, fósforo, magnesio y potasio (FAOSTAT, 2010).

La papa es el alimento ideal para las regiones sobre los 2.000 msnm donde hay pocas opciones de cultivos y donde el hombre y los animales necesitan más energía para su subsistencia (Silva & Cordero, 2009). Actualmente, la tendencia en el mundo es hacia el aumento de consumo del tubérculo en cualquiera de sus presentaciones, desde las conocidas papas al vapor hasta las papas fritas.

Cultivo convencional de papa

Las plantas de papa pueden obtenerse fácilmente mediante reproducción sexual o asexual. El primer caso requiere la participación de los órganos reproductivos femeninos (pistilos) y masculinos (anteras) de las flores, en las que tiene lugar la unión del material genético de los progenitores, lo que da origen a plantas con nuevas combinaciones de genes (Lindorf & col., 2006).

En la reproducción asexual, llamada también vegetativa, la nueva planta se forma a partir de los tubérculos y, por no haber cruce de material hereditario, posee la combinación de genes del individuo al que pertenecían esos tubérculos. Esta forma de reproducción da lugar a descendientes genéticamente idénticos a la planta inicial, es decir, a clones de ella (Poehlmann & Allen, 2003).

Durante el crecimiento de la planta de papa, sus hojas compuestas van sintetizando el almidón que es transferido posteriormente hacia los tallos subterráneos o estolones. Estos tallos se engrosan para formar tubérculos cerca de la superficie del suelo. Se pueden llegar a formar de unos pocos hasta 20 tubérculos. El número de éstos que llega a la madurez depende de la disponibilidad de humedad y nutrientes en el suelo. El tamaño y forma de los tubérculos puede variar y el peso puede alcanzar un máximo de 300g. cada uno (Romero & Monasterio, 2008).

Al final de la temporada de cultivo, las hojas y tallos mueren y los nuevos tubérculos se separan de la planta, convirtiéndose en órganos de almacenamiento de nutrientes, lo que le permite a la planta resistir el frío para más adelante volver a crecer y reproducirse. Cada tubérculo tiene de dos a diez brotes (ojos), distribuidos en patrón espiral alrededor de la superficie. De los brotes se generan plántulas que crecen cuando las condiciones son nuevamente favorables (Romero & Monasterio, 2008).

De manera general, se han definido cuatro pasos en la formación del tubérculo: 1) Inducción e iniciación del estolón, 2) Crecimiento del estolón (elongación y ramificación), 3) Cese del crecimiento longitudinal del estolón y 4) Inducción e iniciación del tubérculo, lo que da como resultado un crecimiento radical de la punta del estolón, formando un tubérculo. Estos pasos pueden separarse experimentalmente, ya que las condiciones

ambientales y los tratamientos hormonales les afectan de forma diferente (Salisbury & Ross, 2000).

El tubérculo de papa presenta todas las características de un tallo, aunque sea subterráneo. Sus yemas axilares permanecen inactivas en respuesta a la presencia de la yema apical. Cuando se corta el tubérculo, la dominancia apical se pierde y las yemas axilares crecen en caso de que se haya interrumpido la latencia. Hay razones prácticas tanto para prolongar como para interrumpir la latencia del tubérculo. Cuanto más tiempo puedan mantenerse los tubérculos en forma latente hasta que sean comercializados, mayor será su precio de venta. Sin embargo, en la certificación de semilla de papa, es recomendable interrumpir la latencia con anticipación para comprobar si hay agentes patógenos en los tubérculos de la muestra (Poehlman & Allen, 2003).

La propagación vegetativa por medio de tubérculos tiene algunas desventajas tales como: la transmisión de enfermedades virales y bacterianas, costos por transporte de tubérculos pesados y voluminosos, y brote de tubérculos antes de la temporada de plantación. Sin embargo, una ventaja clara de la propagación vegetativa es que después de que el fitomejorador ha seleccionado una variedad determinada, es posible comercializarla como un cultivar mejorado y conservarla en su estado genético original (Poehlman & Allen, 2003).

Cultivo *in vitro* de la papa

El cultivo de tejidos vegetales se define como un conjunto de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante, tal como protoplastos, células, tejidos y órganos, se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. Estas técnicas pueden ser utilizadas como herramientas para micropropagación, eliminación de virus y enfermedades, producción de haploides, aislamiento y utilización de protoplastos, cultivo de embriones, producción de fitoquímicos, ingeniería genética, mutación y selección celular, producción de semillas sintéticas y estudios básicos de anatomía, desarrollo, fisiología y nutrición vegetal (Salisbury & Ross, 2000).

El desarrollo de todas las técnicas *in vitro* se sustentan sobre el principio de la totipotencia celular, propuesta por Haberlandt en 1902, citado en el trabajo de Villalobos &

Thorpe (1993). La totipotencia celular se refiere a la capacidad de regeneración de un organismo completo a partir de una célula vegetal. Así, dicha célula contiene en su material genético la información necesaria para expresar durante su ciclo vital cualquier rasgo morfológico, químico y/o funcional de la célula, tejido y planta.

Villalobos & Thorpe (1993), comentan que un aspecto importante en el cultivo *in vitro* es la preparación del medio en el que crecerán las nuevas plantas, el cual se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas, hormonas vegetales, azúcar, agua y opcionalmente agar. El medio más utilizado por numerosos investigadores es el desarrollado por Murashige & Skoog en 1962, debido a que reúne todos los macro y micronutrientes necesarios para el desarrollo de la mayoría de las especies vegetales cultivadas *in vitro*.

La composición del medio depende de la especie vegetal con la que se esté trabajando; en el caso particular de la papa, para su multiplicación *in vitro* se utilizan medios nutritivos que incluyen sacarosa y hormonas vegetales (Rigato & col., 2001).

El hecho de que la papa sea un cultivo seriamente afectado por muchas plagas y enfermedades, lo convierte en un importante candidato para la manipulación genética. A través del cultivo de tejidos se pueden conservar germoplasmas y transferir genes que le confieran resistencia a enfermedades y mejoren las características agronómicas de la papa. Para esto, la regeneración *in vitro* de plantas vía micropropagación, organogénesis o embriogénesis somática es un prerrequisito. Se ha reportado para diferentes variedades de papa una eficiente regeneración de plantas a partir de una gama de explantes tisulares, incluyendo hoja, tallo y tubérculo (JayaSree & col., 2001).

Micropropagación y formación de microtubérculos.

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, tales como segmentos de tallo con yemas o meristemas aislados, los cuales son cultivados asépticamente en un tubo de ensayo o en otro recipiente en que se puedan controlar estrictamente las condiciones del ambiente y la nutrición, teniendo como resultado plantas genéticamente idénticas a la planta parental (Arellano & col., 2010).

La micropropagación constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura. Se aplica en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales.

Según Villalobos & Thorpe (1993), el proceso de micropropagación comprende las siguientes fases:

- a) Fase 0. Corresponde a la pre-adaptación del material parental a condiciones homogéneas que favorezcan la multiplicación vegetativa *in vitro*.
- b) Fase I (Inducción). Es la primera etapa del cultivo durante la cual se induce el desarrollo del explante con potencialidad. En esta fase se pueden utilizar algunas hormonas tales como las citoquininas.
- c) Fase II (Multiplicación). Los vástagos inducidos en la primera fase son multiplicados por medio de la inducción de brotes adventicios para aumentar el número de plantas que se derivan de una sola planta madre.
- d) Fase III (Enraizamiento). Los tallos producto de las fases I y II son ahora tratados para inducir la formación de raíces y producir plántulas completas.
- e) Fase IV (Aclimatación). Esta es la etapa más difícil del cultivo, cuando las plántulas salen del ambiente estéril y rico en nutrientes para iniciar su desarrollo en tierra. Esta fase requiere de condiciones adecuadas y grandes cuidados para que las plántulas no mueran por pérdida o exceso de agua, o bien por el ataque de microorganismos.

Muchos investigadores sugieren la micropropagación de papa para la producción de semilla, para la colección y la distribución de germoplasma a través del mundo y para el hallazgo de clones de interés en la agricultura. De García (1991), en un proyecto destinado a la obtención de clones de papa resistentes a las heladas, logró producir microtubérculos de las plantas transformadas mediante el empleo de las técnicas de cultivo *in vitro*.

Las papas son susceptibles a una serie de enfermedades que reducen la productividad y la calidad de los tubérculos. Además, los patógenos se acumulan durante la clonación sucesiva del tubérculo y en el suelo donde se cultivan. Por eso la producción sostenible de papa depende de la renovación constante del material de siembra libre de enfermedades (Agrios, 2005).

Una innovación importante para la industria de la papa en los países desarrollados fue la adopción generalizada, en el decenio de 1970, de la micropropagación como sistema para multiplicar plantas libres de enfermedades, que se pueden usar para producir tubérculos semilla sanos para los agricultores. Primero se eliminan los virus y otros patógenos cultivando plantas de papa en un ambiente controlado a temperatura elevada. Después se colocan los brotes libres de enfermedades en un medio nutritivo estándar en recipientes de vidrio y en un entorno completamente aséptico. Los brotes se convierten en plántulas que se pasan a un invernadero o a una parcela protegida contra las plagas de insectos; allí se desarrollan y producen pequeños tubérculos (Año Internacional de la Papa, 2008).

Una vez cosechados, estos pequeños tubérculos se deben almacenar en frío. Después de 45 días, y por un período de hasta siete meses desde la cosecha, se pueden trasladar a lugares más cálidos para inducir la producción de brotes. Una vez sembrados, producirán tubérculos de tamaño normal, libres de enfermedades, y estarán listos para distribuirse a los agricultores (Año Internacional de la Papa, 2008).

La micropropagación está ayudando a los países en desarrollo a producir tubérculos “semilla” económicos y libres de enfermedades, e incrementar la productividad. Según Romero (2007), la obtención de microtubérculos hoy en día es de suma importancia económica, debido a que una vitroplanta genera 20 a 30 tubérculos en el invernadero, y luego cada tubérculo se multiplica por 20 o 30 en cada ciclo. Luego de 4 ciclos, una vitroplanta puede haber generado 3,2 millones de tubérculos. En otras palabras, una vitroplanta puede generar más de 4000 sacos de semilla certificada, luego de una multiplicación en invernadero y tres en el campo. Esto disminuye los costos de producción, el tiempo de cosecha y el transporte de los tubérculos libres de virus, utilizados como semillas certificadas. El Gobierno venezolano con el fin de alcanzar la Soberanía Agroalimentaria, ha puesto sus esfuerzos en la producción nacional de semillas de calidad tanto por el sistema formal como por la producción artesanal de semillas, siendo su primer objetivo la producción de vitroplantas de papa (Silva & Cordero, 2009).

Gallardo & col. (1997) utilizaron la micropropagación de papa para la multiplicación rápida de clones libres de enfermedades y la obtención de microtubérculos sanos para ser usados como semillas.

Los microtubérculos ofrecen varias ventajas ya que dependiendo de su tamaño, pueden ser almacenados y transplantedos al campo sin la etapa de aclimatación. Según Gallardo & col. (1997), los microtubérculos de longitud mayor a 1 cm pueden cultivarse directamente en campo. También su transporte y comercialización es más fácil, favoreciendo el intercambio internacional de germoplasma. Los principales problemas asociados con la producción de microtubérculos en frascos convencionales, son el bajo rendimiento de tubérculos (1-1,5 tubérculos/planta) y algunas veces su pequeño tamaño, lo cual impide el traslado a campo (García & col., 2004a).

Sin embargo, se han hecho varios ensayos con el propósito de mejorar la calidad y el número de los microtubérculos por planta. Entre éstos se tienen, el cambio de algunos componentes en el medio de cultivo, como por ejemplo: alta concentración de sacarosa y la adición de hormonas vegetales, manipulación de las condiciones del cultivo, tales como la temperatura, el fotoperiodo y por último, el uso de medios líquidos en tubos o biorreactores en agitación (Arellano & col. 2010).

Factores que afectan la tuberización en campo e *in vitro*

Aunque la iniciación del estolón ocurre en un amplio rango de temperaturas y duración del día, el desarrollo de los estolones en tubérculos requiere condiciones más específicas. Según Salisbury & Ross (2000), para la iniciación del estolón es importante que los niveles de giberelinas (GA) sean elevados, mientras que los de citoquininas deben ser bajos. Los días cortos provocan una disminución de las giberelinas en la planta, lo que puede explicar que el estolón deje de alargarse y forme el tubérculo.

Al igual que la tuberización en campo, la microtuberización se ve influenciada por el fotoperiodo, la intensidad de luz, la temperatura, la consistencia y la composición (nutrientes y hormonas) del medio de cultivo (Morales, 2006).

El fotoperiodo

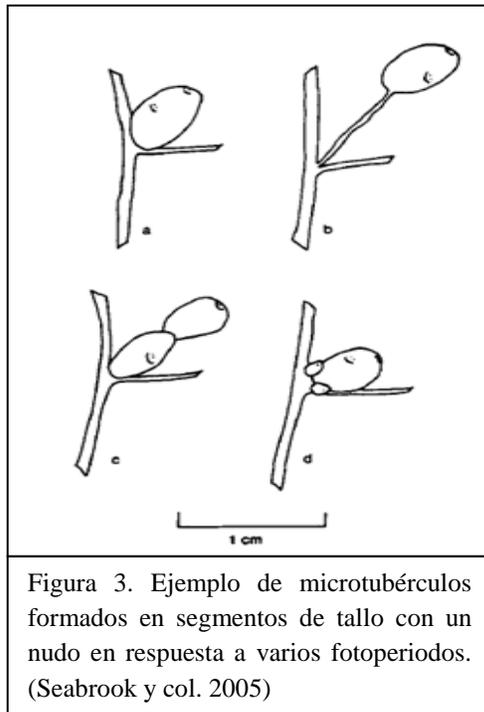
Según Kittipadukal & col. (2012), el sitio principal de percepción de la señal fotoperiódica de tuberización está en las hojas, lo que se demostró cuando las hojas de las papas *andígena* que crecen bajo condiciones inductivas de 8h luz, fueron injertadas en

plantas patrones no inducidas de 16h luz, formándose tubérculos en estas últimas. Mientras que, cuando se injertan los patrones con hojas no inducidas, no hay formación de tubérculos. Se concluye así que las condiciones inductivas son detectadas en la hoja y no en los estolones, lo que lleva a la hipótesis que en respuesta a la señal fotoperiódica las hojas producen un estímulo de tuberización que es transportado a través de la unión del injerto a la planta patrón no inducida en donde se promueve la tuberización (Rodríguez-Falcón & col., 2006).

El responsable de captar la longitud del día en las hojas es el fitocromo, una proteína fotoreceptora que regula el crecimiento y las respuestas fotomorfogénicas de las plantas (Taiz & Zeiger, 2006). Una interrupción de la noche con luz blanca inhibe la tuberización en plantas de días cortos; si dicha perturbación se realiza con luz roja, la inhibición es más efectiva. Sin embargo, un pulso con luz del rojo lejano dado inmediatamente después del pulso de luz roja, invierte el efecto inhibitorio de la ruptura del rojo indicando que la longitud de la noche es captada por los fitocromos, específicamente el PHYB (Rodríguez-Falcón & col., 2006).

La respuesta fotoperiódica de tuberización depende de la subespecie y variedad considerada. Como se mencionó anteriormente, la subespecie *tuberosum* requiere de un fotoperiodo largo para desarrollar su área foliar, en tanto que el proceso de tuberización es indiferente del fotoperiodo. Por el contrario, la subespecie *andigena* tuberiza estrictamente bajo condiciones de día corto y al ser llevada a condiciones de fotoperiodo largo, la etapa de crecimiento se alarga, la floración es más abundante, pero no tuberiza o lo hace escasamente, produciendo tubérculos muy pequeños (Arellano & col., 2010).

Seabrook, (2005) menciona que el fotoperiodo es el principal control morfogénico de tuberización *in vitro* de papa. Las condiciones fotoperiódicas de días cortos son inductivas de la tuberización; de hecho, la formación de microtubérculos puede darse en ausencia de altas concentraciones de sacarosa y sin reguladores de crecimiento, tan sólo con la aplicación de fotoperiodos de días cortos. En el trabajo de Seabrook (2005), la combinación de un pretratamiento de las plantas cultivadas bajo fotoperiodo de días largos y luego transferidas a condiciones inductivas de días cortos, promovió la formación de microtubérculos más grandes y de mayor peso fresco en cuatro cultivares de papa: Jemseg,



Katahdin, Russet Burbank y Superior. Además, el mismo autor demostró que la morfología de la formación del microtubérculo fue influenciada por el fotoperiodo, observándose (a): microtubérculo ideal para la multiplicación, (b): microtubérculo unido al estolón, (c): formación de microtubérculo secundario, (d): microtubérculos axilares secundarios.

Por otra parte, Fixen & col. (2011), estudiaron el efecto del fotoperiodo sobre la formación de microtubérculos de papa, reportando que los días cortos favorecen la tuberización en la subespecie *andigena*, mientras que la exposición continua de las plantas a luz azul, inhibe la tuberización en la

subespecie *tuberosum*.

La temperatura

El tubérculo en latencia inicia su brotación y emergencia en forma lenta a 5°C y se maximiza a los 14-16°C. Es importante considerar esto en la época de plantación ya que ésta debe iniciarse cuando la temperatura del suelo oscile entre los 7-8°C. Las altas temperaturas (28°C o más) son inhibitorias para la tuberización, ya sea en días cortos o días largos, debido a que afectan la fragmentación de los asimilados de carbono, decreciendo la cantidad de éstos hacia los tubérculos e incrementándose en otras partes de la planta (Morales, 2006).

La respuesta fotoquímica a la temperatura tiene estrecha relación con la intensidad lumínica. Así, cuando esta última es alta, la fotosíntesis neta se optimiza. Durante el desarrollo del cultivo, la planta incrementa su área foliar a temperaturas de 20-25°C. Las temperaturas superiores a los 37°C afectan el proceso fotosintético (Arellano & col., 2010)

La consistencia del medio de cultivo

La micropropagación a partir de microesquejes puede realizarse en medios de cultivo semisólidos o líquidos. Según Jara (1996), los medios de cultivo solidificados con agar son comúnmente utilizados para la conservación de germoplasma y la producción masiva de plántulas libres de virus, incluyendo su posterior comercialización. Este medio ofrece la ventaja de mantener por más tiempo el cultivo de las plantas, sin necesidad de refrescarlo cada dos semanas, lo cual disminuye el riesgo de contaminación del explante al no tener que perturbar las condiciones de esterilidad en las que fue cultivado. Por su parte, el cultivo en medio líquido es usado para diferentes fines debido al buen intercambio gaseoso y a la facilidad con que difunden las sustancias tóxicas (fenoles) en el medio. Generalmente, la técnica consiste en colocar unos pocos segmentos nodales en fiolas de 250 mL con 15 mL de medio líquido e incubarlos a 95 rpm en un agitador orbital, para de esta manera permitir la regeneración de los brotes (George & col. 2008). Estos autores señalan que el medio líquido sin estructuras de soporte, es utilizado para los cultivos de protoplastos, para obtener metabolitos secundarios a partir de raíces y para la propagación de embriones somáticos, meristemas nodulares y microtubérculos.

Esta técnica fue desarrollada en plantas de papa por investigadores del CIP, permitiendo con ello la obtención de plántulas en un menor tiempo y con una mayor producción; sin embargo, su implementación es costosa ya que se necesitan equipos en agitación constante y los frascos utilizados ocupan demasiado espacio en el agitador. Una de las desventajas que involucra el cultivo en medio líquido es la formación de estructuras hiperhídricas en los brotes, hojas y raramente en las raíces. Su formación puede evitarse al trasladar el cultivo a medios semisólidos. La causa de estas anormalidades se desconoce, aunque se postula que pueda deberse a cambios en el pH del medio en el cual se desarrollan las plántulas (Jara, 1996).

En la micropropagación en medio líquido, los explantes pueden estar total o sólo parcialmente sumergidos en el medio. Por ejemplo, Pérez & col. (2008) estudiaron la tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Diacol Capiro, en biorreactores de inmersión temporal, en los que se establecen frecuencias de inmersión cada cierto tiempo en distintos volúmenes de medio de cultivo, con el propósito de lograr

que todas las yemas axilares de los segmentos de tallo utilizados, sean inducidas a formar microtubérculos y que éstos, a su vez, alcancen un mayor tamaño para que el investigador pueda utilizarlos directamente en campo y obtener semilla básica.

De manera similar, Jiménez & col. (1999), elaboraron un sistema de inmersión temporal para mejorar la producción de microtubérculos de papa, reportando que esta técnica de cultivo presenta varias ventajas en comparación con los cultivos sólidos, por ejemplo: la inmersión temporal permitió que el medio de cultivo estuviese en contacto con todas las partes de la planta por períodos cortos, así la inducción del microtubérculo fue más uniforme entre los brotes axilares, resultando una mayor producción de estos órganos de almacenamiento. Al mismo tiempo el consumo de nutrientes incrementó y por lo tanto, el tamaño y peso de los tubérculos fue mayor que los valores obtenidos en medio sólido, con diferencias estadísticamente significativas para todas las variables estudiadas.

La concentración de sacarosa en el medio de cultivo.

La sacarosa ha sido ampliamente utilizada como fuente de carbohidratos en la mayoría de las investigaciones *in vitro* de todas las especies y en específico de la papa. Además, tradicionalmente se ha utilizado en la producción de microtubérculos de papa y de ñame (García & col., 2004b).

Algunos autores han referido un doble papel de la sacarosa en el desarrollo de los microtubérculos. Además de ser una fuente de carbono adecuada, fácilmente asimilable por las plantas *in vitro* y que se convierte en almidón en el desarrollo del microtubérculo; la sacarosa, a una concentración de 80 g/L, también proporciona una osmolaridad favorable para el desarrollo del microtubérculo (Khuri & Moorby, 1995).

Morales (2006) menciona que la sacarosa es un inductor de varios genes en el tubérculo, tales como los de la patatina (proteína de reserva), inhibidor de proteinasas II (regulador de proteasas) y ADP-Glc pirofosforilasa. El mismo autor reporta que se han encontrado altos niveles de giberelinas (hormona inhibidora de la microtuberización) en la punta de los estolones, cuando se agrega al medio una concentración de 10 g/L de sacarosa. Estos niveles disminuyen cuando se incrementa la cantidad de sacarosa a 80 g/L, sugiriendo que

este azúcar puede modular los niveles de giberelinas en los estolones y desarrollar mayor cantidad de éstos para la inducción de los tubérculos.

Adicionalmente, Gopal & col. (2004) evaluaron el efecto del genotipo, ácido abscísico y sacarosa sobre la producción de microtubérculos para la conservación del germoplasma de papa, reportando que las concentraciones entre 60 y 80 g/L de sacarosa promovieron la formación microtubérculos e incrementaron su peso seco.

Las giberelinas y el PHYB en la microtuberización.

A causa de que la biosíntesis de las giberelinas bioactivas (GAs) es regulada tanto por la luz como por el PHYB, las GAs han sido implicadas desde hace mucho tiempo en la inhibición fotoperiódica de la tuberización en papa. La iniciación de tubérculos es retardada por la aplicación de giberelinas mientras que la adición de inhibidores de su biosíntesis, tales como cloruro de clorocolina, pacobutrazol o ancimidol, aumenta la formación de tubérculos en explantes de tallo con un solo nudo y en plantas que crecen en invernaderos (Sakar, 2010).

Según Rodríguez-Falcón & col. (2006), una de las evidencias para una función inhibitoria de las giberelinas sobre la formación de tubérculos es que la iniciación de estos órganos está relacionada con una disminución aguda del contenido endógeno de dicha hormona en el estolón. Sin embargo, aunque se acepta que la inducción de tuberización en las plantas de día corto se correlaciona con un tasa reducida de la síntesis de giberelinas bioactivas en las hojas, se ha observado que la transferencia a condiciones de día corto induce el alargamiento de los entrenudos más jóvenes del tallo, función que realiza dicha hormona (Rodríguez-Falcón & col., 2006).

Altos niveles de giberelinas en los estolones afectan negativamente la formación de tubérculos; sin embargo, una alta tasa de conversión de GA_{20} a GA_1 en el vástago, favorece la formación de este órgano de almacenamiento, probablemente por la disminución de los niveles de GA_{20} en los tejidos aéreos y el subsiguiente transporte de este precursor al estolón (Rodríguez-Falcón & col., 2006).

Coria & col. (2004) mencionan que GA₃ inhibe la tuberización porque priva la participación de la glicoproteína patatina, la cual es considerada como un indicador de la actividad promotora del microtubérculo a partir del estolón.

La concentración de citoquininas

Desde hace algún tiempo se ha sugerido que las citoquininas juegan un papel importante en la tuberización pues se cree que ellas estimulan la iniciación y el crecimiento de los tubérculos. La principal muestra de los efectos favorables de las citoquininas en la tuberización fue obtenida en experimentos *in vitro*, en los cuales se observó que la presencia de cinetina en el medio de cultivo estimuló la formación de tubérculos en estolones aislados de papa (Aksenova & col., 2009).

La estimulación de la tuberización inducida por citoquininas es comprensible ya que la iniciación de los tubérculos está relacionada con la citoquinesis y la formación de almidón. Además, estas hormonas estimulan la división celular y mejoran la actividad de los órganos subterráneos. Sin embargo, los tratamientos con cinetina en plantas de papa intactas, estolones y explantes no siempre han resultado en la estimulación de tuberización, sino que algunas veces llevan a su supresión (Aksenova & col., 2009).

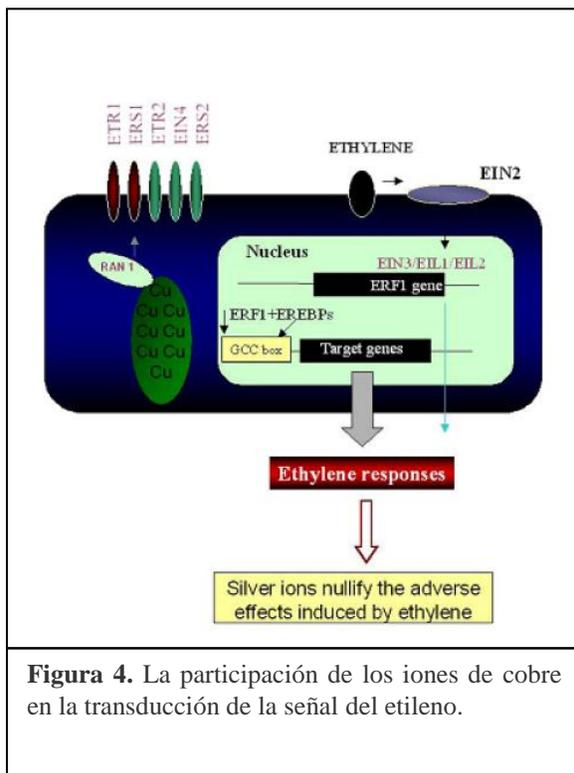
Zhang & col., (2005) determinaron el papel del ácido indol acético (AIA), ácido giberelico (GA) y Benciladenina (BA) en el crecimiento de vástagos y tuberización de *Solanum tuberosum* variedad Zihuabai (cultivar comercial chino), reportando que la presencia de BA fue indispensable para inducir la formación de microtubérculos puesto que no se formaron microtubérculos en los tratamiento con AIA + GA o sólo con AIA.

Rodríguez-Falcón & col. (2006), mencionan que los intentos para inducir la formación de tubérculos aplicando citoquininas en las hojas, han producido resultados ambiguos ya que estos tratamientos son incapaces de inducir la tuberización en plantas *andigena* que crecen bajo condiciones no inducidas. Además, el efecto promotor de estas hormonas podría ser observado solamente en presencia de altas concentraciones de sacarosa por encima del 40%. Estas observaciones sugieren que la citoquinina podría funcionar para controlar el alargamiento y el crecimiento del tubérculo pero no tendría papel en la señalización de la transición para formar estos órganos de almacenamiento.

Efecto del nitrato de plata en la microtuberización

Aunque la propagación de plantas de papa en envases cerrados evita o disminuye la contaminación, algunas veces se puede observar un crecimiento anormal de la planta y una inhibición de la tuberización debido a la acumulación de gases tales como el etileno. Esta hormona vegetal es la responsable de los procesos de estrés en las plantas, la maduración de los frutos, la senescencia de hojas y flores y la abscisión del fruto. Cuando este gas se acumula en envases cerrados, puede inhibir el crecimiento de las plantas y evitar la formación de microtubérculos (Turhan, 2004).

Según Kumar & col. (2009), el receptor de etileno, ETR1, contiene un sitio de enlace al etileno y el enlazamiento está mediado por un ión de Cobre presente en el sitio de enlazamiento de esta molécula. Los iones de plata son capaces de generar insensibilidad al etileno en las plantas. Las mutaciones de insensibilidad al etileno y los iones de plata se



piensa que perturban los sitios de enlace del etileno. El reemplazo del cofactor cobre por la plata bloquea el receptor en una conformación tal, que continuamente reprime los efectos del etileno (ver figura 4). La acción del etileno en las plantas es inhibida por antagonistas débiles tal como el CO₂ y antagonistas fuertes como lo son los compuestos de plata. La inhibición por parte del CO₂ se debe posiblemente a la oxidación del etileno por un sistema enzimático unido a un ión metálico. El nitrato de plata inhibe la acción de esta hormona vegetal por medio de iones plata que reducen la capacidad del receptor para unir etileno, lo cual resulta en

altas concentraciones de etileno en los tejidos inhibiendo así los pasos tempranos de su propia ruta de biosíntesis (Kumar & col. 2009).

Zhang & col. (2006) y Turhan (2004), publicaron el efecto del nitrato de plata en el crecimiento *in vitro* de vástagos y tuberización de *Solanum tuberosum* L, reportando que la adición de este compuesto químico al medio de cultivo promueve el desarrollo de los brotes e incrementa el peso fresco de los microtubérculos.

Esta revisión bibliográfica permite tener las bases teóricas necesarias para entender el efecto de la composición del medio de cultivo y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.), entre las variedades Arbolona negra (nativa) y Granola (comercial).

3. JUSTIFICACIÓN

Tal como se ha señalado, la papa es un cultivo que ha ganado considerable importancia en las últimas décadas. Desde sus orígenes, hace milenios en algún lugar de la cordillera andina, el cultivo de la papa se ha extendido a Europa, Asia y África; de hecho, China es el mayor productor de este tubérculo. Tal vez ningún otro cultivo en la historia contemporánea ha jugado un papel más importante en la seguridad alimentaria y en la nutrición de la población, provocando además un gran impacto en el bienestar social de quienes lo cultivan y quienes lo consumen. La importancia económica de la papa se fundamenta en que su capacidad de producción de sustancias alimenticias por unidad de superficie, es tres veces mayor que en los cereales, lo que permite suplir de alimento a un elevado número de personas.

El interés principal de quienes cultivan la papa es la producción comercial de tubérculos para consumo fresco, procesamiento industrial o semilla, por lo tanto los factores que estimulan la formación de los tubérculos o que afectan en alguna medida el proceso de tuberización deben ser cuidadosamente estudiados.

Entre los factores que intervienen en la tuberización se han mencionado las características propias de la variedad, la edad fisiológica de la semilla, la temperatura del suelo, la humedad, la nutrición de la planta, la intensidad y duración de la luz, la acción de reguladores del crecimiento y la incidencia de plagas y enfermedades. Todos estos factores, actuando en forma individual o combinada, además de afectar el cultivo, influyen directamente en su rentabilidad, particularmente el último de ellos dado que los tubérculos, por el medio en que se desarrollan, están muy expuestos a la acción de microorganismos patógenos.

Ante la dificultad de controlar exitosamente la mayoría de las variables que afectan negativamente la producción de tubérculos de papa en condiciones naturales, se ha acudido a la propagación *in vitro*, una tecnología que mediante el cultivo de yemas axilares, bajo condiciones asépticas y con un medio de cultivo apropiado, permite obtener microtubérculos con relativa facilidad.

Como se ha descrito anteriormente, los microtubérculos tienen algunas ventajas sobre los tubérculos obtenidos en condiciones de campo; sin embargo sobre el proceso de microtuberización inciden también diferentes variables tanto exógenas como endógenas. Es

por ello que se justifica una investigación como la que aquí se describe, por cuando se está tratando con variables como el fotoperiodo, la consistencia del medio de cultivo, la concentración de sacarosa y la adición de citoquininas y de nitrato de plata, que en las condiciones planteadas y con las variedades seleccionadas (Granola y Arbolona negra) no habían sido previamente estudiadas.

4. OBJETIVOS

Objetivo general: Comparar el efecto de la consistencia y composición del medio de cultivo, así como del fotoperiodo, sobre la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.), entre las variedades Arbolona negra y Granola.

Objetivos específicos:

1. Micropropagar las variedades de papa Arbolona negra y Granola, a partir de microesquejes.
2. Evaluar el efecto de la concentración de sacarosa, consistencia del medio de cultivo y condiciones lumínicas, sobre la producción de microtubérculos de papa (variedades Arbolona negra y Granola).
3. Determinar el efecto de la concentración de Benciladenina (BA) y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa (variedades Arbolona negra y Granola).
4. Determinar el efecto de la concentración de Giberelinas (GAs) y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa (variedades Arbolona negra y Granola).
5. Determinar el efecto de la concentración de Nitrato de plata (AgNO_3) y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa (variedades Arbolona negra y Granola).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se explican los diferentes aspectos relacionados con la metodología que se siguió durante el proceso investigativo, tales como material vegetal y las diferentes experiencias realizadas para lograr los objetivos propuestos.

1. Micropropagación del material vegetal que se usará como fuente de explantes

Siguiendo el protocolo establecido en el CIP Perú (Espinoza & col., 1989), se cultivaron asépticamente los segmentos nodales de plantas de papa *in vitro* (variedades Arbolona negra y Granola), de dos meses de edad, colocados en tubos de vidrio con tapas de polipropileno que contenían medio semisólido Murashige y Skoog (1962) suplementado con vitaminas de Morel (1950), 25 g/l de sacarosa y solidificado con 6 g/l de agar. Todo el material (120 segmentos nodales de cada variedad) se incubó bajo luz blanca continua ($95 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 18 °C, durante dos meses, en el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Universidad Central de Venezuela. Luego de ese tiempo las vitroplantas presentaron el tamaño adecuado para extraer los segmentos nodales que se usaron en las siguientes experiencias:

2. Efecto de la concentración de sacarosa, consistencia del medio de cultivo y condiciones lumínicas, sobre la producción de microtubérculos de papa.

Explantes a utilizar

Para la micropropagación en medio semisólido se utilizaron explantes de tallo con cuatro nudos para inducir el desarrollo de las yemas axilares y garantizar la formación de mayor número de microtubérculos. Los explantes de tallo fueron tomados de vitroplantas de papa variedades Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivadas en medio semisólido, según el protocolo detallado en el experimento 1.

Para la micropropagación en medio líquido se utilizaron explantes de tallo con un nudo, tomados de plantas de papa variedades Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivadas en medio semisólido.

Medios de cultivo

El medio base que se utilizó en todos los tratamientos fue el conocido como MS, por las siglas de quienes lo formularon, Murashige y Skoog (1962). Este medio se suplementó con vitaminas de Morel (1950) (pantotenato de calcio 1mg/l, mio-inositol 100 mg/l, tiamina 1mg/l, biotina 0,01 mg/l, piridoxina 1 mg/l, ácido nicotínico 1 mg/l), sacarosa (a distintas concentraciones, ver tabla 2) y se solidificó con agar 6 g/l (sólo en el caso del cultivo en medio semisólido). A todos los medios se les ajustó el pH a 5.6 y posteriormente se esterilizaron en autoclave a 120 °C, 15 libras de presión, durante 20 minutos.

Condiciones del cultivo

Para el cultivo en medio semisólido, las plantas con 2 meses de edad, se cortaron en secciones de tallo con 4 nudos y se cultivaron en tubos estériles con 20 ml de medio MS, sellados con tapas de polipropileno. En cada tubo se colocó una sección de tallo, para hacer un total de 45 plántulas de cada variedad (ver tabla 2).

Para el cultivo en medio líquido, se obtuvieron explantes de tallo con un nudo y se colocaron en fiolas estériles con 20 ml de medio MS (5 explantes por fiola, para hacer un total de 45 segmentos nodales de cada variedad). Estas se sellaron con tapones de gasa y algodón y se colocaron en agitación orbital continua (125rpm).

Tabla 2. Diseño experimental para estudiar el efecto de la consistencia del medio y la concentración de sacarosa, sobre la formación de microtubérculos de papa.

Tratamiento	Concentración de sac. en el medio (g/l)	N° de explantes, para cada variedad. (Medio semisólido)	N° de explantes, para cada variedad. (Medio líquido)
Control	25	15	15
1	50	15	15
2	100	15	15

45 explantes en medio semisólido y 45 explantes en medio líquido (para cada variedad) fueron incubados bajo luz blanca continua ($95 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) durante dos meses, a una temperatura de 18 ± 1 °C. La misma cantidad de explantes se incubaron en oscuridad permanente bajo las mismas condiciones. Al finalizar el experimento se registró:

- Longitud de las plantas (LP).
- Cantidad de microtubérculos por planta (CMPP).
- Diámetro de los microtubérculos (D), para lo cual se utilizó un Vernier.

Siguiendo las recomendaciones de Fandiño & col. (1990), el diámetro de los microtubérculos se tomó siempre por la parte media, en especial por aquellos que no son esféricos sino cilíndricos.

3. Efecto de la concentración de Benciladenina (BA) y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa.

Explantes a utilizar

Se utilizaron explantes de tallo con un nudo, tomados de las vitroplantas de Arbolona negra y Granola con 2 meses de edad, micropropagadas en medio semisólido.

Medios de cultivo

Para la etapa de crecimiento de los vástagos se utilizó el medio de Murashige y Skoog (1962) suplementado con vitaminas de Morel (1950) y 25 g/l de sacarosa. En la etapa de inducción de microtubérculos se utilizó este mismo medio líquido, suplementado con 50 g/l de sacarosa y tres concentraciones diferentes de BA (0, 1 y 5 mg/l).

Condiciones del cultivo

En la campana de flujo laminar, se cortaron segmentos de tallo con un nudo y se colocaron en grupos de cinco en fiolas estériles con 20 ml de medio MS, para hacer un total de 120 segmentos nodales de cada variedad. Las fiolas se sellaron con tapones de gasa y algodón y se colocaron en agitación orbital continua a 125rpm. Luego de tres semanas, en la etapa de inducción de microtubérculos, las plantas se subcultivaron en un medio MS

suplementado con 50 g/l sacarosa y tres concentraciones de BA (0, 1 y 5 mg/l). Seguidamente, la mitad del material se colocó bajo condiciones de luz blanca continua ($95 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y la otra mitad bajo fotoperiodo de días cortos, equivalentes a 8 horas de luz (ver tabla 3).

Tabla 3. Diseño experimental para evaluar el efecto de la concentración de Benciladenina y el fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa.

Tratamiento	[BA] en el medio (mg/l)	N° de explantes, para cada variedad (24h Luz)	N° de explantes, para cada variedad (8h Luz)
Control	0	20	20
1	1	20	20
2	5	20	20

Durante 6 semanas, todos los explantes se incubaron a una temperatura de 18 ± 1 °C, en agitación orbital continua. Al finalizar el experimento, se registraron los siguientes datos:

- Longitud de las plantas (LP).
- Cantidad de microtubérculos por planta (CMPP)
- Diámetro de los microtubérculos (D)
- Peso fresco (PF) y peso seco (PS) de los microtubérculos, utilizando una balanza analítica. El peso seco se determinó luego de colocar los microtubérculos individualmente en estufa a 80 °C por una semana.

4. Efecto de la concentración de Giberelinas (GA₃) y del fotoperiodo sobre la formación de microtubérculos de papa.

Explantes a utilizar

Se utilizaron explantes de tallo con un nudo, tomados de las vitroplantas de Arbolona negra y Granola con 2 meses de edad, micropropagadas en medio semisólido.

Medios de cultivo

Para el pretratamiento, los explantes se cultivaron en medio MS suplementado con vitaminas de Morel (1950), 25 g/l de sacarosa y 0,25 mg/l de GA₃. Para la etapa de inducción de microtubérculos se utilizó este mismo medio, sin GA₃ y suplementado ahora con 50 g/l de sacarosa y tres concentraciones de BA (0, 1 y 5 mg/l).

Condiciones del cultivo

En la campana de flujo laminar, se cortaron segmentos de tallo con un nudo y se colocaron en grupos de cinco en fiolas estériles con 20 ml de medio MS suplementado con vitaminas de Morel, 25 g/l de sacarosa y GA₃, para hacer un total de 120 segmentos nodales de cada variedad. Las fiolas se sellaron con tapones de gasa y algodón y se colocaron en agitación orbital continua a 125rpm. Luego de este pretratamiento (tres semanas), las plantas se subcultivaron en un medio MS sin GA₃, suplementado con vitaminas de Morel, 50 g/l de sacarosa y tres concentraciones de BA (0, 1 y 5 mg/l). A continuación, la mitad del número total de explantes se colocó bajo condiciones de luz blanca continua (95 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y la otra mitad bajo fotoperiodo de días cortos (8h luz), por 6 semanas.

La distribución de los explantes y las mediciones finales fueron similares a las del experimento 3 (ver tabla 3)

5. Efecto de la concentración de Nitrato de plata (AgNO_3) y del fotoperiodo sobre la formación de microtubérculos de papa.

Explantos a utilizar

Se utilizaron explantes de tallo con un nudo, tomados de vitroplantas de Arbolona negra y Granola con 2 meses de edad, micropropagadas en medio semisólido.

Medios de cultivo

Para la etapa de multiplicación de los brotes se utilizó el medio MS suplementado con vitaminas de Morel (1950) y 25 g/l de sacarosa. Para la etapa de inducción de microtubérculos se utilizó este mismo medio suplementado con vitaminas de Morel, 50 g/l de sacarosa, 5 mg/l de BA y cinco concentraciones diferentes de AgNO_3 (ver tabla 4).

Condiciones del cultivo

En la campana de flujo laminar, se cortaron segmentos de tallo con un nudo y se colocaron en grupos de cinco en fiolas estériles, para hacer un total de 90 segmentos nodales de cada variedad. Las fiolas se sellaron con tapones de gasa y algodón y se colocaron en agitación orbital continua a 125rpm. Luego de tres semanas, en la etapa de inducción de microtubérculos, las plantas se subcultivaron en medio MS suplementado con 50 g/l de sacarosa, 5 mg/l de BA, y cinco concentraciones de AgNO_3 (0, 1, 1,5, 2,5 y 5 mg/l). Durante 6 semanas, 45 segmentos nodales de cada variedad se cultivaron en medio líquido suplementado con tres concentraciones de AgNO_3 (0, 1 y 1,5 mg/l) y se colocaron bajo fotoperiodo de días cortos equivalentes a 8 horas luz. Otros 45 segmentos nodales de cada variedad se cultivaron en medio líquido suplementado con tres concentraciones de AgNO_3 (0, 2,5 y 5 mg/l) y se colocaron bajo condiciones de luz blanca continua ($95 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (ver tabla 4). Al cabo de este tiempo, se determinó la cantidad de microtubérculos por planta (CMPP), su diámetro (D), peso fresco (PF) y peso seco (PS).

Tabla 4. Diseño experimental para evaluar el efecto de la concentración del nitrato de plata y del fotoperíodo sobre la producción de microtubérculos de papa.

Tratamiento	[AgNO ₃] en el medio (mg/l)	N° de explantes, para cada variedad (24h Luz)	N° de explantes, para cada variedad (8h Luz)
Control	0	15	15
1	1	0	15
2	1,5	0	15
3	2,5	15	0
4	5	15	0

6. Tratamiento estadístico.

El análisis estadístico de datos derivados de un experimento tiene como propósito proveer información referente a la manera en que las unidades experimentales responden a los tratamientos aplicados. Este análisis se realizó con el programa Statgraphics Centurion 12. Con la finalidad de esclarecer este análisis, se le asignó una nomenclatura específica a cada variable y se definieron las variables dependiente e independiente para poder analizar en conjunto cómo afectan estas variables la producción de microtubérculos en las dos variedades de papa estudiadas (ver tabla 5).

Tabla 5. Definición de variables dependiente e independiente de los experimentos realizados.

Variable dependiente (Producción de microtubérculos)	Variables independientes																	
	Características del medio de cultivo													Fotoperiodo (Horas de luz)				
	Medio		[Sac.] (g/l)			[BA] (mg/l)			[AgNO ₃] (mg/l)					24	Osc.	8		
	Sólido	Líquido	25	50	100	0	1	5	0,25	0	1	1,5	2,5				5	
Cantidad de microtubérculos/planta (CMPP)																		
Diámetro (D)																		
Peso fresco (PF)																		
Peso seco (PS)																		

En la tabla 5 se define la interacción entre las variables independientes (consistencia del medio de cultivo, composición del medio de cultivo y fotoperiodo) y los diferentes niveles de la variable dependiente (cantidad de microtubérculos por planta, diámetro, peso fresco y peso seco).

En cada experimento, los 6 tratamientos se separaron en dos grupos con base en el fotoperiodo (grupo morado: 8 horas de luz y grupo azul: 24 horas de luz) (ver tablas 6, 7 y 8). En cada grupo, el primer paso del análisis estadístico consistió en someter los datos a un análisis de varianza acompañado de una prueba t de student, para establecer si hay diferencias significativas entre las medias de los tratamientos. Al estudiar el comportamiento de los tratamientos de un grupo, mediante un ANOVA, el único objetivo es saber si dichos tratamientos difieren significativamente entre sí. Si se acepta la existencia de diferencias entre los efectos de los tratamientos, es necesario conocer qué tratamiento concreto producen mayor efecto o cuáles son los tratamientos diferentes entre sí. Para ello se realizó una prueba de rangos múltiples de Tukey con un grado de confianza del 95%.

Es importante destacar que al experimento 2 (Efecto de la concentración de sacarosa, consistencia del medio de cultivo y condiciones lumínicas sobre la producción de microtubérculos de papa), no se le aplicó el análisis estadístico puesto que sólo dos tratamientos tuvieron efecto sobre la cantidad y diámetro de los microtubérculos, mientras que en los otros diez no hubo producción de microtubérculos (valores iguales a cero), por lo cual la evaluación en el programa estadístico resulta no computable.

La tabla 6 muestra el diseño utilizado para evaluar el efecto de la concentración de BA y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa (cantidad, diámetro, peso fresco y peso seco), a fin de poder concluir cuál resultó ser la mejor combinación de variables para lograr una eficiente microtuberización en cada variedad.

Tabla 6. Diseño estadístico para evaluar el efecto de la concentración de BA y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa.

N°	Descripción de las experiencias				
	Tratamientos	Niveles de la variable dependiente (Producción de microtubérculos)			
		CMPP	D	PF	PS
1	8H/0BA	X	X	X	X
2	8H/1BA	X	X	X	X
3	8H/5BA	X	X	X	X
4	24H/0BA	X	X	X	X
5	24H/1BA	X	X	X	X
6	24H/5BA	X	X	X	X

X= Valores promedios obtenidos a partir de un n=20 explantes por tratamiento

La tabla 7 muestra el diseño utilizado para evaluar el efecto de la concentración de GAs y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa (cantidad, diámetro, peso fresco y peso seco), a fin de poder concluir cuál resultó ser la mejor combinación de variables para lograr una eficiente microtuberización en cada variedad.

Tabla 7. Diseño estadístico para evaluar, el efecto de la concentración de GAs y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa.

N°	Descripción de las experiencias					
	Tratamientos		Niveles de la variable dependiente (Producción de microtubérculos)			
			CMPP	D	PF	PS
1	0,25 GA ₃	8H/0BA	X	X	X	X
2	0,25 GA ₃	8H/1BA	X	X	X	X
3	0,25 GA ₃	8H/5BA	X	X	X	X
4	0,25 GA ₃	24H/0BA	X	X	X	X
5	0,25 GA ₃	24H/1BA	X	X	X	X
6	0,25 GA ₃	24H/5BA	X	X	X	X

X= Valores promedios obtenidos a partir de un n=20 explantes por tratamiento

La tabla 8 muestra el diseño utilizado para evaluar el efecto de la concentración de AgNO₃ sobre la formación de microtubérculos de papa (cantidad, diámetro, peso fresco y peso seco), a fin de poder concluir cuál resultó ser la mejor combinación de variables para lograr una eficiente microtuberización en cada variedad.

Tabla 8. Diseño estadístico para evaluar; en cada variedad, el efecto de la concentración de AgNO₃ sobre la formación de microtubérculos de papa.

N°	Descripción de las experiencias					
	Tratamientos		Niveles de la variable dependiente (Producción de microtubérculos)			
			CMPP	D	PF	PS
1	8H/0AgNO ₃		X	X	X	X
2	8H/1AgNO ₃		X	X	X	X
3	8H/1,5AgNO ₃		X	X	X	X
4	24H/0AgNO ₃		X	X	X	X
5	24H/2,5AgNO ₃		X	X	X	X
6	24H/5AgNO ₃		X	X	X	X

X= Valores promedios obtenidos a partir de un n=15 explantes por tratamiento

6. RESULTADOS Y DISCUSION

1. Micropropagación del material vegetal

Siguiendo el protocolo establecido en el CIP Perú (Espinoza & col., 1989) se micropropagaron 120 plantas de papa de cada variedad, en medio MS semisólido suplementado con 25g/L sacarosa e incubadas bajo luz blanca continua. A los dos meses de cultivo, las plantas micropropagadas mostraron vigorosidad y desarrollo de raíces, tallos y hojas, pudiendo ser ya utilizadas como fuente de explantes para los siguientes experimentos. Es importante destacar que este protocolo funcionó con la misma eficiencia para ambas variedades. Espinoza & col., (1989) reportan que en el CIP se cuenta con un programa permanente de propagación de plantas de papa a través de este protocolo.

Morfológicamente, las hojas de Arbolona negra *in vitro* son de mayor tamaño en comparación con las hojas de la variedad Granola, poseen una coloración verde amarillenta, forma acorazonada, son compuestas e imparipinadas con 1 a 5 folíolos (ver figura 5). Las hojas de Granola presentan una coloración verde oscura, son pequeñas, lanceoladas, con poca frecuencia de aparición de los folíolos secundarios (ver detalles en la figura 6).

En campo, las hojas de papa son alternas, compuestas, con 4 o más pares de folíolos ovalados, opuestos, y un folíolo terminal, muy similar a lo que se pudo observar en plantas cultivadas *in vitro* (Poehlman & Allen, 2003).

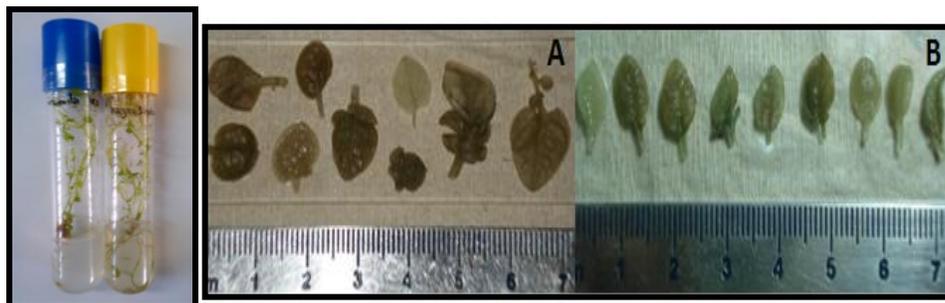


Figura 5. Hojas de plantas de papa *in vitro* con dos meses de edad, A. variedad Arbolona negra y B. variedad Granola (20X).

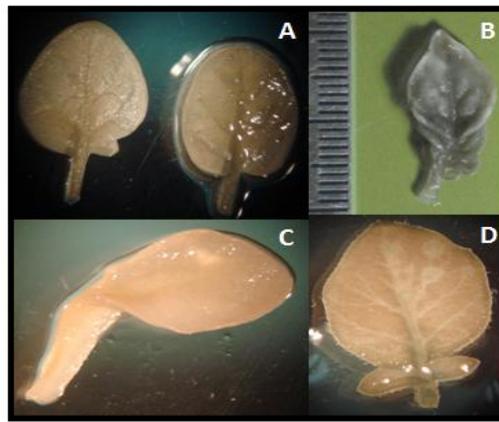


Figura 6. Detalles de hojas de Arbolona negra. A. Haz y envés, B. Hoja compuesta con 5 folíolos. C. Hoja inmadura, D. Detalle de los folíolos secundarios (20X).

2. Efecto de la concentración de sacarosa, consistencia del medio de cultivo y condiciones lumínicas, sobre la producción de microtubérculos de papa.

En muchos de los trabajos relacionados con los factores que afectan la microtuberización en papa, es común encontrar a la sacarosa como el principal inductor de tuberización, asegurando que altas concentraciones de esta azúcar favorecen la formación de microtubérculos. También es común encontrar protocolos de inducción de microtubérculos en donde las plantas se cultivan en medio líquido más que en medio semisólido, y preferiblemente bajo condiciones de oscuridad permanente. En general, los principales factores que afectan la tuberización son: el fotoperiodo, la consistencia del medio de cultivo y la composición del mismo.

2.1 Plántulas cultivadas en medio semisólido, suplementado con tres concentraciones de sacarosa e incubadas bajo condiciones de luz blanca continua.

En la tabla 9 se puede apreciar el efecto de la concentración de sacarosa sobre la longitud (LP) y la cantidad de microtubérculos por planta (CMPP), reportándose que bajo las condiciones establecidas para este experimento, a los dos meses de cultivo, ambas variedades cultivadas en medio suplementado con 50g/L de sacarosa mostraron el mayor crecimiento y vigorosidad, con diferencias estadísticamente significativas entre las variedades. Sin embargo, las plantas de Granola mostraron un crecimiento más lento, con menos brotes, en comparación con lo observado en las plantas de Arbolona negra. La concentración de 100 g/L de sacarosa, retardó el crecimiento de los explantes de tallo de ambas variedades (ver figura 7), lo que podría explicarse por el alto potencial osmótico al

que están sometidas las células, las cuales al estar colocadas en un medio hipertónico (mayor concentración de soluto en el medio externo), el agua sale hacia el medio extracelular, el citoplasma se deshidrata, se encoge y ocurre plasmólisis. De no cambiar esta situación este proceso puede convertirse en irreversible, ocasionando la muerte de la célula (Khuri & col. 1995).

Con relación a la formación de microtubérculos, en la tabla 9 se observa que las plantas de Granola, cultivadas en medio semisólido con 50 g/L de sacarosa y luz blanca continua, tuvieron una producción de 0,13 microtubérculos/planta con un diámetro de 0,7 cm, mientras que no hubo formación de microtubérculos en Arbolona negra. Los microtubérculos de Granola, algunos con brotes, se formaron en la base de la plántula, en contacto con el medio de cultivo (ver figura 8).

Tabla 9. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la longitud de las plantas (LP) de dos meses de edad, y la cantidad de microtubérculos (CMPP), en las variedades Arbolona negra y Granola, cultivadas en medio semisólido e incubadas bajo luz blanca continua.

Variedades	Variables	Concentración de sacarosa en el medio de cultivo (g/L)		
		25	50	100
Arbolona negra	LP (cm)	20,25 ^b	23,13 ^b	15,00 ^b
	CMPP	0,00	0,00	0,00
Granola	LP (cm)	12,75 ^b	16,13 ^b	8,38 ^b
	CMPP	0,00	0,13	0,00

Los valores corresponden a promedios de 15 explantes por tratamiento, para cada variedad, obtenidos de un ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Para cada columna, en los promedios con la letra a, no existen diferencias significativas entre variedades, mientras que la letra b significa que si existen diferencias significativas entre variedades.

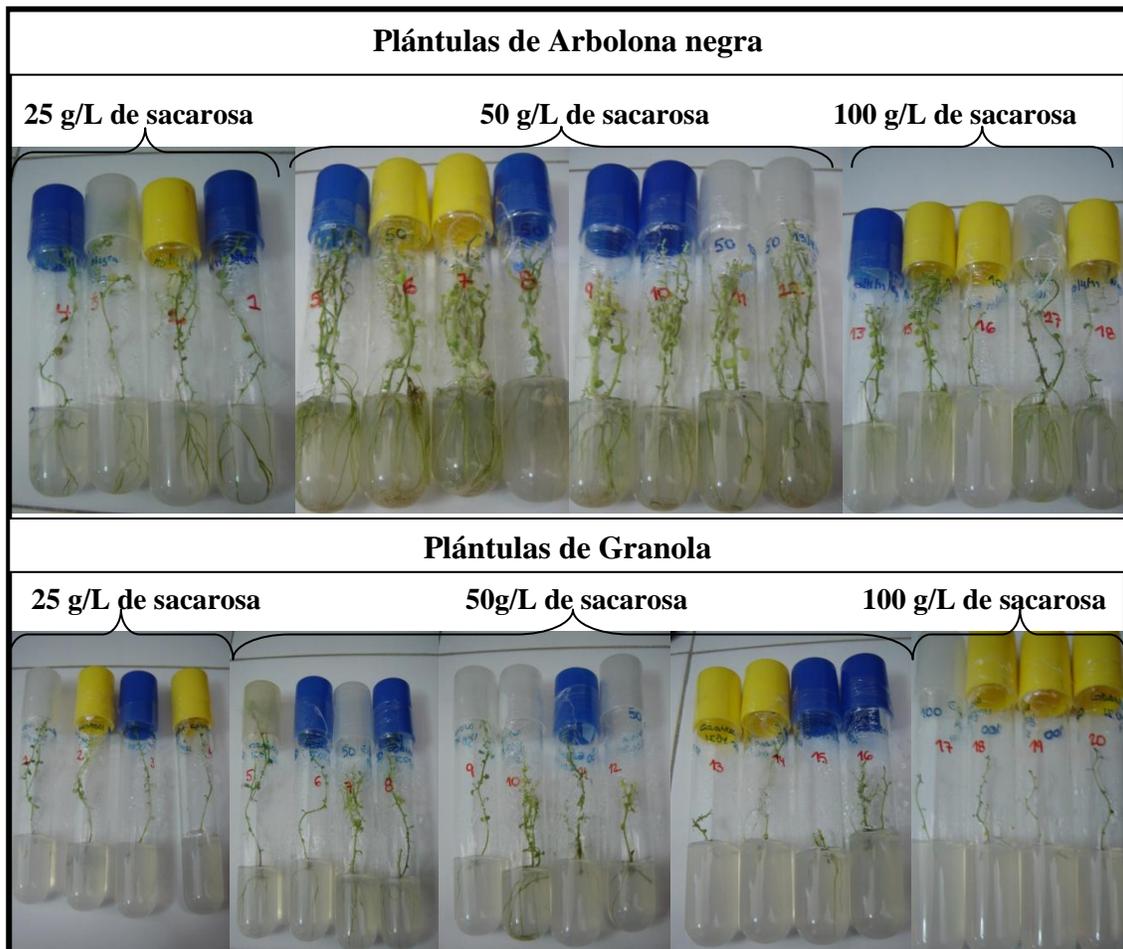


Figura 7: Plántulas de Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivadas en medio semisólido suplementado con tres concentraciones de sacarosa (25, 50 y 100 g/L) e incubadas bajo luz blanca continua.



Figura 8: Microtubérculos formados en plántulas de Granola, con dos meses de edad, cultivadas en medio semisólido con 50g/L de sacarosa y bajo luz blanca continua.

Numerosos investigadores han reportado que las concentraciones óptimas de sacarosa para inducir la microtuberización en papa oscilan entre 60 y 80 g/L. Por ejemplo, Fandiño & col. (1990) reportaron que la mayor cantidad de microtubérculos se obtuvo en plantas de la variedad Chitagá (0,1 microtubérculos por plantas), cultivadas en medio líquido suplementado con 80 g/L de sacarosa e incubadas bajo oscuridad permanente, para semejar el ambiente subterráneo en donde se forman comúnmente los tubérculos en campo. Este autor también reportó que las plántulas de las cuatro variedades cultivadas (Chitagá, Monserrate, Pastusa y Tequendama) en medios semisólidos, produjeron una menor cantidad de microtubérculos que los obtenidos en los tratamientos con medio líquido.

Gopal & col. (2004) reportaron que en las tres variedades de papa estudiadas (Kufri Badshah, Kufri Chandramukhi y Kufri Sindhuri) la mayor cantidad de microtubérculos (0,1 microtubérculos por planta) se obtuvo al cultivar las plantas en medio líquido suplementado con 80 g/L de sacarosa, bajo oscuridad permanente.

Sin embargo, pocos de ellos mencionan en sus protocolos el cultivo bajo luz blanca continua cuando se desea obtener una gran cantidad de microtubérculos. Sin embargo, en nuestro caso, las plántulas de Granola cultivadas en medio semisólido suplementado con 50g/L de sacarosa, y en condiciones de luz blanca continua, produjeron la mayor cantidad de microtubérculos por planta, y este resultado es muy similar a la cantidad reportada por estos autores.

2.2 Plántulas cultivadas en medio semisólido, suplementado con tres concentraciones de sacarosa e incubadas bajo condiciones de oscuridad permanente.

Las plántulas de Granola y Arbolona negra se cultivaron por dos meses en medio semisólido y oscuridad permanente. Estas mostraron características típicas de plantas etioladas, tallos y hojas de color blanco, pocos brotes, raíces delgadas (ver figura 9). Sin embargo, de manera similar a lo observado bajo luz blanca continua, en la tabla 10 se reporta que las plantas de Arbolona negra mostraron un mayor crecimiento en comparación con las de Granola, en las tres concentraciones de sacarosa ensayadas, siendo nuevamente la concentración de 50 g/L de sacarosa la que permitió la mayor elongación

de las plantas en ambas variedades, con diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

Tabla 10. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la longitud de las plantas (LP) de dos meses de edad, y la cantidad de microtubérculos (CMPP), en las variedades Arbolona negra y Granola cultivadas en medio semisólido e incubadas bajo oscuridad permanente.

Variedades	Variables	Concentración de sacarosa en el medio de cultivo (g/L)		
		25	50	100
Arbolona negra	LP (cm)	10,50 ^b	14,50 ^b	5,67 ^b
	CMPP	0,00	0,00	0,00
Granola	LP (cm)	7,75 ^b	10,00 ^b	5,43 ^b
	CMPP	0,00	0,00	0,00

Los valores corresponden a promedios de 15 explantes por tratamiento, para cada variedad, obtenidos de un ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Para cada columna, en los promedios con la letra a, no existen diferencias significativas entre variedades, mientras que la letra b significa que si existen diferencias significativas entre variedades.

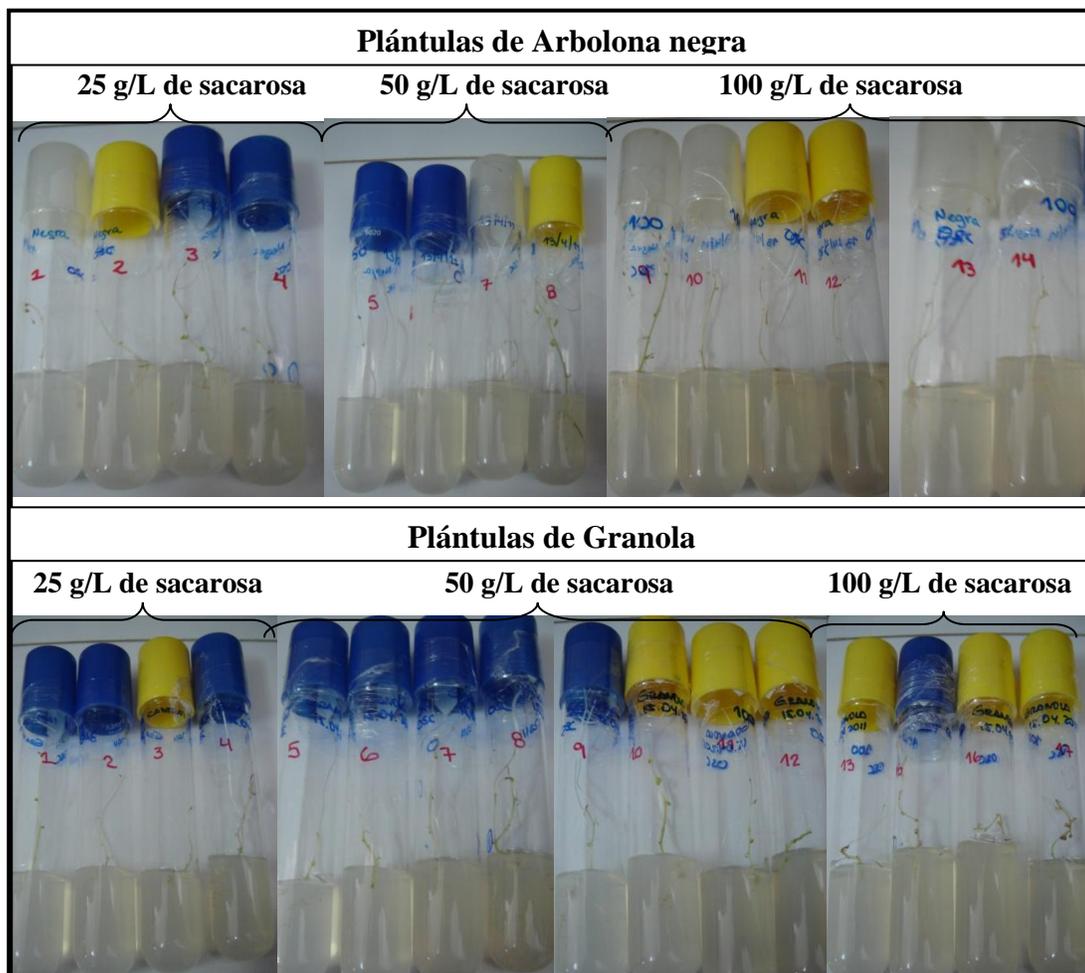


Figura 9: Plántulas de Arbolona negra y Granola, de dos meses de edad, cultivadas en medio semisólido suplementado con tres concentraciones de sacarosa (25, 50 y 100 g/L) e incubadas bajo oscuridad permanente.

En la tabla 10 también se puede observar que el cultivo bajo oscuridad permanente no favoreció la formación de microtubérculos en ninguna de las variedades. Esto puede deberse a que dichas plantas fueron cultivadas desde el inicio bajo esta condición, donde la fotosíntesis, la disponibilidad de energía y la producción de los asimilados de carbono que serían dirigidos hacia la formación de los microtubérculos, se vió notablemente disminuida. Gopal & col. (2004) obtuvieron la mayor cantidad de microtubérculos de papa, cuando suplementaron el medio con 80 g/L de sacarosa y en oscuridad permanente; sin embargo, ellos establecieron una primera fase bajo luz blanca continua para promover el crecimiento y la multiplicación de los brotes y luego una segunda fase bajo oscuridad permanente con el propósito de inducir la formación de microtubérculos en plantas desarrolladas. Estas condiciones no fueron ensayadas en nuestro trabajo.

Fandiño & col. (1990) establecieron tres tratamientos para inducir la tuberización en papa, en donde las plantas cultivadas fueron incubadas en medio semisólido o líquido e incubadas bajo condiciones de oscuridad permanente. Como se comentó anteriormente, el tratamiento más efectivo fue el de medio líquido suplementado con 80 g/L de sacarosa reportándose que bajo estas condiciones, de cuatro variedades ensayadas sólo una produjo la mayor cantidad de microtubérculos de 0,5 cm de diámetro en promedio.

El medio semisólido permite mantener por más tiempo el cultivo de las plantas, sin tener que refrescarlo, lo cual disminuye el riesgo de contaminación del explante. Sin embargo, este tipo de medio es poco utilizado cuando se desea producir microtubérculos ya que las plantas, al tener los nutrientes menos disponibles que en medio líquido, reducen la formación de microtubérculos y aquellos que se forman resultan pequeños y con pocas yemas desarrolladas (Jara, 1996).

2.3 Plántulas cultivadas en medio de líquido, suplementado con tres concentraciones de sacarosa e incubadas bajo condiciones de luz blanca continua.

Se evaluó el efecto del medio líquido, suplementado con tres concentraciones de sacarosa, sobre la producción de microtubérculos en ambas variedades, cultivadas bajo luz blanca continua (ver tabla 11). La mayor longitud de los brotes se observó en plantas de

ambas variedades cultivadas en medio líquido suplementado con 25 g/L de sacarosa, sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellas. La concentración de 100 g/L de sacarosa resulto ser inhibitoria para el crecimiento de las plantas de ambas variedades probablemente debido a la alta osmolaridad, mayor que en el medio semisólido (ver figura 10).

Aunque las dos variedades cultivadas en medio líquido suplementado con 50 g/L de sacarosa y en condiciones de luz blanca continua mostraron un crecimiento lento, este tratamiento permitió la formación del mayor número de microtubérculos de Granola en comparación con los obtenidos en medio semisólido bajo estas mismas condiciones; sin embargo, los microtubérculos de esta variedad resultaron tener menor diámetro que los obtenidos en medio semisólido (ver tabla 11). Igualmente, la mayoría de los microtubérculos se formaron en la base de la planta, en contacto con el medio de cultivo y algunos desarrollaban yemas y brotes bajo estas mismas condiciones (ver figura 11).

Tabla 11. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la longitud de las plantas (LP) de dos meses de edad, y la cantidad de microtubérculos (CMPP), en las variedades Arbolona negra y Granola, cultivadas en medio líquido e incubadas bajo luz blanca continua.

Variedades	Variables	Concentración de sacarosa en el medio de cultivo (g/L)		
		25	50	100
Arbolona negra	LP (cm)	19,00 ^a	8,47 ^a	1,53 ^a
	CMPP	0,00	0,13	0,00
	D (cm)	0,00	0,40	0,00
Granola	LP (cm)	23,80 ^a	7,48 ^a	1,67 ^a
	CMPP	0,00	1,07	0,00
	D (cm)	0,00	0,37	0,00

Los valores corresponden a promedios de 15 explantes por tratamiento, para cada variedad, obtenidos de un ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Para cada columna, en los promedios con la letra a, no existen diferencias significativas entre variedades, mientras que la letra b significa que si existen diferencias significativas entre variedades.

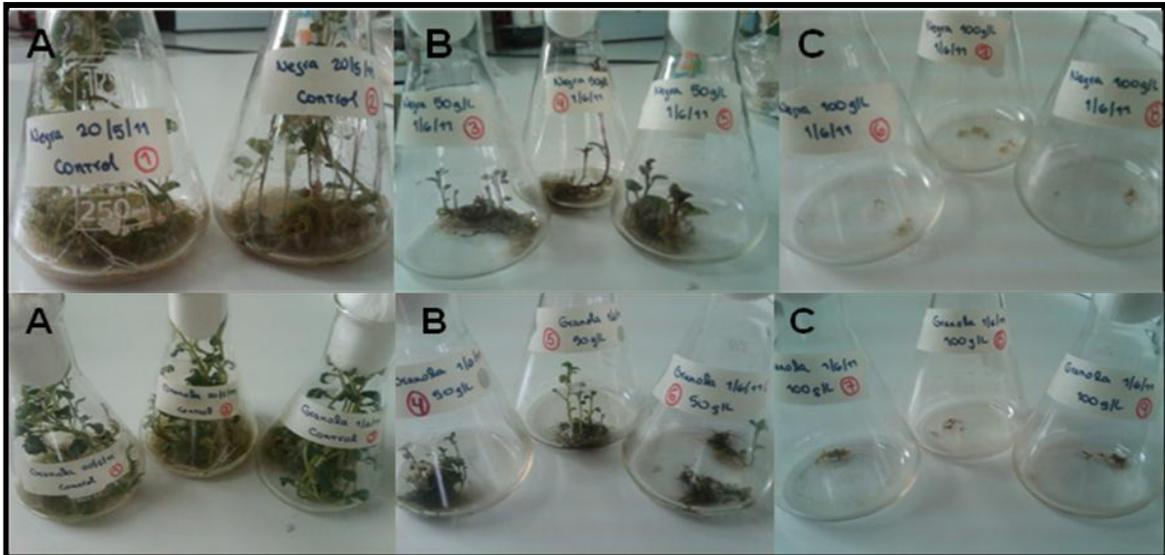


Figura 10: Plántulas de Arbolona negra (arriba) y Granola (abajo), de dos meses de edad, cultivadas en medio líquido suplementado con tres concentraciones de sacarosa (A: 25 g/L, B: 50 g/L y C: 100 g/L) e incubadas bajo luz blanca continua.



Figura 11. Microtubérculos formados en plántulas de Arbolona negra (A y B) y Granola (C y D), con dos meses de edad, cultivadas en medio líquido con 50g/L de sacarosa y bajo luz continua.

Estos resultados coinciden con Vreugdenhil & col. (1998) quienes recomendaron utilizar para la inducción de microtubérculos, un medio líquido suplementado con una concentración de sacarosa de 50 g/L; sin embargo, la mayor cantidad de microtubérculos obtenidos en esa investigación se formaron bajo oscuridad permanente.

Según Jara (1996), el cultivo en medio líquido es el más recomendado para la inducción de microtubérculos en papa, debido al buen intercambio gaseoso y a la facilidad con que difunden las sustancias tóxicas (fenoles) en el medio. Las plantas crecen más vigorosas y los microtubérculos se forman en mayor cantidad y de mayor tamaño. Los resultados de nuestro trabajo coinciden con lo reportado por este autor, debido a que las plantas de ambas variedades mostraron un mejor crecimiento en medio líquido que el observado en medio sólido.

2.4 Plántulas cultivadas en medio líquido, suplementado con tres concentraciones de sacarosa e incubadas bajo oscuridad permanente.

En la tabla 12 se puede apreciar que en condiciones de oscuridad las plantas de ambas variedades se desarrollaban con características típicas de plantas etioladas. La concentración de 100g/L de sacarosa resulta inhibitoria para el crecimiento de las plántulas de las dos variedades de papa. Igualmente, bajo estas condiciones no hubo formación de microtubérculos en ninguna de las dos variedades (ver figura 12). Nuevamente suponemos que esta condición inhibe la fotosíntesis y la traslocación de energía hacia la formación de microtubérculos.

Tabla 12. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la longitud de las plantas (LP) de dos meses de edad, y la cantidad de microtubérculos (CMPP), en las variedades Arbolona negra y Granola, cultivadas en medio líquido e incubadas bajo oscuridad permanente.

Variedades	Variables	Concentración de sacarosa en el medio de cultivo (g/L)		
		25	50	100
Arbolona negra	LP (cm)	18,56 ^a	6,97 ^a	1,28 ^a
	CMPP	0,00	0,00	0,00
Granola	LP (cm)	17,24 ^a	9,71 ^a	1,37 ^a
	CMPP	0,00	0,00	0,00

Los valores corresponden a promedios de 15 explantes por tratamiento, para cada variedad, obtenidos de un ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Para cada columna, en los promedios con la letra a, no existen diferencias significativas entre variedades, mientras que la letra b significa que si existen diferencias significativas entre variedades.

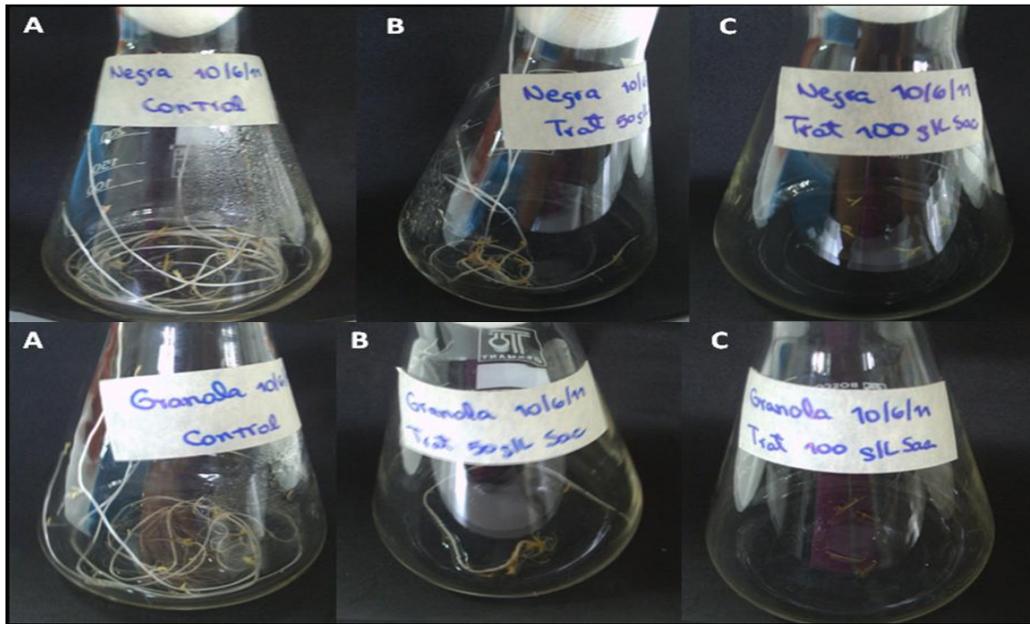


Figura 12. Plántulas de Arbolona negra (arriba) y Granola (abajo), de dos meses de edad, cultivadas en medio líquido suplementado con tres concentraciones de sacarosa (A: 25 g/L, B: 50 g/L y C: 100 g/L) e incubadas bajo oscuridad permanente.

Casi todos los investigadores antes mencionados, han reportado que sí se desea obtener microtubérculos es necesario cultivar las plantas en medio líquido e incubarlas bajo oscuridad permanente. Sin embargo, en esta investigación no hubo formación de microtubérculos en condiciones de oscuridad, para ninguna de las concentraciones de sacarosa probadas en ambas variedades. Estos resultados difieren de lo reportado por Fandiño & col. (1990) quienes obtuvieron la mayor cantidad de microtubérculos (0,1 microtubérculos por planta) con el mayor diámetro promedio (0,5 cm) en el tratamiento con 80 g/L sacarosa, medio líquido y oscuridad permanente. Sin embargo, Slimmon & col. (1989) reportaron que el peso fresco de los microtubérculos es mayor cuando las plantas se cultivan bajo condiciones fotoperiódicas de días cortos (8 horas de luz) que cuando se cultivan en oscuridad permanente.

La interacción entre todas las variables analizadas en este experimento se resume en la figura 13, en donde se aprecia claramente que sólo dos tratamientos fueron exitosos: medio semisólido suplementado con 50 g/L de sacarosa y luz blanca continua y medio líquido suplementado con 50 g/L de sacarosa y luz blanca continua.

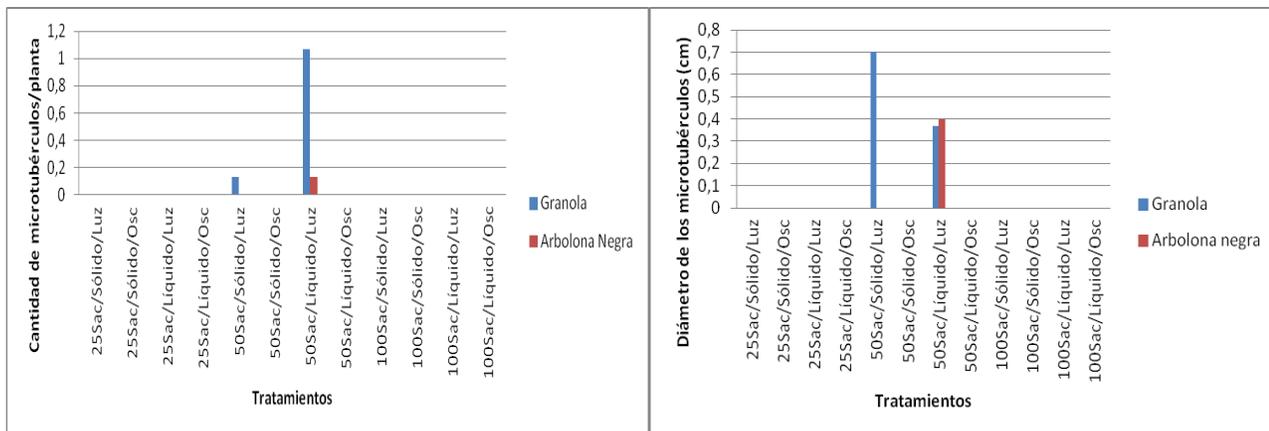


Figura 13: Análisis de la interacción condición lumínica–concentración de sacarosa–consistencia del medio de cultivo sobre la cantidad y diámetro de los microtubérculos de papa.

3. Efecto de la concentración de Benciladenina (BA) y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa.

En la producción de microtubérculos de papa, no sólo es importante suplementar el medio cultivo con fuentes de carbono tales como la sacarosa. Muchas veces es necesario añadir hormonas vegetales como las giberelinas, auxinas y citoquininas las cuales tienen un papel importante en el crecimiento de vástagos y microtuberización en papa (Aksenova & col. 2012). La citoquinina promueve la división celular y mejora la actividad de los órganos subterráneos. Además, evidencias experimentales han demostrado que tanto la combinación de hormonas como el fotoperiodo, tienen un papel crucial en el crecimiento, morfogénesis y tuberización de los tejidos de papa *in vitro* (Seabrook, 2005). Es por ello que en este trabajo se evaluó el efecto de tres concentraciones de benciladenina y dos condiciones fotoperiódicas sobre la formación de microtubérculos de las dos variedades de papa.

3.1 Efecto del fotoperiodo y de la concentración de BA sobre el desarrollo de los vástagos

Según los resultados obtenidos, las plantas cultivadas en medio líquido suplementado con 5 mg/L de BA e incubadas bajo fotoperiodo de días cortos mostraron la mayor longitud promedio: 16,07 cm para Granola y 15,57 cm para Arbolona negra (ver tabla 13), sin existir diferencias estadísticamente significativas entre ambas variedades. Este resultado es de

gran valor ya que mientras más yemas axilares se desarrollen, más microtubérculos pueden formarse (ver figuras 14 y 15).

Tabla 13. Efecto de diferentes concentraciones de BA y del fotoperiodo sobre la longitud de las plantas de Arbolona negra y Granola.

Variedades	Variable	Tratamientos					
		8 horas luz			24 horas luz		
		0BA	1BA	5BA	0BA	1BA	5BA
Arbolona negra	Longitud (cm)	12,96 ^a	14,55 ^a	15,57^a	12,78 ^a	12,86 ^a	11,87 ^a
Granola	Longitud (cm)	13,03 ^a	14,18 ^a	16,07^a	11,78 ^a	13,62 ^a	12,28 ^a

Los valores corresponden a promedios de 20 explantes por tratamiento, para cada variedad, obtenidos de un ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Para cada columna, en los promedios con la letra a, no existen diferencias significativas entre variedades.



Figura 14. Plantas de Arbolona negra (arriba) y Granola (abajo), de dos meses de edad, cultivadas bajo días cortos y tres concentraciones de BA: A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 5 mg/L.



Figura 15. Plantas de Arbolona negra (arriba) y Granola (abajo), de dos meses de edad, cultivadas bajo luz blanca continua y tres concentraciones de BA: A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 5 mg/L.

3.2 Fase de inducción de microtubérculos

En la tabla 14 se puede observar que bajo condiciones fotoperiódicas de día corto y bajo luz blanca continua, la variedad Granola, cultivada en medio líquido, produjo mayor cantidad de microtubérculos, de mayor diámetro, peso fresco y peso seco que la variedad Arbolona negra, en todas las concentraciones de BA ensayadas; observándose en la mayoría de los tratamientos diferencias estadísticamente significativas entre ambas variedades.

Tabla 14. Efecto de la concentración de BA y del fotoperiodo (FP) sobre la cantidad de microtubérculos/plantas (CMPP), diámetro (D), peso fresco (PF) y peso seco (PS) de los microtubérculos formados en plantas de dos meses de edad, variedades Arbolona negra y Granola.

Variedades	Variables	Tratamientos					
		8 horas de luz			24 horas de luz		
		0BA	1BA	5BA	0BA	1BA	5BA
Arbolona negra	CMPP	1,00 ^a	1,10 ^a	1,90^b	0,00 ^b	0,05 ^b	0,25 ^a
	D (cm)	0,28 ^b	0,38^b	0,34 ^b	0,00 ^b	0,30 ^a	0,22 ^a
	PF (g)	0,06 ^b	0,09 ^a	0,06 ^b	0,00 ^b	0,22^a	0,03 ^a
	PS (g)	0,02 ^b	0,01 ^b	0,03^b	0,00 ^b	0,01 ^a	0,02 ^b
Granola	CMPP	1,85 ^a	2,10 ^a	3,80^b	0,25 ^b	0,70 ^b	0,25 ^a
	D (cm)	0,47 ^b	0,47 ^b	0,50 ^b	0,22 ^b	0,56^a	0,40 ^a
	PF (g)	0,18 ^b	0,16 ^a	0,17 ^b	0,04 ^b	0,23^a	0,11 ^a
	PS (g)	0,03 ^b	0,04 ^b	0,06^b	0,01 ^b	0,02 ^a	0,04 ^b

Los valores corresponden a promedios de 20 explantes por tratamiento, para cada variedad; obtenidos de un ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Para cada columna, en los promedios con la letra a: no existen diferencias significativas entre variedades, mientras que la letra b significa que si existen diferencias significativas entre variedades.

En la figura 16, se separan los tratamientos en dos grupos: el primero corresponde a los resultados obtenidos bajo fotoperiodo de días cortos y el segundo corresponde a los resultados obtenidos bajo condiciones de luz blanca continua. Las pruebas estadísticas aplicadas en el primer grupo confirmaron que el tratamiento más efectivo para lograr una mayor cantidad de microtubérculos en las dos variedades de papa ensayadas, resultó ser el de 8 horas luz y 5 mg/L de BA. Con este tratamiento también se obtuvo el mayor peso seco de los microtubérculos en ambas variedades.

El análisis estadístico para el segundo grupo de tratamientos permitió inferir que la condición de luz blanca continua no favoreció la producción de microtubérculos en ninguna de las dos variedades, puesto que el número de microtubérculos se vio notablemente reducido y no hubo diferencias significativas entre el efecto de cada uno de los tratamientos (ver figura 16). Sin embargo, los pocos microtubérculos obtenidos se formaron en plantas cultivadas en medios suplementados con BA, corroborando que dicha hormona juega un papel crucial en la formación de microtubérculos tanto en fotoperiodo de días cortos como en condiciones de luz continua. El mejor tratamiento para obtener el mayor diámetro y peso fresco de los microtubérculos de Granola y el mayor peso fresco de los microtubérculos de Arbolona negra resultó ser con 1 mg/L de BA e incubadas bajo luz blanca; sin embargo, este resultado no fue estadísticamente significativo.

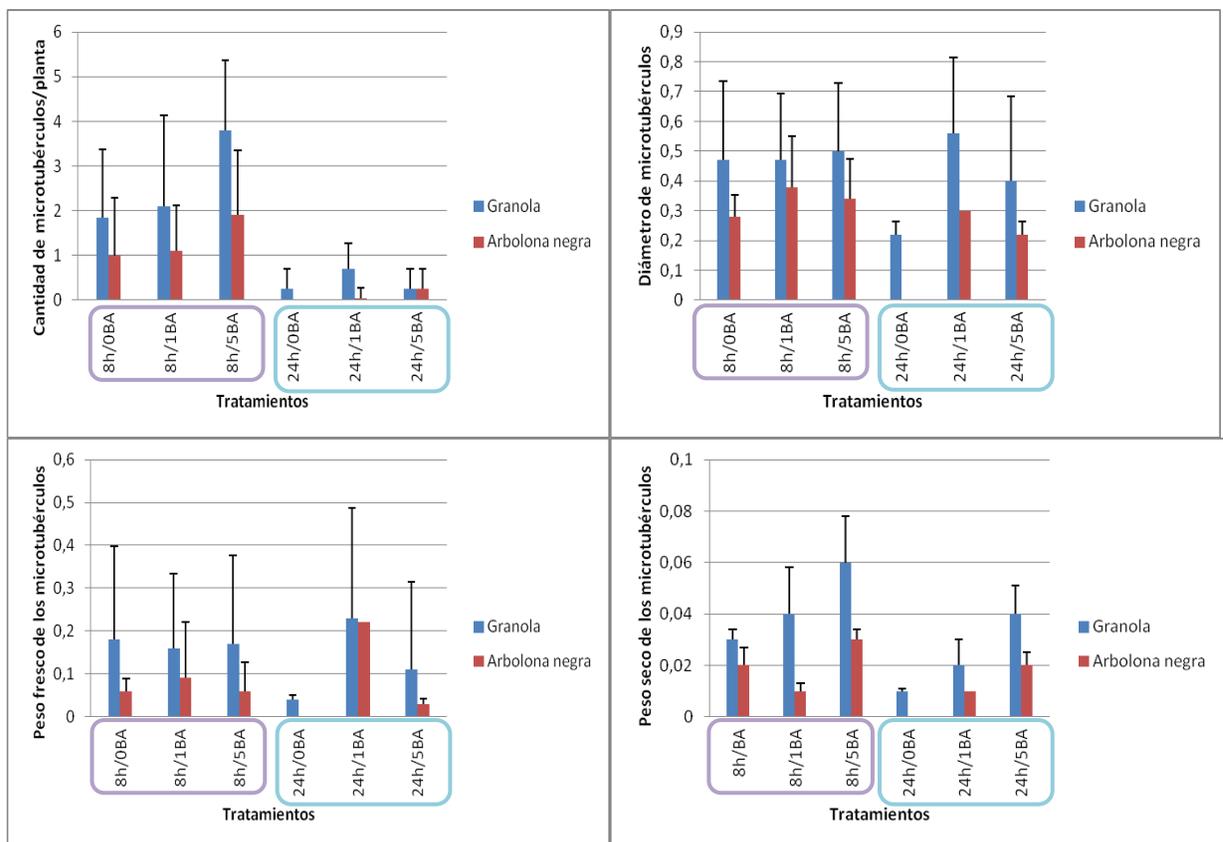


Figura 16. Análisis de la interacción condición lumínica – BA sobre la cantidad, diámetro, peso fresco y peso seco de los microtubérculos de papa.

En las figuras 17 y 18 se puede apreciar que la apariencia de los microtubérculos de ambas variedades obtenidos bajo fotoperiodo de días cortos es muy diferente a los obtenidos bajo luz blanca continua, estos últimos no poseen ojos, su color es blancuzco y son más pequeños.

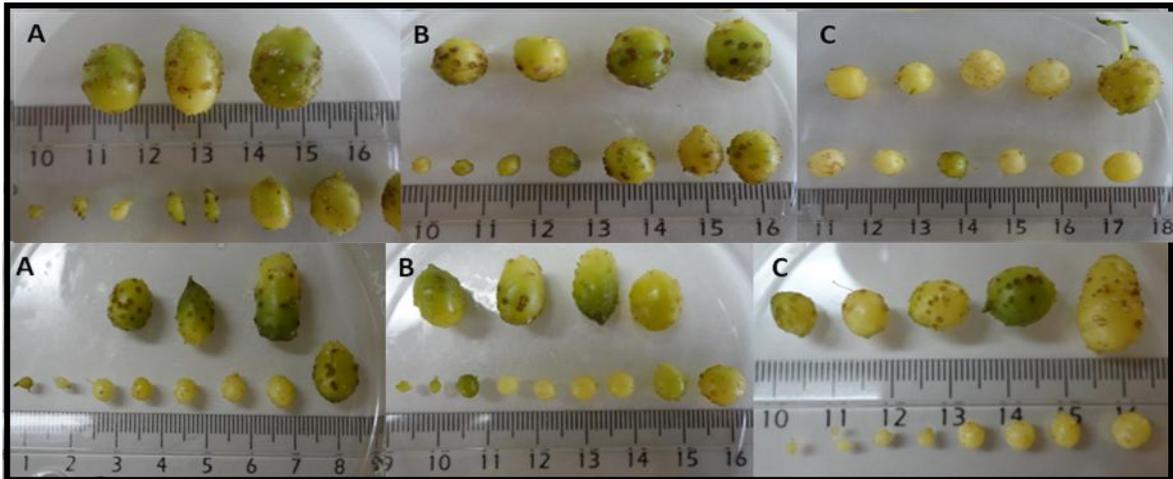


Figura 17. Microtubérculos de Arbolona negra (arriba) y Granola (abajo), de dos meses de edad, cultivadas bajo condiciones fotoperiódicas de días cortos y tres concentraciones de BA: A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 5 mg/L.

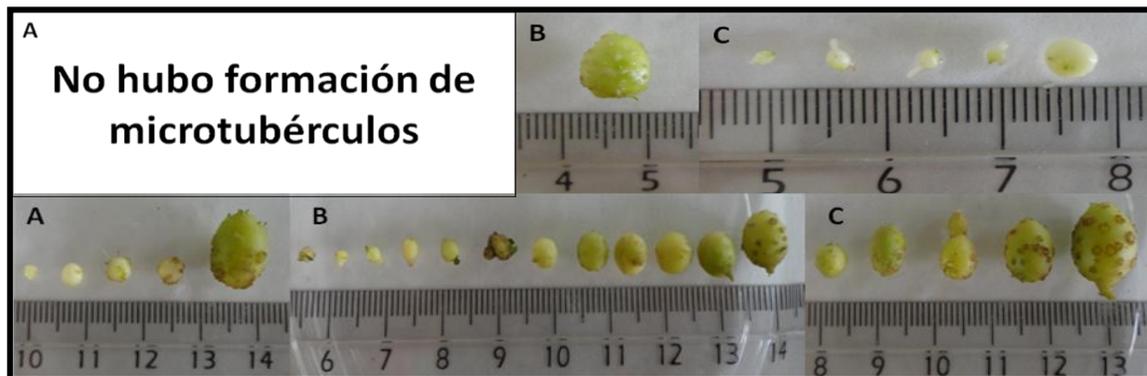


Figura 18. Microtubérculos de Arbolona negra (arriba) y Granola (abajo), de dos meses de edad, cultivadas bajo condiciones de luz blanca continua y tres concentraciones de BA: A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 5 mg/L.

Zhang & col. (2005) reportaron que los microtubérculos de papa se formaron con 5mg/L de BA en combinación con auxinas e inclusive con giberelinas, pero nunca sin la adición de BA, indicando la importancia de esta citoquinina en la tuberización *in vitro* de

papa. La aplicación de un conjunto de hormonas vegetales incrementó el diámetro de los microtubérculos, con un promedio de 1,4 cm. Este resultado no concuerda con lo obtenido en esta investigación, donde los microtubérculos tuvieron un diámetro máximo de 0,56 cm.

Donnelly & col. (2003) mencionan, en una revisión sobre la producción de microtubérculos de papa, que la microtuberización es más rápida en oscuridad, pero el porcentaje de nudos tuberizando y el peso fresco de los microtubérculos de algunos cultivares incrementa en luz comparado con oscuridad continua. Esto coincide con lo obtenido en nuestro trabajo debido a las condiciones fotoperiódicas favorecieron la formación de microtubérculos y el incremento de su tamaño y peso, a diferencia de lo obtenido bajo oscuridad permanente.

El mismo autor comenta que curiosamente la presencia de baja intensidad lumínica y un fotoperiodo corto (8-10 horas) incrementa el número de ojos en los microtubérculos de algunos cultivares en comparación con el crecimiento en la oscuridad. Esto coincide nuevamente con nuestros resultados, debido a que en la superficie de algunos microtubérculos cultivados bajo fotoperiodos cortos, había ojos o yemas, algunas ya desarrolladas. Esto es muy importante ya que garantiza que el uso de hormonas vegetales no afecta la regeneración de plantas a partir de microtubérculos, debido a que estos poseen características muy similares a las de un tubérculo convencional.

Finalmente, en nuestros resultados se observa que la variedad Granola (subespecie *tuberosum*) responde a la condición fotoperiódica de días cortos con un incremento significativo en el número de microtubérculos; mientras que el incremento obtenido en la variedad Arbolona negra (subespecie *andigena*), no es tan notable. Sin embargo, según lo reportado por Rodríguez-Falcón & col. (2006) las variedades andígenas de papa son las que responden con un incremento en la tuberización en condiciones de días cortos. Para explicar esta aparente discrepancia entre nuestros resultados y lo reportado por Rodríguez-Falcón & col. (2006), debemos recordar que son múltiples los factores que afectan la tuberización, entre ellos el genotipo de la planta, y que la variedad Arbolona negra es de lenta maduración, por lo cual, el estímulo fotoperiódico debería ser efectivo cuando ya la planta haya alcanzado la madurez para percibir y traducir de manera adecuada las señales inductoras del proceso de tuberización. No obstante, la variedad Arbolona negra, en

condiciones fotoperiódicas de días cortos produjo un promedio de 1,90 microtubérculos por planta, a los 2 meses de cultivo, por lo que la duración del día debe ser uno de los principales factores que regulan la tuberización en esta variedad y que podría ser utilizado como una estrategia para reducir el tiempo en el cual esta variedad comienza a formar tubérculos.

4. Efecto de la concentración de Giberelinas y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa.

Hasta hace unos pocos años, se consideraba que las GAs inhibían la tuberización; sin embargo, Rodríguez-Falcón & col., (2006) comentan que esta inhibición sólo ocurre si las giberelinas se concentran en la punta de los estolones, promoviendo su alargamiento y evitando que se ensanchen para formar el tubérculo. Por el contrario, si las giberelinas se concentran en las ramas superiores, la tuberización ocurre normalmente junto con el alargamiento de los brotes axilares en el vástago.

Tal como se comentó anteriormente, el éxito en producir la mayor cantidad de microtubérculos depende del número de brotes o yemas axilares que tenga la planta, debido a que generalmente, es en este lugar donde se forman dichos órganos de almacenamiento. Por tal razón, en este experimento se agregó 0,25 mg/L de GA al medio de cultivo líquido en la fase de multiplicación de los brotes. En la etapa de inducción de microtubérculos se utilizó un medio de cultivo líquido sin la adición de GA.

4.1 Efecto del pre-tratamiento con GAs sobre el desarrollo de los vástagos

La tabla 15 muestra la longitud de las plantas de ambas variedades cultivadas en medio líquido, suplementado inicialmente con GA por 3 semanas y luego subcultivadas en medios suplementados con diferentes concentraciones de BA, e incubadas en condiciones de luz blanca continua y fotoperiodo. Como puede observarse en esta tabla, las plantas de Granola y de Arbolona negra mostraron la mayor longitud promedio (14,94cm y 18,10cm respectivamente) cuando fueron pretratadas con GA, subcultivadas en medios sin BA e incubadas bajo condiciones de días cortos, existiendo diferencias estadísticamente

significativas entre ambas variedades. En las figuras 19 y 20 se aprecia claramente que la aplicación de GA favoreció el alargamiento de los brotes en ambas variedades, tanto en luz blanca continua como en fotoperiodo de días cortos, en comparación a lo observado en las plantas cultivadas en el experimento anterior, sin el pretratamiento con GA.

Tabla 15. Efecto del pre-tratamiento con GA sobre la longitud de las plantas de dos meses de edad, variedades Arbolona negra y Granola.

Variedades	Variable	Tratamientos					
		8 horas luz			24 horas luz		
		0BA	1BA	5BA	0BA	1BA	5BA
Arbolona negra	Longitud (cm)	18,10^b	16,11 ^b	17,76 ^b	8,27 ^b	9,07 ^b	7,03 ^b
Granola	Longitud (cm)	14,94^b	13,13 ^b	10,45 ^b	13,00 ^b	14,30 ^b	9,18 ^b

Los valores corresponden a promedios de 20 explantes por tratamiento, para cada variedad, obtenidos de un ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Para cada columna, en los promedios con la letra b, si existen diferencias significativas entre variedades.

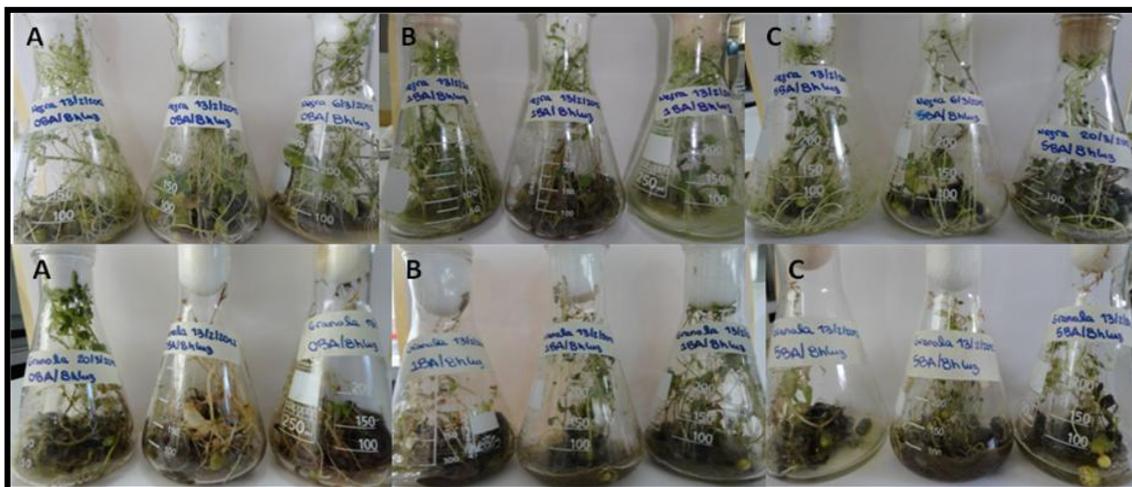


Figura 19. Plantas de Arbolona negra (arriba) y Granola (abajo) de dos meses de edad, cultivadas bajo fotoperiodo de días cortos, pre-tratadas con 0,25 mg/L de GA y subcultivadas en tres concentraciones de BA: A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 5 mg/L.

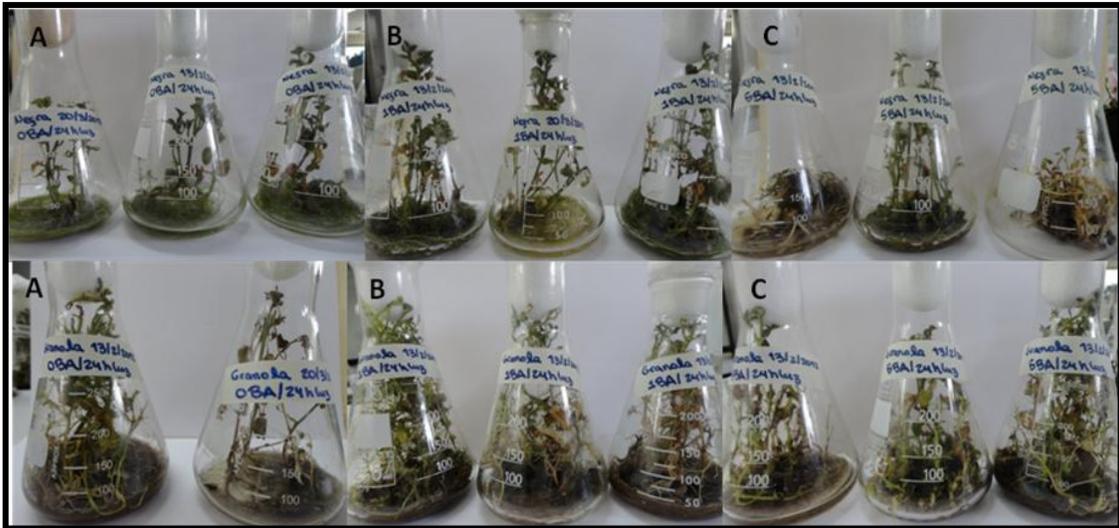


Figura 20. Plantas de Arbolona negra (arriba) y Granola (abajo) de dos meses de edad, cultivadas bajo luz blanca continua, pre-tratadas con 0,25 mg/L de GA y subcultivadas en tres concentraciones de BA: A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 5 mg/L.

Las GAs son reconocidas como las hormonas vegetales que inducen el alargamiento de vástagos en muchas especies (Taiz & Zeiger, 2006). En nuestros resultados se comprueba este efecto inductor de las GAs en el cultivo *in vitro* de plantas de papa para las dos variedades estudiadas.

Estos resultados coinciden con Zhang & col. (2005) quienes reportaron que la longitud de los vástagos de papa aumentó junto con el incremento de las concentraciones de AIA (0,5 a 10 mg/L) y la adición de 0,5 mg/L de GA₃.

4.2 Fase de inducción de microtubérculos

Luego de subcultivar las plantas en los medios sin GA, se comenzaron a formar los primeros microtubérculos.

En la tabla 16 se observa la interacción entre el pre-tratamiento con GA y el subcultivo en diferentes concentraciones de BA a diferentes regímenes lumínicos. La variedad Arbolona negra produjo el mayor número de microtubérculos en medio sin BA y fotoperiodo de días cortos; mientras que los mayores promedios de diámetro, peso fresco y peso seco de microtubérculos se obtuvieron en medios con 1 mg/L de BA. Bajo condiciones de luz continua, no se obtuvieron microtubérculos para esta variedad.

Al igual que para Arbolona negra, la variedad Granola produjo el mayor número de microtubérculos en medios sin BA y fotoperiodo de días cortos, sin embargo tanto el diámetro como el peso fresco de los microtubérculos resultó significativamente mayor en plantas cultivadas en medios sin BA pero incubadas bajo luz blanca continua. Al comparar el comportamiento de las dos variedades, debemos destacar que el número de microtubérculos, su diámetro, peso fresco y peso seco, fue siempre mayor en la variedad Granola, en condiciones de fotoperiodo de día corto.

Zhang & col. (2004) no observaron formación de microtubérculos en ausencia de BA; sin embargo, nuestros resultados muestran que esta condición es óptima para la producción de microtubérculos.

Tabla 16. Efecto de la concentración de giberelinas (GA) y del fotoperiodo (FP) sobre la cantidad de microtubérculos/plantas (CMPP), diámetro (D), peso fresco (PF) y peso seco (PS) de los microtubérculos formados en plantas dos meses de edad, variedades Arbolona negra y Granola.

Variedades	Variables	Tratamientos					
		8H/ 0BA	8H/ 1BA	8H/ 5BA	24H/ 0BA	24H/ 1BA	24H/ 5BA
Arbolona negra (*)	CMPP	1,80 ^a	1,40 ^a	0,35 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b
	D (cm)	0,48 ^b	0,57 ^a	0,56 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b
	PF (g)	0,18 ^a	0,27 ^a	0,16 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b
	PS (g)	0,03 ^a	0,05 ^a	0,03 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b
Granola (*)	CMPP	2,30 ^a	1,65 ^a	1,85 ^b	0,05 ^b	0,15 ^b	0,30 ^b
	D (cm)	0,60 ^b	0,68 ^a	0,70 ^b	0,80 ^b	0,50 ^b	0,72 ^b
	PF (g)	0,23 ^a	0,39 ^a	0,42 ^a	0,47 ^b	0,20 ^b	0,29 ^b
	PS (g)	0,03 ^a	0,06 ^a	0,06 ^b	0,06 ^b	0,06 ^b	0,04 ^b

(*) Estas plantas fueron pre--tratadas por 3 semanas con 0,25 mg/L de GA

Los valores corresponden a promedios de 20 explantes por tratamiento, para cada variedad; obtenidos de un ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Para cada columna, en los promedios con la letra a: no existen diferencias significativas entre variedades, mientras que la letra b significa que si existen diferencias significativas entre variedades.

En la figura 21, se muestra el análisis estadístico aplicado al primer grupo de tratamientos (microtubérculos obtenidos bajo fotoperiodo de días cortos), donde se infiere que no hubo diferencias significativas entre el efecto de los tres tratamientos sobre la producción de microtubérculos de papa en ambas variedades.

No se realizó el análisis estadístico del segundo grupo de tratamientos (plantas cultivadas bajo luz blanca continua) debido a que se obtuvieron datos para Granola pero no para Arbolona negra (ver tabla 16 y figura 21).

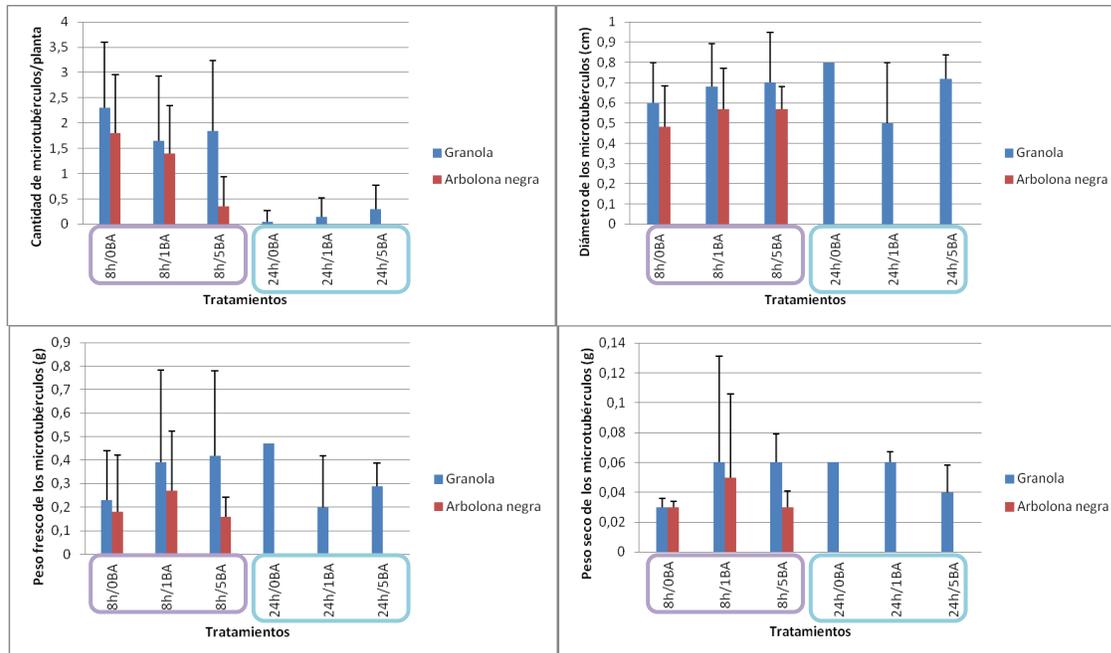


Figura 21. Análisis de la interacción condición lumínica – BA sobre la cantidad, diámetro, peso fresco y peso seco de los microtubérculos de las plantas de papa pre-tratadas con GA.

Los microtubérculos obtenidos bajo fotoperiodo de días cortos mostraron características típicas de un tubérculo, como por ejemplo la presencia de ojos (ver figura 22)



Figura 22. Microtubérculos de Arbolona negra (arriba) y Granola (abajo), de dos meses de edad, cultivados bajo fotoperiodo de días cortos, pre-tratados con 0,25 mg/L de GA₃ y subcultivados en medios suplementados con tres concentraciones de BA: A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 5 mg/L.

El cultivo bajo luz blanca continua no promovió la tuberización; de hecho no hubo formación de microtubérculos de Arbolona negra bajo ninguna de las tres concentraciones de BA ensayadas y los pocos microtubérculos de Granola mostraron un aspecto agrietado y sin ojos (ver figura 23).



Figura 23. Microtubérculos de Arbolona negra (arriba) y Granola (abajo), de dos meses de edad, cultivados bajo condiciones de luz blanca continua pretratados con 0,25 mg/L de GA_3 y subcultivados en medios suplementados con tres concentraciones de BA: A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 5 mg/L.

Cabe destacar que aunque hubo una mayor proliferación de brotes, la producción de microtubérculos no superó a la obtenida en el experimento 3, donde no se realizó el pretratamiento con GA. Este resultado es muy importante porque reduce el costo del experimento al obtener la misma producción de microtubérculos sin necesidad de usar GA. Sin embargo, es importante destacar que los microtubérculos obtenidos en este experimento superan en diámetro a los obtenidos anteriormente. Esto coincide con Zhang & col. (2004) quienes reportaron que la aplicación de 0,5 mg/L de GA incrementó el diámetro y peso fresco de los microtubérculos.

En el trabajo realizado por Coria & col. (2004), la formación de microtubérculos ocurrió en ausencia de GA_3 aunque ellos destacan que la ausencia de dicha hormona no es total, ya que existen bajos niveles o niveles críticos endógenos que siempre están presentes y no pueden ser detectados. Es por ello que es importante suplementar el medio de cultivo con

altas concentraciones de sacarosa puesto que este carbohidrato actúa como regulador de dichos niveles endógenos de GA durante la formación del microtubérculo.

5. Efecto de la concentración de Nitrato de plata (AgNO_3) y del fotoperíodo sobre la producción de microtubérculos de papa.

El óptimo desarrollo de las plantas *in vitro* no sólo depende de la consistencia y composición del medio de cultivo sino también de la atmósfera gaseosa, el intercambio de oxígeno y la acumulación de gases que puedan resultar tóxicos para la planta, entre ellos el etileno. Turhan (2004), menciona que la acumulación de etileno puede afectar el crecimiento normal de las plantas de papa cultivadas en envases cerrados e incluso inhibir la formación de microtubérculos. Para solventar este problema, numerosos investigadores (Turhan 2004, Zhang & col. 2006 y Kumar & col. 2009) han reportado que el nitrato de plata inhibe la acción del etileno y favorece el crecimiento de las plantas principalmente el área foliar. Además dicho compuesto químico promueve la formación de microtubérculos y reduce la hiperhidricidad, uno de los problemas más frecuentes observados en plantas cultivadas en medio líquido.

Por lo mencionado anteriormente, en este experimento se evaluó el efecto de cinco concentraciones de AgNO_3 (0, 1, 1,5, 2,5 y 5 mg/L) sobre la producción de microtubérculos de papa.

5.1 Efecto del AgNO_3 y del fotoperíodo sobre el desarrollo de los vástagos

En la tabla 17 se observa, en términos generales, que la adición de nitrato de plata al medio de cultivo provocó un crecimiento anormal de las plantas de ambas variedades. La longitud de los vástagos cultivados en medio con este compuesto químico se redujo considerablemente en comparación con la longitud de las plantas cultivadas en el tratamiento control sin AgNO_3 . Por ejemplo, en el tratamiento sin AgNO_3 la longitud promedio de los vástagos era de 12,34 cm para Granola y 12,23 cm para Arbolona negra; mientras que en medios suplementados con 1,5 mg/L de AgNO_3 los vástagos de Granola medían 7,38 cm y los de Arbolona negra, 5,67 cm; éstas plantas se cultivaron bajo condiciones de días cortos, sin existir diferencias estadísticamente significativas entre ambas variedades, para ninguno de los tratamientos (ver figura 24). Estos resultados coinciden con Turhan (2004), quien reporta que la mayor longitud de los vástagos de las

cuatro variedades ensayadas en su trabajo (Desiree, Nicola, Maris Bard y Russet Burbank) resulto mayor en medio sin AgNO_3 .

Bajo condiciones de luz continua los vástagos de Arbolona negra y Granola, presentaron la mayor longitud promedio en medios sin AgNO_3 (14 y 15,5 cm, respectivamente), sin existir diferencias estadísticamente significativas entre variedades. El efecto inhibitorio del AgNO_3 fue menos drástico bajo estas condiciones lumínicas. Por ejemplo para 5 mg/L de AgNO_3 , los vástagos de Arbolona negra medían 8,2 cm en promedio y los de Granola 5,3 cm (ver figura 25).

Tabla 17. Efecto del AgNO_3 sobre la longitud de las plantas de dos meses de edad, variedades Arbolona negra y Granola

Variedades	Variable	Tratamientos					
		8 horas luz			24 horas luz		
		0 AgNO_3	1 AgNO_3	1,5 AgNO_3	0 AgNO_3	2,5 AgNO_3	5 AgNO_3
Arbolona negra	Longitud (cm)	12,23^a	5,57 ^a	5,67 ^a	14,00^a	9,60 ^a	8,20 ^a
Granola	Longitud (cm)	12,34^a	7,78 ^a	7,38 ^a	15,50^a	7,32 ^a	5,20 ^a

Los valores corresponden a promedios de 15 explantes por tratamiento, para cada variedad, obtenidos de un ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Para cada columna, en los promedios con la letra a, no existen diferencias significativas entre variedades.

La mayor concentración de AgNO_3 utilizada (5mg/L) provocó la aparición de hiperhidricidad y zonas necróticas de color marrón oscuro en hojas de plantas cultivadas bajo luz blanca continua (ver figura 27). Este fenómeno se presenta como un desarrollo pobre y anormal de la planta, caracterizado por plantas frágiles de apariencia vidriosa, con hojas suculentas y un escaso sistema radical.

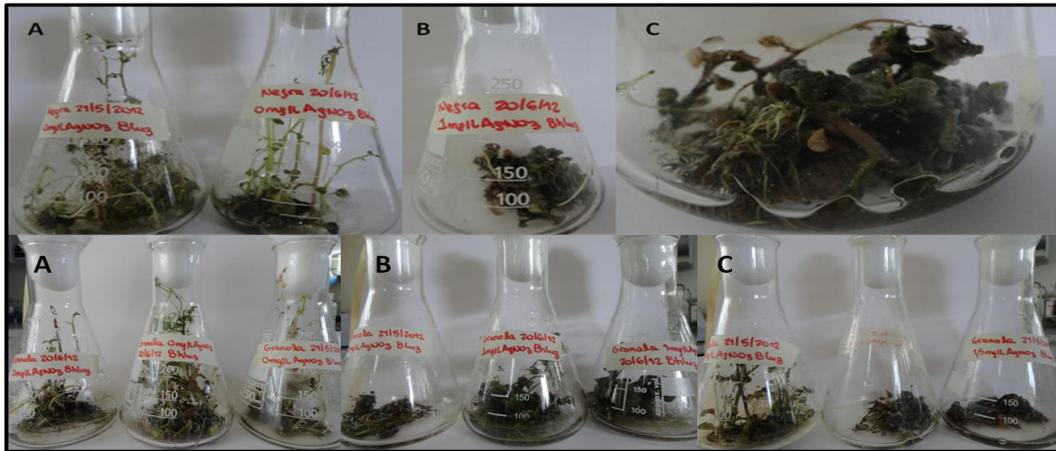


Figura 24. Plantas de Arbolona negra (arriba) y Granola (abajo), de dos meses de edad, cultivadas bajo fotoperiodo de días cortos y tres concentraciones de AgNO_3 : A. 0 mg/L, B. 1 mg/L y C. 1,5 mg/L.

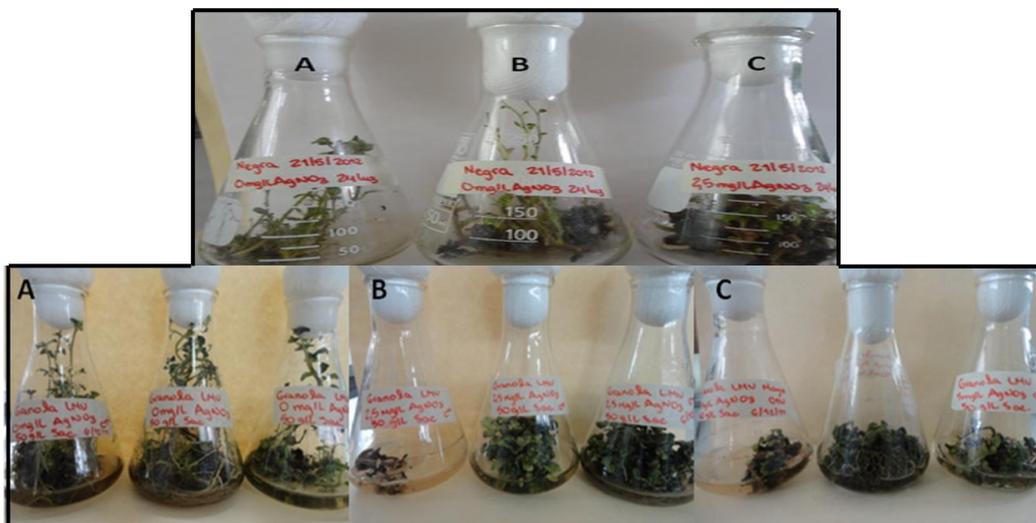


Figura 25. Plantas de Arbolona negra (arriba) y Granola (abajo), de dos meses de edad, cultivadas bajo condiciones de luz blanca continua y tres concentraciones de AgNO_3 : A. 0 mg/L, B. 2,5 mg/L y C. 5 mg/L.

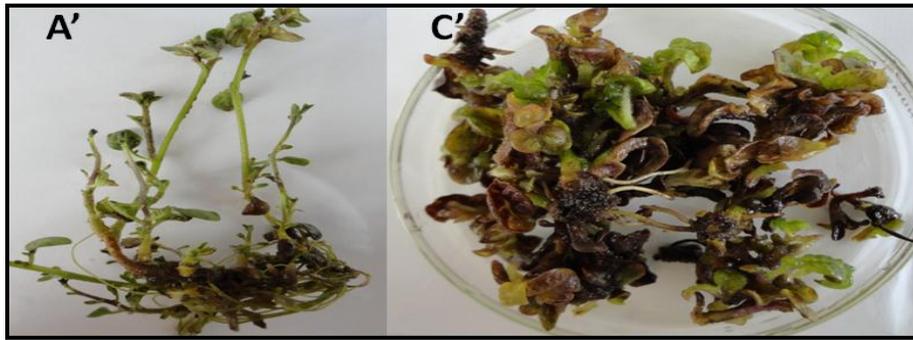


Figura 26. Detalle de plantas de Granola cultivadas en medio líquido sin AgNO_3 (A') y en medio líquido suplementado con 5 mg/L de AgNO_3 (C')

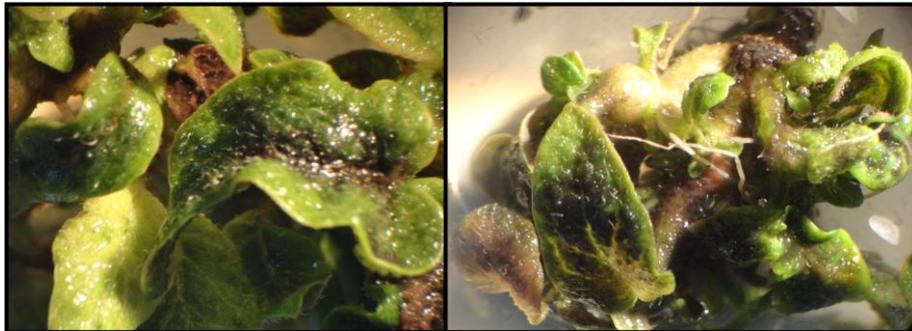


Figura 27. Detalle de hojas con hiperhidricidad, tomadas de plantas de Granola cultivadas con 5 mg/L de AgNO_3 bajo luz blanca continua por 2 meses.

5.2 Fase de inducción de microtubérculos

En la tabla 18 se puede apreciar que la mayor cantidad de microtubérculos en ambas variedades y en ambos grupos de tratamientos (8 horas de luz y 24 horas de luz) se obtuvo sin la adición de nitrato de plata al medio de cultivo. En esta tabla también se aprecia claramente que la mayor cantidad de microtubérculos se obtuvo en la variedad Granola, bajo las dos condiciones fotoperiódicas ensayadas, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambas variedades. De igual manera, la condición de días cortos resultó ser nuevamente la óptima para promover la formación de microtubérculos en ambas variedades.

Tabla 18. Efecto de la concentración de nitrato de plata y del fotoperiodo (FP) sobre la cantidad de microtubérculos/plantas (CMPP), diámetro (D), peso fresco (PF) y peso seco (PS) de los microtubérculos formados en plantas dos meses de edad, variedades Arbolona negra y Granola.

Variedades	Variables	Tratamientos					
		8 horas luz			24 horas luz		
		0 AgNO ₃	1 AgNO ₃	1,5 AgNO ₃	0 AgNO ₃	2,5 AgNO ₃	5 AgNO ₃
Arbolona negra	CMPP	1,13 ^a	0,47 ^b	0,20 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b
	D (cm)	0,63 ^a	0,69 ^a	0,63 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b
	PF (g)	0,28 ^a	0,34 ^a	0,22 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b
	PS (g)	0,05 ^a	0,06 ^a	0,04 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b
Granola	CMPP	1,9 ^a	1,40 ^b	1,07 ^b	1,7 ^b	1,40 ^b	0,80 ^b
	D (cm)	0,54 ^a	0,63 ^a	0,61 ^a	0,67 ^b	0,69 ^b	0,73 ^b
	PF (g)	0,20 ^a	0,26 ^a	0,19 ^a	0,35 ^b	0,21 ^b	0,19 ^b
	PS (g)	0,04 ^a	0,05 ^a	0,03 ^a	0,02 ^b	0,03 ^b	0,03 ^b

Los valores corresponden a promedios de 15 explantes por tratamiento, para cada variedad; obtenidos de un ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Para cada columna, en los promedios con la letra a: no existen diferencias significativas entre variedades, mientras que la letra b significa que si existen diferencias significativas entre variedades.

Luego del análisis estadístico, en el primer grupo de tratamientos (plantas cultivadas bajo días cortos) resalta que en ausencia de nitrato de plata en el medio de cultivo, se formaron la mayor cantidad de microtubérculos en ambas variedades. Además, con la aplicación de 1mg/L de AgNO₃ y 8 horas de luz se obtuvo el mayor diámetro, peso fresco y peso seco de los microtubérculos de la variedad Arbolona negra. Sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas variedades (ver figura 28).

No se realizó el análisis estadístico para el segundo grupo de tratamientos (plantas cultivadas bajo luz blanca continua) debido a que se obtuvieron datos para la variedad Granola pero no para Arbolona negra (ver tabla 18)

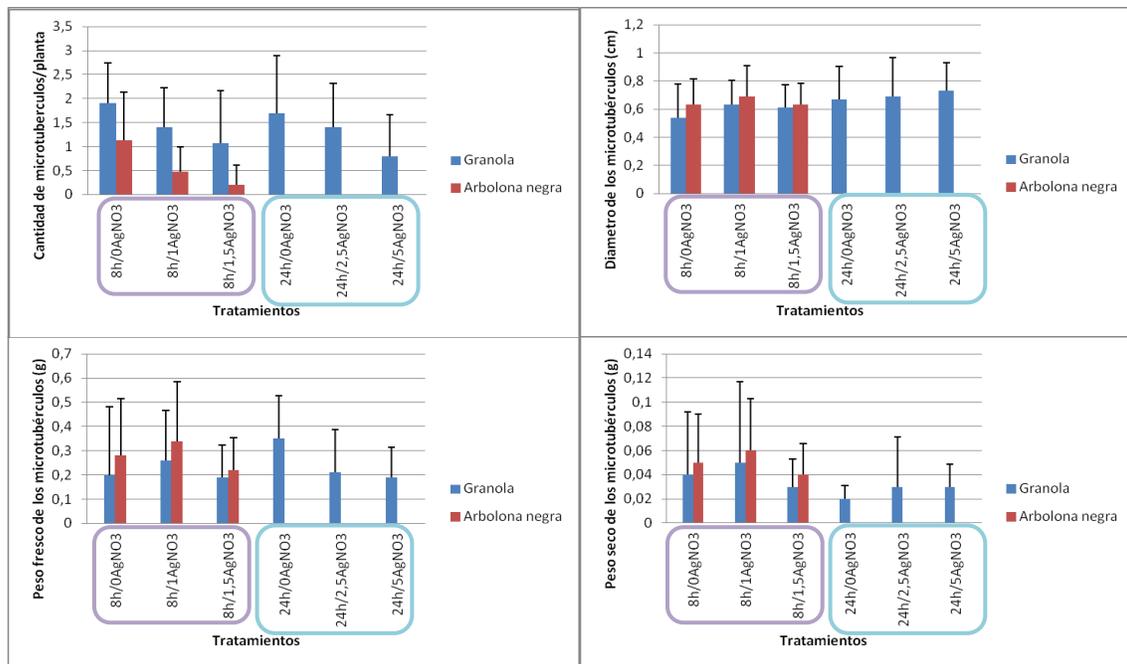


Figura 28. Análisis de la interacción condición lumínica–AgNO₃ sobre la cantidad, diámetro, peso fresco y peso seco de los microtubérculos de las plantas de papa

En la figura 29 se muestran algunos de los microtubérculos obtenidos bajo condiciones fotoperiódicas de días cortos a diferentes concentraciones de AgNO₃. Nótese que los ojos o yemas de estos microtubérculos no se encuentran tan desarrollados como las yemas de los microtubérculos obtenidos en condiciones de luz continua (figura 30).

En la figura 30 se observa además que la luz blanca continua no favoreció la formación de microtubérculos de Arbolona negra en ninguno de los tres tratamientos (0, 2,5 y 5 mg/L de AgNO₃). En Granola se obtuvieron microtubérculos en todos los tratamientos, siendo importante resaltar que la cantidad de microtubérculos de Granola formados bajo condiciones de luz blanca continua resultó ser muy similar a la cantidad que se formó bajo fotoperiodos de días cortos. Esto no ocurrió en los dos experimentos anteriores, donde siempre se obtenía una cantidad significativamente mayor de microtubérculos de Granola bajo condiciones de día corto, en comparación con la baja producción de microtubérculos en condiciones de luz continua. Este resultado permite inferir que el efecto promotor del AgNO₃ sobre la producción de microtubérculos resulta más eficiente en condiciones de luz blanca continua.

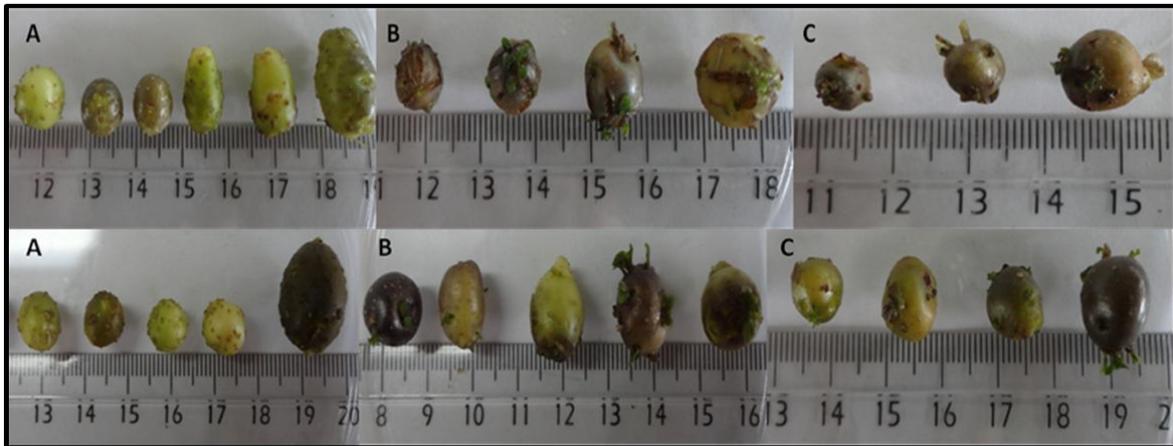


Figura 29. Microtubérculos de Arbolona negra (arriba) y Granola (abajo), de dos meses de edad, cultivados bajo fotoperiodo de días cortos y dos concentraciones de AgNO_3 : A. 0 mg/L, B. 2,5 mg/L y C. 5 mg/L.



Figura 30. Microtubérculos de Granola, de dos meses de edad, cultivados bajo luz blanca continua y dos concentraciones de AgNO_3 : A. 0 mg/L, B. 2,5 mg/L y C. 5 mg/L.

Otra observación resaltante de este experimento resultó ser la manera en que se formaron los microtubérculos especialmente en la variedad Granola bajo luz blanca continua. En la figura 31 se aprecia como los microtubérculos se formaron pegados unos con otros, en grupos de dos o tres, sésiles y con sus yemas comenzando a convertirse en nuevas plantas.



Figura 31: Microtubérculos de Granola cultivados en medio con 2,5 mg/L de AgNO_3 , bajo luz blanca continua.

La poca cantidad de microtubérculos formados con las distintas concentraciones de nitrato de plata no coincide con lo obtenido por Zhang & col. (2006) quienes reportaron que 2,5 y 7,5 mg/L de AgNO_3 resultaron ser las concentraciones óptimas para la formación de la mayor cantidad de microtubérculos y el incremento de su peso fresco en las variedades de papa DN303 y Lanya.

Además del nitrato de plata se han usado otros compuestos químicos como el cloruro de cobalto (CoCl_2) incorporado al medio de cultivo; sin embargo, el uso del nitrato de plata ha sido empleado extensivamente para la multiplicación de brotes y floración in vitro de *Cichorium intybusam* (Bais & col., 2000), *Brassica* y *Petunia* (Chi & col., 1990), dado su solubilidad en agua y su efecto no tóxico cuando es empleado en concentraciones adecuadas (Beyer, 1976 citado por Kumar, 2009)

Si bien este experimento no nos permite concluir sobre el mecanismo de acción del AgNO_3 contrarrestando el efecto inhibitor del etileno, podemos recomendar el uso de este compuesto para la micropropagación de estas dos variedades de papa y para la obtención de microtubérculos.

7. CONCLUSIONES

Efecto de la concentración de sacarosa, consistencia del medio de cultivo y condiciones lumínicas, sobre la producción de microtubérculos de papa.

1. La plántulas de la variedad Granola produjeron la mayor cantidad de microtubérculos en medios semisólidos (0,13 microtubérculos/planta) y líquidos (1,07 microtubérculos/planta), suplementados con 50 g/L de sacarosa e incubadas bajo luz blanca continua.
2. El cultivo en medio semisólido y medio líquido, bajo condiciones de oscuridad permanente no favoreció la formación de microtubérculos en ninguna de las variedades ensayadas.

Efecto de la concentración de Benciladenina (BA) y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa.

3. Las plántulas de Granola y Arbolona negra cultivadas en medio líquido suplementado con 5 mg/L de BA e incubadas bajo fotoperiodo de días cortos mostraron la mayor longitud promedio: 16,07 cm para Granola y 15,57 cm para Arbolona negra.
4. Las plántulas de Granola cultivadas en medio líquido suplementado con 5 mg/L de BA e incubadas bajo condiciones fotoperiódicas de días cortos produjeron la mayor cantidad de microtubérculos por planta (3,80), de mayor peso seco. Con este tratamiento también se obtuvo la mayor cantidad de microtubérculos de Arbolona negra (1,90), existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambas variedades.
5. El mayor diámetro y peso fresco de los microtubérculos de Granola y el mayor peso fresco de los microtubérculos de Arbolona negra se obtuvo con el tratamiento medio

líquido, suplementado con 1 mg/L de BA y cultivo bajo condiciones de luz blanca continua; sin embargo, este resultado no fue estadísticamente significativo.

Efecto de la concentración de Giberelinas (GAs) y del fotoperíodo sobre la producción de microtubérculos de papa.

6. Las plántulas de Granola y de Arbolona negra mostraron la mayor longitud promedio (14,94 cm y 18,10 cm respectivamente) cuando fueron pretratadas con GA, subcultivadas en medios sin BA y condiciones de días cortos.
7. La variedad Arbolona negra produjo el mayor número de microtubérculos (1,80 microtubérculos/planta) en medio sin BA y fotoperiodo de días cortos; mientras que los mayores promedios de diámetro, peso fresco y peso seco de microtubérculos se obtuvieron en medios con 1 mg/L de BA. Bajo condiciones de luz continua, no se obtuvieron microtubérculos para esta variedad.
8. La variedad Granola produjo el mayor número de microtubérculos (2,30 microtubérculos/planta) en medios sin BA y fotoperiodo de días cortos, sin embargo tanto el diámetro como el peso fresco de los microtubérculos resultó significativamente mayor en plantas cultivadas en medios sin BA pero incubadas bajo luz blanca continua.

Efecto de la concentración de Nitrato de plata (AgNO_3) y del fotoperíodo sobre la producción de microtubérculos de papa.

9. La aplicación de nitrato de plata al medio de cultivo líquido redujo considerablemente la longitud de los vástagos de plantas de ambas variedades, en comparación con la longitud de las plantas cultivadas en el tratamiento control sin AgNO_3 . Bajo condiciones de luz continua los vástagos de Arbolona negra y Granola, presentaron la mayor longitud promedio en medios sin AgNO_3 (14 y 15,5 cm, respectivamente).

10. La mayor concentración de AgNO_3 utilizada (5mg/L) provocó la aparición de hiperhidricidad y zonas necróticas de color marrón oscuro en hojas de plantas de Granola cultivadas bajo luz blanca continua.
11. La variedad Granola produjo la mayor cantidad de microtubérculos (1,9 microtubérculos/planta) en medios líquidos sin nitrato de plata e incubadas bajo luz blanca continua y bajo condiciones fotoperiódicas de días cortos.
12. El cultivo bajo luz blanca continua no favoreció la formación de microtubérculos de Arbolona negra en ninguno de los tres tratamientos (0, 2,5 y 5 mg/L de AgNO_3). Las plantas de Arbolona negra produjeron la mayor cantidad de microtubérculos (1,13 microtubérculos/planta) en medios líquidos sin la adición de AgNO_3 e incubadas bajo condiciones fotoperiódicas de días cortos.

8. RECOMENDACIONES

1. Establecer un sistema de microtuberización utilizando fiolas de mayor capacidad, para inducir la formación de mayor número de microtubérculos por envase.
2. Alargar el tiempo de inducción de microtubérculos con el propósito de obtener microtubérculos de mayor tamaño y yemas desarrolladas.
3. Luego de obtener los microtubérculos, sembrar aquellos que tengan brotes. Sembrar algunos microtubérculos completos y otros cortados por la mitad para eliminar la dominancia apical, promoviendo el desarrollo de las yemas laterales. Se pueden utilizar pequeñas macetas con un sustrato de tierra-arena y colocarlas en un incubador.
4. Con la experiencia obtenida en esta investigación, se pueden manipular las condiciones de cultivo a fin de acortar el tiempo de inducción de microtubérculos en la variedad Arbolona negra y proponer una estrategia de rescate de esta variedad nativa mediante la producción de microtubérculos.

9. FINANCIAMIENTO

En el presente año, el Programa de Estímulo a la Innovación e Investigación (PEII) promovido por el Observatorio Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación (ONCTI) financiará un proyecto destinado a fomentar y garantizar la seguridad alimentaria en nuestro país. En el marco de este proyecto se desarrolló el Seminario I, el Seminario II y el Trabajo Especial de Grado.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. Plant pathology. 2005. Fifth edition. Elsevier Academic Press. USA. 826 pp.
2. Aksenova, N., Konstantinova, T., Lozhnikova, V. 2009. Interaction between day length and phytohormones in the control of potato tuberization in the *in vitro* culture. Russian Journal of Plant Physiology. 56: 454-461.
3. Aksenova, N., Konstantinova, T. Golyanovskaya S., Sergeeva, L., Romanov, G. 2012. Hormonal regulation of tuber formation in potato plants. Russian Journal of Plant Physiology. 56: 451-466
4. Arellano, M., Villavicencio G., 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. Disponible en línea: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/2699/1/851.pdf>. [Consulta: 05/08/2012]
5. Año internacional de la papa. 2008. Disponible en línea en: <http://www.potato2008.org/es/index.html> [Consulta: 08/09/2012]
6. Badillo, V., Schnee, L., Benítez, C. 2005. Clave de las familias de plantas superiores de Venezuela, 8va. Edición, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Maracay. 205 pp.
7. Bachem, C., Van der Hoeven, R., de Bruijn, S., Vreugdenhil, D., Visser, R. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. The Plant Journal 9:745-753
8. Bais, H., Sudha, G., Ravishankar, G. 2000. Putrescine and AgNO₃ influences shoot multiplication *in vitro* flowering and endogenous titres of polyamines in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local. Journal Plant Growth Regulation. 19:138-248

9. Cabrera, M., Gómez, R., Espinosa, E., López, J. 2011. Formación de microtubérculos de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal como material vegetal de plantación. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83: 103–107.
10. Castro, J., Agramonte, D., Alvarado-Capo, Y., de Feria, M. 2012. Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. *Bioteconología Vegetal* 12: 3– 24.
11. Centro Internacional de la papa (CIP). La investigación agrícola para el desarrollo. Lima, Perú. Disponible en línea: www.cipotato.org. [Consulta: 05/08/2012].
12. Coria, N., Pérez, A., Sarquís, J. Cantú, I. 2004. Regeneración de la planta de papa (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* a partir del estolón. *Ciencia UANL. Universidad Autónoma de Nuevo León*. pp. 361-370.
13. Chi, G., Barfield, D., Sim, G., Pua, E. 1990. Effect of AgNO₃ and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot organogenesis from seedling explants of recalcitrant Brassica genotypes. *Plant Cell Reports*. 9:195-198.
14. De García, Eva. 1991. Obtención de clones de papa (*Solanum tuberosum* L) resistentes a las heladas. Proyecto CAF-UCV. Informe técnico.
15. Donnelly, D. Coleman, W. Coleman, S. 2003. Potato microtuber production and performance: A review. *American Journal of Potato Research*. 80: 103-115.
16. Espinoza N., Estrada R., Tovar P., Bryan J., Dodds J.H.. (1989). Cultivo de tejidos: micropropagación, conservación y exportación de germoplasma de papa. Documento de Tecnología Especializada del Centro Internacional de la Papa (CIP). 17 pp.
17. Fandiño, T., Perea, M., Rojas, N. 1990. Tuberización *in vitro* en cuatro variedades colombianas de papa (*Solanum tuberosum* L.), *ACEVIV*. 2: 19-25.
18. FAOSTAT. (2010). Principales productores de alimentos y productos agrícolas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Departamento Económico y Social.

19. Fixen, K., Thomas, S., Tong, C. 2011. Blue light inhibition of tuberization in a day-neutral potato. *J Plant Growth Regul.* Springer Science. 9 pp.
20. Gallardo, M., Mogollón, N., Piñero, Z., Hernández, N. 1997. Densidad de plantas en la producción de tubérculos semillas de papa (*Solanum tuberosum* L.) a partir de microtubérculos en invernáculos. Jornadas de Investigación del Decanato de Agronomía de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Barquisimeto, Venezuela. BIOAGRO. 8pp.
21. García, G., Ramírez, Q., Munguía, L. 2004a. Biotecnología alimentaria. Editorial Limusa. México. pp 622. Disponible en línea: <http://books.google.co.ve>. [Consulta: 05/08/2012]
22. García, M., Escalona, M., Meneses S. 2004b. Efecto de la concentración de sacarosa y de reguladores del crecimiento en la tuberización in vitro de *Dioscorea alata* L. variedad Cartagena. *Biotecnología vegetal.* 4:243-246
23. George, E., Hall, M., Jan de Klerk, G. 2008. Plant propagation by tissue culture. Vol 1. 3rd. Edition. Springer. 494. Disponible en línea: <http://books.google.com>. [Consulta: 04/09/2012].
24. Gopal, J., Chamail, A., Sarkar, D. 2004. *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germplasm: Effect of genotype, abscisic acid, and sucrose. *In Vitro Cell.* 40: 485-490.
25. Huaman, Z. 1986. Botánica Sistemática y Morfología de la Papa. Boletín de Información Técnica N° 6. Centro Internacional de la Papa.
26. Jara, G. 1996. Propagación *in vitro* y microtuberización de cultivares de *Solanum tuberosum* L. en medios líquidos. Tesis para optar al grado de Magister, Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 90 pp.
27. JayaSree, T., Pavan, U., Ramesh, M., Rao, A. Mohan, K. Sadanandam, A. 2001. Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 64:13-17.

28. Jiménez, E., Pérez, N., Feria, M., Barbón, R., Capote, A., Chavéz, M., Quiala E., Pérez, J. 1999. Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 59: 19-23.
29. Kittipadukal, P., Bethke, P., Jansky, S. 2012. The effect of photoperiod on tuberisation in cultivated x wild potato species hybrids. *Potato Research*. 55: 27-40.
30. Khuri, S y Moorby, J. 1995. Investigations into the role of sucrose in potato cv. Estima microtuber production *in vitro*. *Annals of Botany* 75: 295-303.
31. Kumar, V., Parvatam, G., Aswathanarayana, G. 2009. AgNO₃ a potencial regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electronic Journal of Biotechnology*. 12: 1-15
32. Lindorf H., de Parisca, L. Rodríguez, P. 2006. *Botánica*. Ediciones UCV. Caracas, Venezuela. 584 pp
33. Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras. 2011. Memoria y cuenta 2012, Tomo I. Caracas. 1170 pp.
34. Morales, J. 2006. Transformación genética de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) con el gen que codifica para el inhibidor de cisteín proteinasas de origen humano, cistatina C. Tesis Doctoral, Universidad de Colima, México. 81 pp. Disponible en línea: <http://digeset.ucol.mx>. [Consulta: 30/03/2012]
35. Morel, G. 1950. Sur la culture des tissus de deux monocotyledones. *C.R. Acad. Sc. Paris* 230:1099-1101.
36. Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 475-597.
37. Perez, N., Castro, D., Garcia, J., Ríos, D. 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, Colombia. *CIENCIA* 16(3), 288 – 295.

38. Poehlman J., Allen, D. 2003. Mejoramiento genético de las cosechas. 2da edición. Editorial Limusa, México. 511 pp.
39. Rigato, S., González, A., Huarte, M. 2001. Producción de plántulas de papa a partir de técnicas combinadas de micropropagación e hidroponia para la obtención de semilla prebásica. *Revista Latinoamericana de la Papa*. 12: 110-120.
40. Rodríguez-Falcón, M., Bou, J., Prat, S. 2006. Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with the flowering response. *Annual Review of Plant Biology*. 57:151-180
41. Romero, R. 2007. Exploración del subsistema semilla dentro del circuito agroproductivo de la papa en las zonas paperas del Estado Mérida, para el diseño de estrategias de competitividad. Trabajo Especial de Grado. Universidad de los Andes, Venezuela. 64 pp.
42. Romero, L., Monasterio, M. 2008. Papas Negras, papas del páramo. Un pasivo socioambiental de la modernización agrícola en los Andes de Venezuela. *Boletín Antropológico*. 64: 107-138.
43. Sakar, D. 2010. Photoperiodic inhibition of potato tuberization: an update. *Plant Growth Regul.* 62: 117-125.
44. Salas, J., Quintero, N., Delgado, L. 2000. Efecto de la concentración de sacarosa y el fotoperíodo en la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) var. Andinita, Caribay y Monserrate. XX Congreso de la Asociación Latinoamericana de la papa. Disponible en línea: <http://es.scribd.com>. [Consulta: 03/04/2012].
45. Salisbury, B. Ross, C. Alonso, J. 2000. Fisiología de las plantas. Vol 3. Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. Ediciones Paraninfo. Madrid, España. 305 pp.
46. Seabrook, J. 2005. Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L) *in vitro*: A review. *American Journal of Potato Research*. 82:353-367.

47. Silva, I., Cordero, J. 2009. Proyecto de producción de semilla de papa (*Solanum tuberosum* L.) de alta calidad, en el municipio José María Vargas, estado Táchira. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Venezuela. 12 pp.
48. Slimmon, T., Machado, V. Coffin, R. 1989. The effect of light on *in vitro* microtuberization of Potato cultivars. American Journal of Potato Research. 66:843-848.
49. Taiz, L., Zeiger, E. 2006. Plant physiology. Fourth edition. Edit. Sinauer Associates. Sunderland, U.S.A. 764 pp.
50. Turhan, H. 2004. The effect of silver nitrate (Ethylene inhibitor) on *in vitro* shoot development in potato (*Solanum tuberosum* L.). Biotechnology. 3: 72-74.
51. Villalobos, V., Thorpe, T. 1993. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados en: cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicación. Ediciones Roca WM, Mroginski LA. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. Pag: 127-142.
52. Vreugdenhil, D., Boogard, Y., Visser, R., Bruijn, S. 1998. Comparison of tuber and shoot formation from *in vitro* cultured potato explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 53: 197-204.
53. Zhang, Z., Zhou, W., Li, H. 2005. The role of GA, IAA and BAP in the regulation of *in vitro* shoot growth and microtuberization in potato. Acta Physiologiae Plantarum. 27:363-369.
54. Zhang, Z-J.; Li, H-Z.; He, Y. y Xu, L. 2006. Effect of silver nitrate on *in vitro* shoot growth and tuberization in *Solanum tuberosum* L. Journal of Zhejiang University. 32: 36-40.