

Propagación clonal in vitro de especies y variedades de papa (*solanum* spp.) en función del tiempo

In vitro clonal propagation of species and varieties of potatoes (*solanum* spp.) depending on time

Antonio Salomón Valderrama Romero^{1,3}, Víctor Hugo Abril Porras¹, Jenaro Reyes Matamoros¹, Yony Flora Fernández Herrera², Gladys Acuña Azarte², Marco Romario Condori Jerillo², Flor Leineth Huamán Coaquira², Yasmín Jesús Vélez Chang³, José Antonio Legua Cárdenas³

RESUMEN

Objetivo: Evaluar las particularidades y características de la propagación in vitro de 12 especies y variedades de papa, en dependencia del tiempo de cultivo, utilizando la propagación clonal in vitro. **Materiales y métodos:** La esterilización de los instrumentos se realizó de acuerdo a los protocolos de laboratorio de Biotecnología Agrícola. Las plántulas de papa se cultivaron en tubos de ensayo utilizando el medio de cultivo de Murashige y Skoog, modificado y sin la presencia de fitohormonas. Los parámetros medioambientales del cuarto de crecimiento fueron: temperatura del aire 20-22 °C, la intensidad luminosa se mantuvo en 3000 lux, con un fotoperiodo de 16 horas/luz. Las observaciones se realizaron cada 15 días y los parámetros que se evaluaron fueron: longitud de las plántulas; número de hojas; número de brotes laterales, presencia o ausencia de raíz en porcentaje, también se halló el coeficiente de propagación en base a los datos que se obtuvieron. El método estadístico de experimentación que se empleó fue el diseño completamente al azar con 3 repeticiones y 10 réplicas por cada tratamiento. Los resultados de la investigación se analizaron con el método de análisis de varianza (ANOVA). **Resultados:** De todos los cultivares estudiados, las variedades y especies Tichuasi, Mariva y Cashpadana mostraron más actividad organogénica, lo cual se puso de manifiesto en el desarrollo y crecimiento que alcanzaron estos cultivares en los dos años que duró el experimento. La longitud de las plántulas de estos cultivares tuvo valores de entre 10 a 12 centímetros como término medio, con un número de hojas de 12 a 17 unidades por explante. **Conclusiones:** Existe una dependencia de los resultados obtenidos en la propagación clonal in vitro con relación a los genotipos estudiados y al tiempo transcurrido en la investigación.

Palabras clave: Papa, cultivo de tejidos, propagación clonal in vitro, características

ABSTRACT

Objective: Evaluate of the particularities and characteristics of the in vitro propagation of 12 species and varieties of, depending on the time of cultivation, using the clonal propagation in vitro. **Materials and methods:** The sterilization of the instruments was carried out according to the laboratory protocols of Agricultural Biotechnology. Potato seedlings were grown in test tubes using the culture medium of Murashige and Skoog, modified and without the presence of phytohormones. The environmental parameters of the growth room were: air temperature 20-22 °C, the light intensity was maintained at 3000 lux, with a photoperiod of 16 hours/light. The observations were made every 15 days and the parameters that were evaluated were: seedling length; number of sheets; number of lateral shoots, presence or absence of root in percentage, the propagation coefficient was also found based on the data obtained. The statistical method of experimentation that was used was the completely randomized design with 3 repetitions and 10 replications for each treatment. The research results were analyzed with the variance analysis method (ANOVA). **Results:** Of all the cultivars studied, the varieties and species Tichuasi, Mariva and Cashpadana showed more organogenic activity, which was evident in the development and growth achieved by these cultivars in the two years of the experiment. The seedlings length of these cultivars had values of between 10 and 12 centimeters on average, with a number of leaves of 12 to 17 units per explant. **Conclusions:** There is a dependence on the results obtained in clonal propagation in vitro in relation to the genotypes studied and the time elapsed in the investigation.

Keywords: Potato, tissue culture, clonal propagation in vitro, characteristics.

INTRODUCCIÓN

La propagación clonal *In vitro* es un método efectivo que con éxito complementa a los métodos tradicionales de reproducción y fitomejoramiento de los cultivos agrícolas, y de manera susceptible acelera estos procesos. El método de propagación clonal in vitro tiene muchas ventajas con respecto a métodos tradicionales de propagación, entre los cuales la ventaja más atractiva, desde un punto de vista práctico, es el alto coeficiente de reproducción (propagación), y la posibilidad de obtener materiales de propagación vegetativa (plántulas) libre de patógenos, especialmente virus, en cualquier época del año, y es de una gran importancia para la conservación in vitro del germoplasma (Roca *et al.*, 1982; Golmirzae, Panta, 1997). Esta tecnología, que forma parte de la Biotecnología Agrícola (Lutova, 2003), también permite obtener una gran cantidad de material de siembra idéntico y sano. El éxito de un nuevo cultivo o variedad puede ser alcanzado cuando se tiene la cantidad necesaria de material de siembra requerida por los productores (Huamán, 2000).

Una condición necesaria para la propagación in vitro es que

se emplee material que conserve por completo la estabilidad genética en todas las etapas del proceso de propagación (explante, plántula, campo). Esta condición la tienen los ápices terminales y los retoños aéreos, órganos que proceden del tallo. En el cultivo in vitro la diferencia entre la estabilidad genética de los meristemas apicales y la inestabilidad genética de las células de los callos es palpable (Butenko, 1999).

En los procesos de desarrollo y crecimiento de las plantas in vitro, un evidente efecto regulatorio tienen estos dos tipos de influencia: de un lado el tratamiento con fitohormonas, las cuales hacen que varíe el estatus hormonal interno, y de otro lado, el cultivo con luz de diferente contenido espectral que tienen un efecto que se manifiesta, en particular, con un cambio en el balance hormonal endógeno de las plantas. En los últimos años se acumulan más datos que apuntan a que los mecanismos de foto-regulación y hormono-regulación de la morfogénesis, tiene entre si muchos parecidos, y es posible la existencia de una serie de cadenas intermedias comunes (Voskresienskaia, 1979; Kefeli, 1987).

Para la propagación clonal in vitro de la papa se utiliza como

¹ Universidad Rusa de la Amistad de los Pueblos - URAP. Moscú, Rusia.

² Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco - UNSAAC. Cusco, Perú.

³ Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión - UNJFSC. Huacho, Lima, Perú.

regla el medio formulado por Murashige y Skoog en el año 1962 (Murashige, Skoog, 1962), variando el contenido y la combinación de los reguladores de crecimiento en dependencia del objeto de estudio. También se agrega sacarosa o glucosa en una concentración de 1 – 3%, dependiendo del cultivar y las condiciones de cultivo (Morozova, Melik-Sarkisov, 1978), si se eleva demasiado el contenido de carbohidratos se perturba el desarrollo de los brotes, los cuales forman retoños débiles y fenolizados.

Cada nuevo objeto de estudio necesita una corrección en la cantidad de reguladores de crecimiento y del resto de los componentes del medio de cultivo a utilizar, pero a falta de un procedimiento in vitro que se pueda utilizar para propagar la papa, que sea válido para cualquier cultivar, surge la necesidad de mejorar el método existente.

MATERIALES Y MÉTODOS

En calidad de objeto de investigación se utilizó 12 genotipos de papa, entre los cuales se encuentran variedades nativas dulces como: Papa Amarilla, Runtus (*Solanum goniocalyx* Juzepzuk et Bukazov) (2n=2x=24); Cashpadana (*Solanum goniocalyx* Juzepzuk. et Bukazov) (2n=2x=24); Huayro (*Solanum x chaucha* Juzepzuk. et Bukazov) (2n=3x=36) y Sani Imilla (*Solanum andigenum* Juzepzuk. et Bukazov) (2n=4x=48).

Las variedades mejoradas que escogimos fueron, en orden del año de liberación al campo: Ticahuasi (*Solanum tuberosum* L.) (2n=4x=48); Tomasa (*Solanum tuberosum* L.) (2n=4x=48); Yungay (*Solanum tuberosum* L.) (2n=4x=48); Mariva (*Solanum tuberosum* L.) (2n=4x=48); Revolución (*Solanum tuberosum* L.) (2n=4x=48); María Huanca (*Solanum tuberosum* L.) (2n=4x=48), Canchán (*Solanum tuberosum* L.) (2n=4x=48) y la variedad mejorada Yantarny (*Solanum tuberosum* L.) (2n=4x=48) fruto del trabajo de fitomejoradores de Rusia. El material vegetal que forma parte de este estudio fue tomado de las muestras que se conservan en el Banco de Germoplasma del Centro Internacional de la

Papa – CIP ubicado en Lima, Perú, fue amablemente cedido por esta institución para realizar nuestras investigaciones. La variedad Yantarny fue proporcionada por el Instituto de Fisiología Vegetal de la Academia de Ciencias de Rusia (Butenko, 1999), esta variedad nos sirvió de control en los experimentos programados. La esterilización de los instrumentos se realizó de acuerdo al libro “Métodos prácticos de laboratorio para el curso de Biotecnología Agrícola” (Kalashnikova et al., 1996). Las plántulas de papa se cultivaron en tubos de ensayo utilizando el medio de cultivo de Murashige y Skoog modificado y sin la presencia de fitohormonas. Los parámetros medioambientales del cuarto de crecimiento fueron: temperatura del aire 20-22 °C, la intensidad luminosa se mantuvo en 3000 lux, con un fotoperíodo de 16 horas/luz. Las observaciones se realizaron cada 15 días y los parámetros que se evaluaron fueron: longitud de las plántulas; número de hojas; número de brotes laterales, presencia o ausencia de raíz en porcentaje, también se halló el coeficiente de propagación en base a los datos que se obtuvieron. El método estadístico de experimentación que se empleó fue el diseño completamente al azar con 3 repeticiones y 10 réplicas por cada tratamiento. Los resultados de la investigación se analizaron con el método de análisis de varianza (ANOVA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al micropropagar los materiales vegetales por largo tiempo, surgen algunos cambios fenotípicos en las plántulas. En nuestra investigación se observó cambios notorios en los materiales vegetales, tales como: alteración de la dominancia apical, ausencia de raíz, formación de microtubérculos, excesiva formación de brotes laterales, cambios en la pigmentación (coloración antocianínica). Todos esos cambios surgieron y desaparecieron en el transcurso de la investigación, por lo que se pudo concluir que el germoplasma vegetal en los límites de un clon y genotipo no es estable, pero toda la variabilidad que existe en ellos, en los límites de un genotipo, es estable.

Tabla 1. Propagación clonal in vitro de papas nativas dulces en dependencia del tiempo.

Variedades de papa	Número de subcultivo	Longitud media de plántulas, cm.	Número promedio de hojas, unidades	Brotes laterales, unidades
Amarilla Runtus (<i>Solanum goniocalyx</i> Juz. et Buk.) (2n = 2x = 24)	II	4,3	6,4	
	IV	6,5	7,2	1,4
	VI	7,5	7,8	1,8
	VIII	6,1	8,6	2,9
	XI	5,9	5,4	2,1
	DMS ₀₅	2,72	2,46	2,2
Cashpadana (<i>Solanum goniocalyx</i> Juz. et Buk.) (2n = 2x = 24)	II	9,9	8,7	
	IV	8,9	15,6	2,3
	VI	15,1	12,0	3,3
	VIII	11,4	10,2	3,0
	XI	10,8	10,9	2,5
	DMS ₀₅	2,16	2,64	2,7
Huayro (<i>Solanum x chaucha</i> Juz. et Buk.) (2n = 3x = 36)	II	3,2	6,3	
	IV	5,8	12,3	1,3
	VI	7,6	12,5	2,9
	VIII	5,1	9,8	3,8
	XI	4,8	7,0	2,9
	DMS ₀₅	1,39	2,13	2,1
Sani Imilla (<i>Solanum andigenum</i> Juz. et Buk.) (2n = 4x = 48)	II	4,4	7,1	
	IV	3,6	10,5	1,9
	VI	8,2	10,2	2,8
	VIII	6,0	7,4	2,9
	XI	5,4	7,1	2,2
	DMS ₀₅	1,26	1,72	2,4

De todos los genotipos estudiados, la especie nativa dulce Cashpadana (Tabla 1) y las variedades mejoradas Ticahuasi y Mariva mostraron más actividad organogénica, lo cual se puso de manifiesto en el desarrollo y crecimiento que alcanzaron estos cultivares en los dos años que duró el

experimento. La longitud de las plántulas de estos cultivares tuvo valores de entre 10 a 12 centímetros como término medio, con un número de hojas de 12 a 17 unidades por explante (Tabla 2).

Tabla 2. Propagación clonal in vitro de variedades mejoradas de papa en dependencia del tiempo.

Variedades de papa	Número de subcultivo	Longitud media de plántulas, cm.	Número promedio de hojas, unidades	Brotos laterales, unidades
Ticahuasi (<i>Solanum tuberosum</i> L.) (2n = 4x = 48)	II	5,7	11,5	1,8
	IV	9,6	17,2	1,5
	VI	10,2	16,5	3,3
	VIII	10,1	12,3	3,0
	XI	9,3	13,7	3,9
	DMS ₉₅	1,76	3,04	
Tomasa (<i>Solanum tuberosum</i> L.) (2n = 4x = 48)	II	8,6	11,0	
	IV	6,1	12,2	3,6
	VI	13,1	16,8	3,4
	VIII	7,1	9,8	6,6
	XI	6,5	10,3	3,3
	DMS ₉₅	1,88	3,02	3,8
Tomasa (<i>Solanum tuberosum</i> L.) (2n = 4x = 48)	II	6,4	8,6	
	IV	9,9	19,3	2,6
	VI	9,5	12,1	6,1
	VIII	6,3	7,0	4,0
	XI	5,9	6,3	2,3
	DMS ₉₅	1,52	1,7	2,1
Tomasa (<i>Solanum tuberosum</i> L.) (2n = 4x = 48)	II	7,1	8,9	
	IV	11,2	10,7	1,0
	VI	13,9	15,5	4,2
	VIII	9,6	6,6	6,0
	XI	5,8	7,4	2,9
	DMS ₉₅	1,46	1,76	3,0
Tomasa (<i>Solanum tuberosum</i> L.) (2n = 4x = 48)	II	6,2	7,6	
	IV	8,2	13,1	1,1
	VI	10,6	15,0	2,3
	VIII	7,9	11,7	3,8
	XI	8,5	12,1	2,6
	DMS ₉₅	1,63	1,60	3,3
Tomasa (<i>Solanum tuberosum</i> L.) (2n = 4x = 48)	II	6,3	8,5	
	IV	7,0	13,8	1,4
	VI	13,3	13,3	3,1
	VIII	6,3	8,1	3,1
	XI	6,4	8,6	2,2
	DMS ₉₅	1,11	1,79	2,7

En los otros genotipos, las longitudes de las plántulas tuvieron un valor medio de 4 a 8 centímetros, y un número de hojas de 6 a 10 unidades por explante (Tablas 1 y 2). Es necesario señalar que la cantidad de subcultivos hace que disminuya la capacidad de los explantes de formar plántulas

con velocidad normal de desarrollo. El punto máximo de desarrollo para todos los cultivados estudiados se observó en el VI subcultivo, esto es aproximadamente al año y dos meses de haber empezado el experimento.

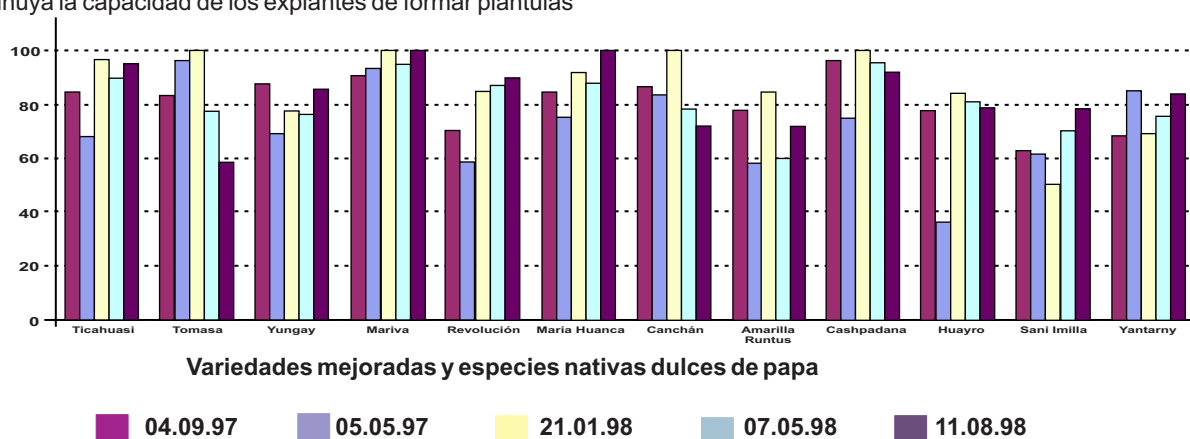


Figura 1. Capacidad de enraizamiento de clones de variedades mejoradas y especies nativas dulces de papa en condiciones in vitro.

La capacidad de los explantes de formar raíces estuvo entre los valores de 35,9% y 100% (Figura 1). Entre las variedades mejoradas destaca claramente la variedad Mariva, la cual en todos los controles que se hicieron para evaluar la capacidad de enraizamiento, tuvo valores entre 90,1 – 100%. De este modo se puede decir que la capacidad de enraizamiento

depende del objeto de estudiado y del número de subcultivos. Así tenemos que en general las variedades mejoradas tienen una mejor capacidad de enraizamiento con respecto a las especies nativas dulces y también con respecto a la variedad Yantarnii, la cual mostró valores entre 68,8 a 84,6%.

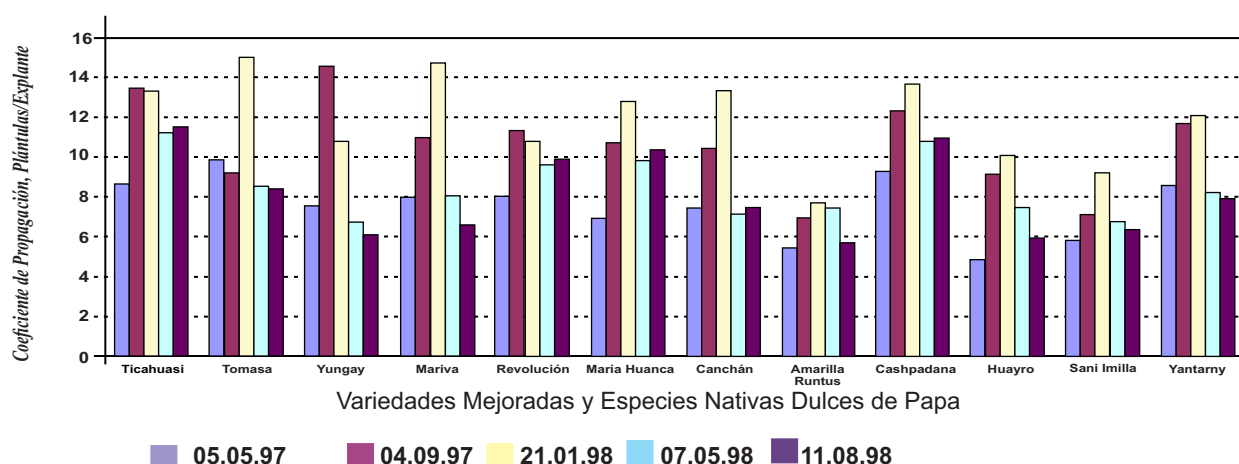


Figura 2. Coeficiente de Propagación en clones de variedades mejoradas y especies nativas dulces de papa en condiciones in vitro.

Por otro lado, según muestra la Figura 2, se pudo observar una menor capacidad de propagación de las variedades nativas dulces Runtus (*Solanum goniocalyx* Juz. et Buk.), Huayro (*Solanum x chaucha* Juz. et Buk.) y Sani Imilla (*Solanum andigenum* Juz. et Buk.). En vista de estas diferencias en la capacidad de propagación de las variedades nativas dulces con los cultivares mejorados, se realizó un análisis comparativo con el parámetro de Coeficiente de Propagación, el cual se muestra en la Figura 2.

Como resultado de este análisis se observó claramente mejores resultados en el Coeficiente de Propagación de las variedades mejoradas con respecto a las papas nativas dulces y también con respecto a la variedad Yantarny, la cual mostró valores intermedios entre las variedades mejoradas y las especies nativas dulces, y obtuvo parámetros de 7,9 a 12,1 plántulas por explante. Estos resultados nos hacen suponer que la capacidad de propagación de las plántulas estudiadas está en función de los diferentes niveles de ploidía de las especies y variedades de papa (Alcántar Vázquez, 2014, Mable, 2013).

Toda colección de plantas in vitro de una sola variedad o especie son sucesores de un solo clon y por lo tanto debe de caracterizarla la constancia en sus caracteres morfológicos. Sin embargo, en el transcurso del experimento, nosotros muchas veces observamos variación en algunos caracteres morfológicos como: formación de micro tubérculos en las plántulas y en el agar, forma y tamaño de las hojitas, densidad de la raíz, presencia de raíces aéreas, coloración antocianínica, ausencia de raíz, formación de callos en la plántula, variación en el carácter de la dominancia apical de la plántula (Krikorian, 1991).

La alteración de la dominancia apical sólo la observamos en la variedad de papa nativa dulce Huayro ($2n = 3x = 36$). La formación de callo tuvo una mayor incidencia en los cultivares mejorados y muy poco en las especies de papa nativas dulces diploides y triploides. Plántulas sin raíces se pudo observar en la especie de papa nativa dulce tetraploide Sani Imilla ($2n = 4x = 48$), las cuales con el transcurrir del experimento (a través de los subsiguientes cultivos), formaron plántulas morfológicamente normales.

Todas las variaciones mencionadas desaparecieron con el transcurso del experimento, y mayormente se pudo ver la formación de plántulas con caracteres normales.

En el transcurso del experimento se hizo evidente que los mejores resultados como longitud de plántulas, número de hojas, número de brotes laterales (Tablas 1 y 2), porcentaje de enraizamiento (Figura 1) y coeficiente de propagación

(Figura 2), se obtuvieron en los cultivares mejorados de papa en comparación con las variedades nativas dulces con diferentes niveles de ploidía. Una excepción en este caso fue la variedad de papa nativa dulce Cashpadana ($2n = 2x = 24$), la cual obtuvo tan buenos resultados como las variedades mejoradas de papa.

CONCLUSIONES

Existe una dependencia de los resultados en función de los genotipos estudiados, el cultivo de ellos y los subsiguientes cultivos (subcultivos) por un periodo relativamente largo, tiene un efecto descendente en la intensidad de desarrollo y crecimiento de los genotipos, por eso es necesario el estudio detallado de estos aspectos en cada genotipo a utilizar en la propagación clonal in vitro.

De las investigaciones realizadas por nosotros se puede sacar la conclusión de que existe una dependencia de los resultados obtenidos en la propagación clonal in vitro con relación a los genotipos estudiados.

El cultivo por un tiempo relativamente largo de los microesquejes (explantes) de papa en condiciones in vitro, en el transcurso de varios subcultivos, conlleva a una disminución en la intensidad de crecimiento de las plántulas-regenerantes de los genotipos estudiados.

Se puso de manifiesto que para la obtención de plántulas-regenerantes es necesario encontrar las cantidades y contenidos específicos de los medios de cultivo a utilizar en la propagación clonal in vitro, en concordancia a genotipos a estudiar.

De acuerdo a nuestras investigaciones, el material vegetal en los límites de un genotipo no es estable, varía en algunos caracteres de desarrollo y crecimiento, pero con todo esto el nivel de variabilidad en los diferentes caracteres de desarrollo y crecimiento, en los límites de un genotipo, se conserva.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Rusa de la Amistad de los Pueblos (Moscú – Rusia) por los conocimientos y facilidades proporcionadas a los autores Valderrama, Abril y Reyes quienes realizaron su formación académica en esa institución de educación superior.

GLOSARIO DE TÉRMINOS EMPLEADOS

Callo. Tejido surgido in vivo o in vitro por medio de una proliferación desorganizada de las células de las plantas y los explantes.

Coefficiente de propagación. El coeficiente de propagación muestra cuántas plántulas se pueden conseguir a partir de un explante (al cabo de aproximadamente 2 meses). La unidad de medida es plántulas/explante.

Dominancia apical. Acción de inhibición del crecimiento de las yemas laterales en presencia de una yema terminal (apical).

Explante. Fragmento de tejido u órgano incubado y cultivado en medio artificial de cultivo.

In vitro. Material vegetal que se desarrolla, multiplica o conserva aislado de su medio natural en tubos de ensayo, placas Petri, biorreactores, utilizando para ello medios artificiales de cultivo y condiciones de máxima asepsia.

Microesqueje. Diminutivo de esqueje.

Esqueje. Parte vegetativa reproducida asexualmente por brotes, los cuales cuando se colocan en condiciones apropiadas, desarrollarán una planta completa con características idénticas a la planta madre.

Plántula-regenerante. Plántula obtenida a partir de un explante.

Ploidía. Grado de replicación del paquete cromosómico que caracteriza a una especie. Su símbolo es 2x, 3x, 4x, etc., y se definen respectivamente como diploide, triploide, tetraploide, etc.

Subcultivo. El cultivo subsiguiente que se realiza a una plántula.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Alcántar Vázquez, J.P. (2014). La poliploidía y su importancia evolutiva. Temas de Ciencia y Tecnología. *Revista de la Universidad del Papaloapan*, Honduras. 18(54): 17-29.
- Butenko R.G. (1999). Biología celular de las plantas superiores in vitro como base para la Biotecnología. FBK-PRESS. Moscú, Rusia. 160 pp.
- Golmirzae A.M., and Panta A. (1997). Tissue Culture Methods and Approaches for Conservation of Root and Tuber Crops. In: M.K. Razdan E.C. Cocking (Eds.). *Conservation of Plant Genetic Resources in vitro*. 1. Science Publishers Inc., USA, pp. 123-152.
- Huamán Z. (2000). Semilleros comunales de Papas Nativas del Perú. *Agronoticias*. Lima, Perú. (251): 28 – 31.
- Kalashnikova E.A., Degtyariov S.V., Kochieva E.Z., Kalashnikov D.V., Kovaliov V.M. y Khrustaliyova L.I. (1996). Métodos prácticos de Laboratorio para el Curso de Biotecnología Agrícola. Editado por V.S. Shevelukha. Moscú, Editorial de la Academia Agraria de Moscú "K.A. Timiryazev". 90 p.
- Kefeli V.I. (1987). Desarrollo y crecimiento vegetal y fotomorfogénesis. *Fisiología de Plantas*. 34(4):685-697.
- Krikorian, A.D. (1991). Estabilidad genotípica en células, tejidos y plantas derivadas de cultivos in vitro. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. CIAT, Cali, Colombia. Pp. 313-338
- Lutova, L.A. (2003). Biotecnología de las plantas superiores. Editorial Universidad Estatal de San Petersburgo. San Petersburgo, Rusia. 187 p.
- Mable, B.K. (2013). Polyploids and hybrids in changing environments: winners or losers in the struggle for adaptation? *Heredity*. 110: 95-96.
- Morozova, S.E. y Melik-Sarkisov, O.S. (1978). Propagación de papas libres de virus por medio de la obtención de tubérculos in vitro. *Fisiología de Plantas*. 25,(2): 373-378.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for a rapid growth and bioassays of tobacco tissue cultures. *Physiological Plantarum*. 15: 473-497.
- Roca W., Rodriguez J., Beltran J., Roa J. and Mafla G. (1982). Tissue culture for the conservation and international Exchange of germplasm. In Fujiwara 8Eds.) :771 – 772.
- Voskresenskaya, N.P. (1979). Agentes fotorreguladores del metabolismo vegetal. Nauka (Ciencia) Eds., Moscú, Rusia. 48 p.