



Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología

Instituto de Biotecnología de las Plantas

---



## TESIS DE DIPLOMA

**Respuesta *in vitro* y en casa de cultivo de variedades cubanas durante la obtención de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.)**



**Autor: Kasuni Dilhara Edirisinghage Jayawardana**

**Tutora: Dra.C. Leyanes García Águila**

---

**Santa Clara**

**2015**



**UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

---

**TESIS DE DIPLOMA**

**Respuesta *in vitro* y en casa de cultivo de variedades  
cubanas durante la obtención de semilla original de  
papa (*Solanum tuberosum* L.)**

**Autor: Kasuni Dilhara Edirisinghage Jayawardana**

**Tutora: Dra.C. Leyanes García Águila**

**Instituto de Biotecnología de las Plantas  
Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas  
Carretera a Camajuani km 5.5  
Santa Clara, Villa Clara, Cuba**

**leyanis@ibp.co.cu**

---

**Santa Clara, 2015**

*Pensamiento*

*“Somos como plantas, como árboles, como otras personas, como la lluvia que cae; eso que está alrededor de nosotros, estamos así como todo”*

*Gautama Buddha*

*Dedicatoria*

*A mis padres, hermana y hermano los cuales me han  
dado siempre todo su apoyo y su cariño*

*Agradecimiento*

## *Agradecimiento*

*A mi mamá, mi papá y a mi familia por apoyarme siempre en todo, impulsarme a seguir hacia delante. Por todo su esfuerzo para que yo pudiera llegar a donde estoy*

*Agradezco a tía Jean por ayudarme tanto todos estos años*

*A mi tutora Dra.C. Leyanes García Águila y las profesoras Mayelin Rodríguez Urquiza y Marta Pérez Peralta por su ayuda incondicional, por las tantas horas de trabajo dedicadas, por su paciencia, por su empeño y por sobre todas las cosas por confiar en mí; sin ustedes este sueño no hubiese sido posible*

*A mis compañeros del grupo y todas mis amistades*

*A todos los profesores de Departamento de Biología*

*A todas las personas que han estado junto a mí y me han apoyado a lo largo de mi carrera*

*A todos muchas gracias...*

*Resumen*

## RESUMEN

En el cultivo de la papa, las técnicas biotecnológicas se utilizan para apoyar los procesos de producción de semilla, lo cual garantiza la uniformidad, calidad genética y sanidad de la semilla. Es por ello, que este trabajo tuvo como objetivo general determinar la eficiencia en el crecimiento de cuatro variedades cubanas de papa (*Solanum Tuberosum* L.) durante la propagación *in vitro* y obtención de minitubérculos en casa de cultivo; mediante características morfológicas y fisiológicas. Los resultados mostraron diferencias significativas entre las variedades con respecto al porcentaje de supervivencia de los ápices meristemáticos durante la fase de establecimiento *in vitro*. Las variedades Yuya e Ibis mostraron la mejor respuesta con altos porcentajes de supervivencia de los meristemas, mayores valores de plantas con características morfológicas adecuadas y altos coeficientes de multiplicación. En la fase de aclimatización la variedad Yuya mostró mayor crecimiento con respecto a las demás variedades, lo cual se verificó a través de los altos valores de masa fresca del follaje y de la raíces y de su tasa absoluta de crecimiento. La variedad Ibis, Yuya y Marinca presentaron los mayores valores de tasa relativa de crecimiento durante el desarrollo vegetativo de las plantas con la mayor acumulación de biomasa. Sin embargo, a los 75 días de cultivo la variedad Ibis presentó el mayor número de tallos y minitubérculos por planta con alto contenido de materia seca. Estos resultados brindan el conocimiento necesario para la elección y manejo adecuado de las variedades de papa en el Programa de producción de semilla en Cuba.

**Palabras clave:** ápice meristemático, masa fresca, minitubérculos, supervivencia, papa

*Abstract*

## **Abstract**

Biotechnological techniques are used to back up the processes of production of seed in the cultivation of the potato, which guarantee the uniformity, genetic quality and health of the seed. This experiment was carried out having a general objective to determine the efficiency in the growth of four Cuban varieties of potato (*Solanum Tuberosum* L.) during the propagation *in vitro* and obtaining of mini-tubers at the house of cultivation; through morphological and physiological characteristics. The results obtained showed significant differences between the varieties regarding the percentage of survival of the apex meristem during the phase of establishment *in vitro*. Varieties Yuya and Ibis showed the best answer with high percentages of survival of the meristems, best values of plants with ideal morphological characteristics and high coefficients of multiplication. In the phase of acclimatization variety Yuya showed a higher growth regarding to other varieties, which verified through superior values of fresh mass of the foliage and roots of itself and of absolute rate of growth. Varieties of Ibis, Yuya and Marinca presented the largest values of relative rate of growth during the vegetative development of the plants with a superior accumulation of biomass. However, to the 75 days of cultivation, variety of Ibis showed the highest number of stems and mini-tubers per plant with a high contents of dry matter. These results provide the necessary knowledge to select and adequate management of the varieties of potato in the Schedule of seed Production in Cuba.

**Keywords:** Apex meristem, fresh mass, mini-tubers, survival, potato

# *Índice*

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 La papa. Generalidades</b> .....	<b>4</b>
2.1.1 Origen y distribución .....	4
2.1.2 Descripción botánica, diversidad genética.....	5
2.1.3 Taxonomía de la Papa.....	6
<b>2.2 Importancia económica del cultivo</b> .....	<b>7</b>
<b>2.3 Descripción de las variedades cubanas en estudio</b> .....	<b>8</b>
2.3.1. Grettel .....	8
2.3.2. Yuya .....	9
2.3.3. Ibis.....	10
<b>2.4 Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de tubérculo-semilla</b> .....	<b>Error!</b>
Bookmark not defined.	
<b>2.5. Micropropagación</b> .....	<b>12</b>
2.5.1. Producción de plántulas <i>in vitro</i> .....	12
2.5.1.1. Fase de establecimiento.....	12
2.5.1.2. Fase de multiplicación <i>in vitro</i> .....	12
2.5.1.3. Fase de aclimatización de las <i>vitroplantas</i> .....	13
<b>2.6 Producción de semilla de papa</b> .....	<b>15</b>
2.6.1. Producción de minitubérculos en casas cultivo protegido.....	15
2.6.2. Tuberización.....	16
2.6.3. Factores que afectan la producción y calidad de tubérculo-semilla de	

papa.....	16
2.6.4. Ventajas de la utilización de tubérculo-semilla de papa.....	17
2.7. Producción de semilla de papa en cuba .....	18
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
Procedimientos generales.....	20
Material Vegetal.....	20
Medio de cultivo.....	20
Condiciones de cultivo.....	21
Instrumental.....	21
Análisis estadístico.....	21
3.1 Efecto del genotipo en el establecimiento o iniciación <i>in vitro</i> de los meristemos papa .....	22
3.2 Caracterización de las plantas durante la fase de la multiplicación .	23
3.3 Evaluación de las plantas en casa de cultivo.....	24
Condiciones de cultivo.....	24
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
4.1 Efecto del genotipo en el establecimiento o iniciación <i>in vitro</i> de los meristemos papa.....	27
4.2 Caracterización de las plantas durante la fase de la multiplicación <i>in vitro</i> .....	29
4.3 Evaluación de las plantas en casa de cultivo.....	29

<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>7. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	

# *Introducción*

## INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.), es uno de los cultivos alimenticios más importantes tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo y ocupa el cuarto lugar entre los alimentos más populares, después del arroz, trigo y maíz ( Luna *et al.*, 2002).

Existen diversas versiones sobre el origen de la papa, siendo la más aceptada la propuesta por Hawkes (1963) que la sitúa en las cercanías del lago Titicaca en Perú a 3800 metros sobre el nivel del mar. Su ubicación es en la cordillera de los Andes de América del Sur, donde el número y la diversidad de especies cultivadas y silvestres de papa son muy alto.

Por su valor nutritivo, este cultivo aporta en 100 gramos de papa fresca un 78.0% de humedad, 2.1% de proteína, 18.5% de almidón, 1.0% de cenizas y 0.1% de grasas. Además, contiene minerales (560.0 mg de potasio, 50.0 mg de fósforo, 9.0 mg de calcio, 7.0 mg de sodio y 0.8 mg de hierro) y vitaminas (0.1 mg de Tiamina, 0.04 mg de Riboflavina, 20.0 mg de vitamina C y 1.5 mg de Niacina), lo cual coloca a la papa como uno de los cultivos estratégicos más importantes para contribuir a solucionar los problemas del hambre en el mundo (Castro *et al.*, 2012).

La papa se cultiva fundamentalmente en las regiones templadas, donde actualmente se concentra más del 90% de la producción mundial (Rojas, 1996) y muy poco en las regiones tropicales húmedas debido a su propensión a ser infestada por numerosos organismos patógenos y plaga; así como a la dificultad de conservación de los tubérculos (Estévez, 2005). Sin embargo, presenta una amplia capacidad de adaptación a condiciones variables de clima y suelo. Por esta causa se planta en más de 130 países y ocupa aproximadamente el 40% del área cultivada a nivel mundial (FAO, 1998).

En la actualidad la producción mundial anual suma 300 millones de toneladas y cubre 18 millones de hectáreas (Castro *et al.*, 2012). Se estima que el valor de la producción mundial de este alimento es de nueve millones de dólares. Durante los años sesenta los países en desarrollo contribuían con el 11% de la producción mundial y cuarenta años después han aumentado su contribución hasta el 52%. Como consecuencia este

cultivo se está convirtiendo en una fuente cada vez más importante de alimento, empleo rural y de ingreso para la creciente población de los países en desarrollo (Castro *et al.*, 2012).

Su introducción en Cuba fue a finales del siglo XVIII y en 1920 se produjo un verdadero auge debido al establecimiento de aranceles a la importación. Comenzó a ser plantada en Pinar del Río, Matanzas, Camagüey y en Guantánamo. Actualmente, la papa se produce prácticamente a nivel del mar, que se concentra en la región occidental de la Isla con el 55% (ALAP, 2000) en áreas llanas y en una sola época del año, o sea, de noviembre a abril, con temperaturas frescas (media mínima de 17.7°C), poca ocurrencia de lluvias (media de 56.5 mm) y humedad relativa del aire de 78.6%.

En Cuba se emplean variedades comerciales foráneas mayormente holandesas y se trabaja en el desarrollo de variedades cubanas (Estévez, 1996). Actualmente se cuenta con un grupo de variedades cubanas producto del Programa de mejoramiento genético del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (Estévez *et al.*, 2007).

En este sentido, la producción de plantas *in vitro* y microtubérculos mediante técnicas biotecnológicas se han convertido en una de las vías para la producción de semilla libres de patógenos de este importante tubérculo. Las plantas cultivadas *in vitro* son utilizados para la producción de los minitubérculos en casas de cultivo, lo cual garantiza la uniformidad, calidad genética y sanitaria de la semilla, así como obtener un elevado número de minituberización en un espacio relativamente pequeño. Sin embargo, se conoce que existe una respuesta diferencial de los tejidos vegetales al cultivo *in vitro*, la cual se atribuye a la influencia del genotipo.

Como el Programa de producción de semilla biotecnológica de papa comprende la multiplicación de diferentes variedades cubanas adaptados a las condiciones climáticas y con resistencia o tolerancia a las principales enfermedades del cultivo. Es por ello, que se requiere determinar la eficiencia en el crecimiento durante la propagación *in vitro* y obtención de minitubérculos en casa de cultivo porque posibilitará el ajuste en los protocolos de propagación y el manejo adecuado de las variedades en la producción de semilla.

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente descritos nos formulamos la siguiente hipótesis:

***Mediante la determinación de la respuesta *in vitro* y en casa de cultivo de genotipos cubanos de papa, se podrá determinar su potencial productivo en la obtención de semilla original.***

Para satisfacer esta hipótesis se propusieron los siguientes objetivos:

**Objetivo general:** Determinar la respuesta *in vitro* y en casa de cultivo de genotipos cubanos de papa (*Solanum Tuberosum* L.) para conocer su potencial productivo en la obtención de semilla original.

**Objetivos específicos:**

1. Determinar la respuesta durante el establecimiento y multiplicación *in vitro* de genotipos cubanos de papa.
2. Determinar la respuesta de genotipos cubanos de papa en la formación de minitubérculos en casa de cultivo.

# *Revisión Bibliográfica*

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 La papa. Generalidades

#### 2.1.1 Origen y distribución

La papa (*Solanum tuberosum* L.) fue domesticada por los ancestros de los agricultores andinos y fue cultivada, por lo menos, desde hace más de 7000 años (Huamán, 2007). De acuerdo con la distribución de las primeras papas cultivadas que se conoce y de las especies silvestres más afines, parece probable que el cultivo de este tubérculo se iniciara en la región del Lago Titicaca, entre 3.500 y 4.500 metros sobre el nivel del mar. Es además, en esta región, donde se encuentra una mayor variación en sus formas cultivadas y especies silvestres correspondientes (Tapia, 1993).

Con el paso del tiempo el hombre andino obtuvo cientos de variedades, extendiendo el cultivo de la papa por casi toda la región andina, ocupando las regiones altas de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile (Hawkes, 1978). En esta época coincidió con la llegada de los españoles a Sudamérica quienes la introdujeron en Europa a finales del siglo XVI, siendo dispersada posteriormente por todo el mundo debido al intercambio comercial, constituyéndose así en un alimento muy importante para la dieta humana (Borba, 2008).

Aunque la papa es un alimento barato, sabroso, fácil de cultivar, de muchas aplicaciones y nutritivos, los europeos fueron lentos en adoptarla como alimento común, pues la gente se consideraron es tóxica e insalubre (Adams, 1981). Fue con las guerras napoleónicas (1805-1815) que se aceptó este cultivo como un alimento. En esa época, las papas cultivadas eran selecciones de los tipos andígena tradicionales (*Solanum tuberosum* subesp. *andígena*) introducidos por los españoles, por lo que tenían una base genética muy reducida (GRAIN, 2001)

Históricamente se ha discutido de forma amplia acerca de la especie o especies que dio (dieron) origen a la papa cultivada entre 6.000 y 10.000 años atrás, en los Andes del sur de Perú. Teniendo en cuenta los rasgos morfológicos y fitogeográficos; a partir de las especies silvestres *Solanum bukasovii*, *S. canasense* y *S. multissectum*, pertenecientes al complejo *S. brevicaulis*, se cree que se originó *S. stenotomum*, que es considerada la primera papa domesticada. Esta, a su vez, habría dado origen a *S. andígena* a través de repetidos procesos de poliploidización sexual en diferentes

zonas de cultivo, con la consiguiente hibridación interespecífica e intervarietal que permitió ampliar la diversidad y adaptabilidad genética de la papa de los Andes (Rodríguez, 2010). De esta manera culturas precolombinas de los Andes Centrales habían legado este material genético palpitante llamado papa a la agricultura mundial.

### **2.1.2 Descripción botánica, diversidad genética**

La papa es una planta suculenta, herbácea y anual por su parte aérea, y perenne por sus tubérculos (tallos subterráneos) que se desarrollan al final de los estolones que nacen del tallo principal (Harris, 1978). Dicha parte aérea muere al final de cada estación de crecimiento, perviviendo la planta por medio de los tubérculos que se desarrollan bajo tierra.

Las hojas adultas son pinnadas-compuestas, pero las hojas primarias de plántulas así como también las primeras hojas provenientes del tubérculo, pueden ser simples. Las hojas están provistas de pelos de diversos tipos, los cuales también se encuentran presentes en las demás partes aéreas de la planta. Hay una gran variabilidad en la forma de las hojas entre las muchas especies y variedades de papa (Dean *et al.*, 1977).

Las flores son pentámeras de colores diversos; tienen estilo y estigma simple y ovario bilocular. El polen es típicamente de dispersión por el viento. La autopolinización se realiza en forma natural, siendo relativamente rara la polinización cruzada en los tetraploides y cuando esto sucede, probablemente los insectos son los responsables. Los diploides son con muy pocas excepciones autoincompatibles (Harris, 1978).

El fruto de la planta de la papa es una baya, globosa, cónica u ovoide, en el interior de la cual se encuentran las semillas que, normalmente y bajo condiciones adecuadas, tienen capacidad para germinar y dar lugar a nuevas plantas de papa. El número de semillas por fruto puede variar desde cero (nada) hasta 400 (Egúsquiza, 2000).

Además de los tallos aéreos, la planta de la papa tiene un sistema de tallos subterráneos formados por estolones y tubérculos. Los primeros son de pequeño grosor y crecen de forma más o menos horizontal. Bajo determinadas condiciones, en el extremo de los estolones se produce un engrosamiento que da lugar a los tubérculos (papas), órganos de almacenamiento (Egúsquiza, 2000) donde se acumula

en torno al 75-85 % del total de materia seca producida por la planta (Cutter, 1978). La forma, textura, color de la piel y el color de la carne, son características que varían grandemente entre los tubérculos correspondientes a diferentes variedades cultivadas (Borba, 2008).). Un tubérculo, por tanto, no es otra cosa que un tallo modificado para funcionar como una reserva de almacenamiento masivo de una serie de macromoléculas, principalmente almidón y proteína (Castro *et al.*, 2012)

La papa cultivada conocida colectivamente bajo el nombre de *S. tuberosum* L., posee un rico pool de genes, constituido por 190 especies silvestres que forman tubérculos (Spooner *et al.*, 2006). Es una planta genética y taxonómicamente compleja, donde se presenta una serie de ploidias que fluctúan desde especies diploides con 24 cromosomas ( $2n=2x=24$ ), triploides ( $2n = 3x = 36$ ), tetraploides ( $2n = 4x = 48$ ) hasta especies pentaploide ( $2n=5x=60$ ). Aproximadamente un 70% de las especies son diploides, la mayoría de los restantes son tetraploides ( $2n = 6x = 72$ ), con un número reducido de triploides y pentaploides. (Hijmans *et al.*, 2001).

El potencial genético de las especies silvestres de *Solanum*, especialmente el del Perú, Bolivia y Ecuador, es muy grande y se presentan en diferentes hábitat, desde ambientes muy fríos y sujetos a heladas en la sierra Andina, hasta condiciones muy secas de semi-desierto, lo cual muestra la manera en que estas especies se han adaptado al estrés abiótico y han desarrollado resistencias a un gran número de plagas y enfermedades (Hijmans *et al.*, 2003). Estas especies contienen un caudal de genes o alelos útiles que pueden ser transferidos a las especies cultivadas de papa mediante métodos convencionales de mejoramiento genético a corto y largo plazo así como mediante la biotecnología molecular e ingeniería genética.

Pero durante los últimos años, los cambios de hábitos de vida y alimentación están influyendo negativamente en la conservación de la diversidad genética de las especies silvestres de papa.( Ministerio de agricultura de Perú, 2003 )

### **2.1.3 Taxonomía de la Papa**

Actualmente, la taxonomía de las especies silvestres y cultivadas de papa sigue siendo muy complicada, ya que usualmente muchas especies de papa presentan una apariencia muy diferente, pero mantienen la capacidad para hibridarse de forma

natural cuando se encuentran en contacto, lo que genera alta variabilidad y hace difícil determinar los límites entre especies (Spooner *et al.*, 2006).

Aunque existe un gran número de especies de papa alrededor del mundo, en la producción comercial se emplean principalmente las dos subespecies de *S. tuberosum* (Huamán, 2007): la andígena (adaptada a condiciones de días cortos, cultivada principalmente en los Andes), y *tuberosum* (que se cultiva en todo el mundo, adaptada a días más largos) (Rodríguez *et al.*, 2009)

De acuerdo a Hawkes (1990), taxonomía del cultivo es la siguiente:

Tipo: Spermatophyta

Clase: Angiospermas

Subclase: Dicotiledonea

Orden: Tubbiflorae

Familia: Solanaceae

Género: Solanum

Especie: *S. tuberosum*

Subespecies: *andigenum*, *tuberosum*

## **2.2 Importancia económica del cultivo**

La papa es el cuarto cultivo en importancia a nivel mundial después del trigo, el arroz y el maíz y su producción anual representa el 50% de la producción mundial de todas las raíces y tubérculos (Recabarren, 2010). Su principal importancia económica radica en la elevada capacidad para producir energía por unidad de superficie, es tres veces mayor que en los cereales, lo que permite suplir de alimento a un elevado número de personas. Además, posee múltiples posibilidades de consumo, como alimento directo para el ganado o como materia prima en la industria (López *et al.*, 1995).

Este cultivo se planta en más de 130 países (FAOSTAT, 2008) donde habitan las tres cuartas partes de la población mundial. Ocupa el primer lugar dentro de los vegetales

que más se consumen, por su contribución a la dieta humana en calorías, vitaminas, proteínas y sales minerales; además de contener otras sustancias como los aminoácidos lisina y cisteína, el ácido pantoténico, el zinc, potasio y el cobre, deficientes en la mayoría de los productos agrícolas (Struik *et al.*, 2006).

Los primeros datos acerca de la introducción de la papa en Cuba aparecen en una comunicación presentada el 7 de febrero de 1778 al Real Consulado Español a través de la Junta de Fomento de la Isla de Cuba. El contenido exponía la imposibilidad de obtener semillas de la misma calidad que las que se importaban de Canadá, Estados Unidos e Islas Canarias, así como la inexistencia de un modo adecuado de conservar los tubérculos producidos en el país (Estévez, 2005). A partir de ese momento, se desarrolló el cultivo de la papa por todo el país; siendo las provincias de La Habana, Matanzas y Ciego de Ávila las de mayor área plantada en la actualidad (Manso, 2009).

En Cuba, todos los años se cultivan aproximadamente 10 000 ha, las cuales se plantan con tubérculos-semilla certificada de alta calidad procedentes de Europa y Canadá (Salomón *et al.*, 2010). En los últimos años los rendimientos por área de Cuba están por encima de la media mundial; solo superada por Oceanía, Norte y Centroamérica, en este último dado por los rendimientos de EE.UU (Estévez *et al.*, 2007).

### **2.3 Descripción de las variedades cubanas en estudio**

El Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) desarrolla, desde hace casi tres décadas, un programa nacional de mejoramiento genético de papa desde 1985; dicho programa se basa fundamentalmente en el cruzamiento entre variedades cultivadas, las cuales se encuentran a disposición de todos los productores de papa del país. De esta forma, se puede incrementar sustancialmente la estrategia varietal en este importante cultivo.

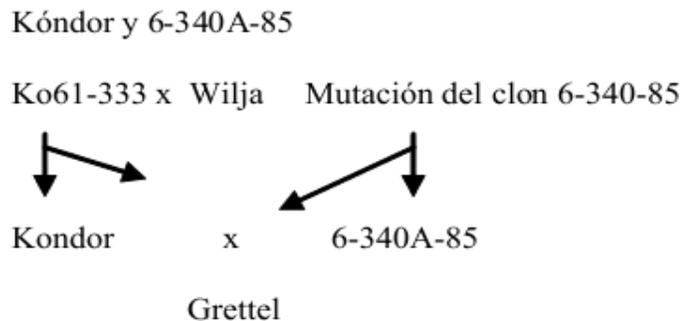
#### **2.3.1 Variedad Grettel**

Características agrícolas: La piel de sus tubérculos es de color amarillo, al igual que su masa y su forma es oval-oblonga, presenta a su vez ojos de profundidad media. Los tubérculos por plantón están entre 10 y 15. Se caracteriza por presentar un buen contenido de masa seca, que oscila entre 18.6 y 20 %, lo que la hace adecuada para

el procesamiento industrial. El peso específico de sus tubérculos es de 1.079. Su ciclo vegetativo es de 80 días, por lo que se considera temprana. En condiciones experimentales, su potencial de rendimiento ha alcanzado las 47 t.ha<sup>-1</sup> y su rendimiento medio en diversas condiciones ambientales supera las 30 t.ha<sup>-1</sup>. Es tolerante al tizón temprano (grado cinco en la escala) y no ha presentado afectaciones para el virus del enrollamiento de la hoja (PLRV). Presenta muy buenas características para el almacenamiento en frío (Castillo *et al.*, 2006).

Características morfológicas: Planta compacta de hojas abiertas y con cuatro folíolos simétricos. Alcanza una longitud del tallo superior a los 45 cm y puede llegar a los 60 cm. Presenta entre tres y cinco tallos por plantón, lo que permite un cierre de campo a los 35 días de plantada (Castillo *et al.*, 2006).

## PARENTALES Y PEDIGREE



Representación esquemática del origen genético de la variedad Grettel, extraído del Informe de nuevas variedades (Castillo *et al.*, 2006).

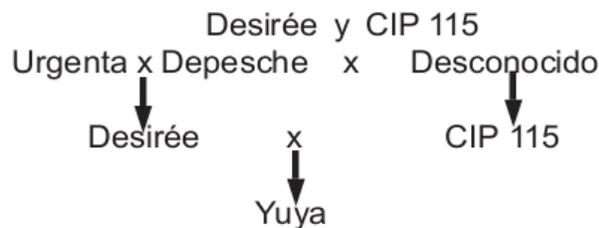
### 2.3.2 Variedad Yuya

Características agrícolas: La piel y la masa del tubérculo son de color amarillo, los que se caracterizan por tener gran tamaño, forma oval-oblonga y con ojos superficiales. La mayor parte de su producción es comercial y los rendimientos potenciales superan las 36 t.ha<sup>-1</sup> en condiciones de producción. Presenta tolerancia al hongo *Alternaria solani* y al virus del enrollamiento de la hoja (PLRV); además, es medianamente resistente a la sarna común (*Streptomyces scabies*). El contenido de masa seca supera el 18 % y en las pruebas organolépticas (color, olor, sabor, sabor y consistencia) ha obtenido

altos valores, por lo que se sugiere como una variedad para ambos pro-pósitos: consumo fresco y procesamiento industrial (Hernández *et al*, 2011).

Características morfológicas: planta de hojas abiertas con cuatro folíolos asimétricos; no presenta antocianina en el tallo y este puede alcanzar una longitud entre los 35 y 40 cm. Se distingue porque posee más de cinco tallos por plantón, lo que permite un buen cierre de campo a los 35 días de plantada. Tiene una floración abundante, con flores de color blanco (Hernández *et al*, 2011).

### PARENTALES Y PEDIGREE

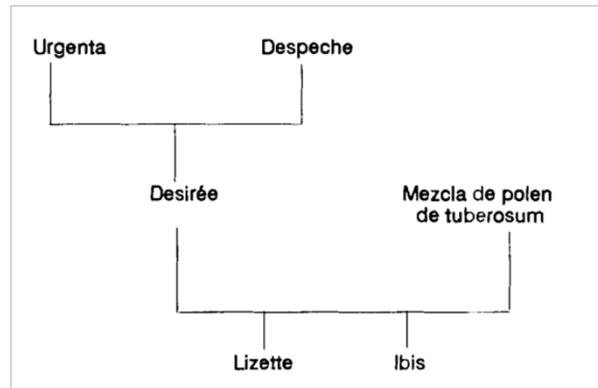


Representación esquemática del origen genético de la variedad Yuya, extraído del Informe de nuevas variedades (Castillo *et al.*, 2011).

#### 2.3.3 Variedad Ibis

Características agrícolas: tubérculos con la piel de color amarillo y masa amarilla, de forma oblongo alargado y ojos superficiales; masa promedio de los tubérculos entre 90- 100g; presenta buena aptitud a la conservación en cámara refrigerada y el contenido de materia seca de los tubérculos es de 16.6 %. Los atributos organolépticos, aroma, sabor y color tanto para la papa hervida como frita a la inglesa y francesa son satisfactorios. Posee rendimientos potenciales de 52 t.ha<sup>-1</sup> y el rendimiento medio de 10 años es de 35 t.ha<sup>-1</sup>. Presenta buen comportamiento en campo ante *A. solani* y virus (Estévez *et al*, 1998).

Características morfológicas: plantas erectas de color verde claro, tallos vigorosos. Su siembra es factible a 90 x 25 cm, con un ciclo entre 85- 95 días. El sistema de siembra y las atenciones culturales se pueden realizar según el instructivo técnico para el cultivo. Se recomienda su plantación en las épocas temprana y óptima de septiembre y noviembre-diciembre, respectivamente.



Representación esquemática del origen genético de la variedad Ibis, extraído del Informe de nuevas variedades (Estevéz *et al.*, 1998).

#### 2.4. Empleo de métodos biotecnológicos en apoyo de los Programas de Semilla

Se considera una semilla de papa es de buena calidad, cuando se encuentra libre de plagas y enfermedades, esta fisiológicamente madura y apta para la siembra; posee tubérculos sanos sin deformaciones ni pudriciones y tiene brotes sanos, vigorosos y preferiblemente verdeados. Sembrar tubérculos con las características anteriores asegura una germinación rápida y uniforme del cultivo, obteniéndose buenos rendimientos de cosecha (Manso, 2004).

La principal dificultad que presenta esta especie es la susceptibilidad a diferentes virus, los cuales pueden encontrarse en los tejidos sin manifestar sintomatología y diseminarse durante los procesos de propagación *in vitro*. Por lo tanto, es muy importante la selección de las plantas en campo, su diagnóstico previo a la introducción al laboratorio y el establecimiento de la técnica de saneamiento a utilizar ante la presencia de los mismos (Águila *et al.*, 2001).

El cultivo de meristemo *in vitro* como técnica de saneamiento para obtener plantas y semillas libres de enfermedades, especialmente de virus, se basa en una distribución viral desuniforme dentro del vegetal y su concentración tiende a disminuir hacia el meristemo apical del tallo debido a la ausencia de tejidos vasculares en la proximidad del meristemo apical y presencia de conexiones plasmodesomáticas pequeñas en las estas células apicales (Roca *et al.*, 1982).

Descubrimiento del sistema de cultivo de tejidos para la producción de plántula *in vitro* libre de enfermedades, seguido de producción de minitubérculos en invernadero se han podido rescatar variedades de papa que en algún tiempo fueron muy buenas y que por enfermedades han caído en desuso. (Valdés, 1998).

## **2.5. Micropropagación**

### **2.5.1. Producción de plántulas *in vitro***

Actualmente, la propagación de la papa usando la técnica de cultivo de tejidos para obtener miles de plántulas *in vitro* libres de enfermedades, para su posterior siembra bajo invernadero, es fundamental para la producción de minitubérculos los cuales son la base para la producción moderna de tubérculo semilla de papa que son aptas para la siembra. Las plántulas sanas *in vitro* pueden obtenerse por medio de los métodos de extracción de meristemos, quimioterapia, electroterapia y termoterapia (Valdés, 1995).

#### **2.5.1.1. Fase de establecimiento**

Para la obtención de las primeras plantas *in vitro* sanas, se toman como explantes ápices de las yemas apicales y axilares de una planta visualmente sana o de los brotes de un tubérculo visualmente sano. Los ápices son cuidadosamente lavados y desinfectados en hipoclorito de sodio al 2% para luego enjuagar con agua estéril y sembrarlos en tubos de ensayo u otros contenedores con el medio MS de cultivo, previamente esterilizado. Este trabajo se lleva a cabo bajo condiciones asépticas, lográndose esto en un ambiente que ha sido previamente aseado y desinfectado con hipoclorito de sodio (NaClO) al (0.05%) o alcohol al 6%, efectuándose la siembra de los ápices en el medio, en una campana de flujo laminar (CIP, 1997).

Para obtener estas yemas apicales, los tubérculos deben exponer alternativamente varios días a la oscuridad y varios días a la luz difusa, hasta que el brote se torne verde y tanto su longitud como la distancia entre los nudos facilitan el corte de los brotes (Bryan *et al.*, 1981).

Según García y Noa (1998), si el objetivo es la obtención de plantas libres de patógenos sistémico es necesario la utilización de meristemos iniciales menores de 0.2 mm, pero si por el contrario solamente se requiere de la multiplicación y no hay

peligro de diseminación de enfermedades o se parte de plantas sanas, se pueden utilizar ápices de mayor tamaño con un mayor porcentaje de regeneración.

### **2.5.1.2. Fase de multiplicación *in vitro***

Una vez establecido el explante, los ápices inician rápidamente la brotación y en dos a cuatro semanas se obtiene una planta *in vitro* con seis o siete nudos (Espinosa *et al.*, 1992).

Las plántulas *in vitro* que se obtienen, se pueden o no someter a multiplicación *in vitro* en un medio con algún antiviral por una o dos generaciones, para luego mediante la prueba ELISA verificar que ninguna planta esté contagiada de virus (Valdés, 1998). Una vez que se asegura el 100% de sanidad de vitroplantas, son seccionadas en microestacas con una o dos yemas para ser transferidas nuevamente a recipientes con medio de cultivo MS estéril y así sucesivamente para incrementar la cantidad de plantas *in vitro* hasta obtener un total preestablecido (Espinosa *et al.*, 1992). Como una regla general es recomendable no subcultivar por más de diez veces a partir del mismo explante, dado que algunos autores han observado que se puede presentar variación somaclonal, esto es, pueden obtenerse plantas *in vitro* las cuales presenten un genotipo diferente al de la planta original o planta donadora del explante, que es la que se desea micropropagar (Suttle, 2007).

### **2.5.1.3. Fase de aclimatización de las vitroplantas**

Las plántulas sanas de papa *in vitro* para producción de minitubérculos en ambiente protegido, se obtienen en un período de crecimiento de alrededor de cuatro semanas partiendo de la continua multiplicación en tubos de ensayo, frascos de vidrio o cajas magenta, siendo transferidas al final de su crecimiento *in vitro*, directamente al suelo o a bolsas o cajas de plástico con un sustrato estéril, generalmente es utilizado el musgo asfángico o composta mixta, bajo ambientes protegidos como son desde invernaderos sofisticados con control ambiental, invernaderos con mallas ó microtúnel con tela antiáfidos en clima favorable. Para un trasplante, las plantas *in vitro* deben tomarse con cuidado para evitar daños a las raíces, eliminar con agua limpia el resto del medio nutritivo artificial y al trasplante asegurar un buen contacto entre raíces y el sustrato de siembra (CIP 1997).

Las plantas *in vitro* para trasplante directo en invernadero, deben ser de 3.5 a 4.5 cm de altura, deben tener al menos tres entrenudos, tres o cuatro pares de hojas y su ápice. En general y dependiendo de la variedad, las plantas más funcionales son las que tienen las hojas más anchas y el tono de verde es más oscuro y raicillas en cada nudo (Gálvez *et al.*, 1997).

En esta etapa se puede evaluar los criterios de eficiencia y productividad del análisis de crecimiento y determinar los índices de eficiencia de crecimiento que mejor reflejen el potencial de rendimiento (Fernando *et al.*, 2000), lo cual brinda información más precisa de la eficiencia con que las plantas acumulan y traslocan fotosintetizados, que la sola medición de características agronómicas como número de tallos, altura, cobertura.

El análisis de crecimiento ha sido ampliamente usado para estudiar los factores que influyen en el rendimiento y desarrollo de las plantas como la acumulación de fotoasimilados netos en el tiempo (Gardner *et al.* 1985). Varios autores como Radford, 1967; Hunt, 1981 y Beadle, 1988, se han realizado intentos para expresar la producción en términos de crecimiento de papa en esta etapa. Este usa medidas directas, como peso seco, área foliar total y tiempo. Las medidas derivadas son calculadas a partir de las medidas directas y corresponden a la tasa relativa de crecimiento (TRC), tasa de crecimiento absoluto (TAC).

La tasa de crecimiento absoluto (TAC) se permite determinar claramente las variedades que sobresalen por su ganancia de peso en el tiempo mientras la tasa de crecimiento relativo (TCR) representa la capacidad de la planta para producir material nuevo (Hunt, 1982).

La producción de masa seca en la plantas es el resultado neto del balance entre los procesos metabólicos básicos. La masa seca es producida en el proceso fotosintético y los productos se distribuyen y acumulan en diferentes órganos de la planta (Duarte *et al.*, 2005). Aunque la acumulación de materia seca en un vegetal es un proceso que además de los factores internos de la planta, gobernado en este caso específico por el comportamiento de la fotosíntesis y la respiración, depende en gran medida también, de los externos del ambiente (Mompies *et al.*,2012).

Cada vez es mayor la tendencia de los productores de semilla de papa por adoptar un sistema de producción de minitubérculos a partir de vitroplantas libres de virus (Maldonado, 1996) o a partir de los microtubérculos de primera generación producidos por las plántulas *in vitro* procedentes del laboratorio.

## **2.6. Producción de semilla de papa**

La papa se puede propagar sexualmente por las semillas originales o asexualmente por tubérculos-semillas. En la actualidad, esta última vía conocida como reproducción vegetativa es la más utilizada para obtener un elevado número de propágulos en un periodo de tiempo corto (Jiménez-Terry *et al.*, 2010). Generalmente en condiciones de días largos y temperaturas templadas, la mayoría de las variedades de papa florecen y producen frutos que contienen semilla botánica (SB) o sexual. En actualidad la propagación por esta semilla botánica se emplea fundamente con fines de mejoramiento genético. Pero la floración escasa y fertilidad del polen de los genotipos de papa causan una baja producción de bayas y semillas; por tanto, son las principales limitaciones para producir semilla botánica en los diferentes ambientes (Salomón *et al.*, 2010).

En este sentido, la papa generalmente se propaga vegetativamente por tubérculos-semillas o por *vitroplantas* obtenidas por tejido cultivo, lo que asegura la conservación de características varietales durante generaciones sucesivas; aunque puede producir un riesgo de degeneración del cultivo por la acumulación de enfermedades, especialmente virales al emplear el material vegetativo por ciclos repetidos (Dieme *et al.*, 2013). Por esta razón hay que utilizar plantas libres de patógenos a partir de que se pueden propagar rápidamente bajo las condiciones de invernadero (Meléndez *et al.*, 1980).

El valor potencial del cultivo de tejidos *in vitro* en la producción de semilla vegetativa de papa ha sido ampliamente reconocido a nivel mundial. Esta tecnología se emplea en muchos países para obtener semilla libre de patógenos y por el consecuente beneficio para los productores (Naik *et al.*, 2007).

### **2.6.1. Producción de minitubérculos en casas cultivo protegido**

Los minitubérculos son pequeños tubérculos de papa obtenidos después de la aclimatización de plantas cultivadas *in vitro* y plantadas a alta densidad en casas de cultivo, canteros o contenedores donde se usan diferentes mezclas de sustratos.

Además, los microtubérculos de primera generación producidos por las plántulas *in vitro* libres de virus y otras enfermedades procedentes del laboratorio, pueden ser sembrados en las camas de siembra en el invernadero, las cuales producen minitubérculos bajo condiciones de protección y cuidados para evitar el contagio por los insectos vectores (Valdés, 1998).

La primera etapa para la producción de minitubérculos es contar con el apoyo de un laboratorio de cultivo de tejidos donde se obtengan y micropropaguen las plántulas *in vitro* libres de virus para su posterior siembra en el invernadero (Jiménez-Terry, *et al.*, 2013).

Para fines de producción de semilla, a los 70-75 días después de la siembra de estas plántulas procedentes del laboratorio, se realiza la desecación del cultivo utilizando Reglone y evitando utilizar Paraquat para su posterior desvare a los 5 días después, dejando el minitubérculo en la cama durante 20-25 días para una buena suberización, haciéndose la cosecha a los 90 ó 100 días después de la siembra (Valdés *et al.*, 1999).

Después de realizada la cosecha, los minitubérculos se separan en calibres. Los calibres de los minitubérculos se consideran por su tamaño y peso (Alonso, 1996).

### **2.6.2. Tuberización**

Cuando los tallos principales de la planta (los que se originan a partir de los grelos del tubérculo madre) tienen un desarrollo suficiente, la yema apical se diferencia en floral y por lo tanto disminuye la dominancia apical. Las yemas subterráneas del tallo que están más cerca del tubérculo madre brotan originando los estolones. Estos tallos subterráneos crecen en longitud hasta que reciben estímulos para iniciar la tuberización que al iniciarse la tuberización cesa el crecimiento en longitud y se ensancha la región sub-apical del estolón. En el inicio se agranda solamente la región sub-apical de la punta del estolón. El crecimiento involucra solamente un internodio y luego se incorpora un segundo internodio al desarrollo del tubérculo. En este estado, por la considerable expansión radial del tubérculo, el gancho se endereza y la yema

apical del estolón queda situada en la posición terminal del tubérculo joven. El almacenamiento de reservas continúa incorporando nuevos internodios y es claro que los internodios hacia la corona se acortan en la medida que va disminuyendo el ritmo de crecimiento en longitud. La tuberización procede acropetalmente, involucrando alguna extensión longitudinal y una gran expansión transversal de los sucesivos internodios. Esta forma de crecimiento tiene un componente genético que hace que las distintas variedades tengan distinta forma de tubérculos (López *et al.*, 1995).

### **2.6.3. Factores que afectan la producción y calidad de tubérculo-semilla de papa**

La formación de tubérculos (definido como inducción, iniciación, crecimiento y maduración de los tubérculos) es el proceso determinante en la formación de la producción de la semilla de papa y está influenciado por varios factores: como temperatura ambiental (Thornton *et al.*, 1996), la intensidad y duración de la luz (Struik, 2006), genotipo, nutrición mineral (Struik y Wiersema, 1999), disponibilidad de agua y Densidad de plantación.

Las condiciones ambientales, como temperatura y duración del día, influyen marcadamente en la producción y calidad de los tubérculos; la temperatura óptima para el crecimiento y la producción de los tubérculos está entre 15- 25°C durante el día (Borah *et al.*, 1962). Cuando las plantas están en un fotoperiodo de días largos y temperatura ambiental de 16°C, las semillas-tubérculos presentan un alto vigor de crecimiento. Pero una temperatura ambiental de 28°C disminuye el vigor de crecimiento de semillas rápidamente en los días largos que días cortos (Struik, 2006).

Kupers (1985) señala que debe tomarse en cuenta que las plantas de papa necesitan altas cantidades de N y K durante el engrosamiento de los tubérculos y que aparte de las concentraciones de estos elementos en el suelo. La fertilización se relaciona estrechamente con la calidad de la papa, que se expresa en el calibre de los tubérculos, contenido de materia seca, almidón y monosacáridos, y tenores de nitratos, elementos que se afectan por la intensidad, calidad y época de fertilización, especialmente potásica. En este sentido el efecto de la aplicación de fertilizantes debe analizar con cuidado, pues depende de la dosis, de la fertilidad del suelo y del portador (Herrera, 2007).

Durante el crecimiento del tubérculo se debe evitar el exceso de irrigación, pues este inhibe la formación de raíces y causa la formación de costras en el suelo (Bryan *et al*, 1981).

En el momento de la cosecha la semilla debe tener una buena maduración y evitar daños al tubérculo al igual que en la transportación y almacenamiento. La manipulación desde la cosecha hasta la industria debe ser adecuada, para evitar los daños internos.

#### **2.6.4. Ventajas de la utilización de tubérculo-semilla de papa**

La producción comercial de papa en el mundo está casi completamente basada en la propagación vegetativa (tubérculo-semilla). Se plantan los tubérculos y estos producen nuevas plantas y tubérculos con el genotipo idéntico al de la planta madre (Salomón *et al.*, 2007).

El empleo de semillas vegetativas en la propagación de papa tiene ventajas con respecto a la semilla sexual ya que son menos vulnerable a las enfermedades bióticas y abióticas por su crecimiento inicial rápido y vigoroso, se presenta mayor rendimiento, se requiere menos labores en su etapa inicial, período vegetativo más corto comparado y presentan un menor porcentaje de tubérculos pequeños (Salomón *et al.*, 2007).

Una de las ventajas del uso de minitubérculos es que le permite al productor reducir los costos de producción del tubérculo semilla de papa, porque prácticamente se elimina todo el saneo de campo y desde el principio se está seguro de que las papas que se siembran son completamente sanas; además, permite al productor incrementar sus rendimientos en un 25% en lo que se refiere a papas de tamaño para semilla (Maldonado, 1996).

Los minitubérculos pueden producirse durante todo el año siempre que las casas de cultivo cuenten con condiciones para ello y son principalmente utilizados para la producción de semilla prebásica o básica por siembra directa en campo (Lommen, 1999, Ritter *et al.*, 2001).

Con el uso de minitubérculos en un programa de semilla puede reducirse el número de multiplicaciones en campo y el tiempo necesario para obtener volúmenes adecuados de semilla de un cultivar (Lommen y Struik, 1992; 1994).

## **2.7. Producción de semilla de papa en Cuba**

En Cuba la papa se cultiva principalmente en las zonas occidental y central del país y en menor medida en la oriental, fundamentalmente en la época de seca (noviembre-diciembre), cuando las temperaturas son más bajas; invirtiéndose cada año más de 10 millones de dólares en la compra de semilla a Holanda y Canadá (Estévez, 1996) con el riesgo de que se introduzcan agentes patógenos, insectos y otros microorganismos que existen inevitablemente en toda importación de grandes volúmenes de materiales de siembra (Pérez, 1998).

Precisamente por estas razones, desde hace varios años, instituciones científicas y productivas nacionales, vienen desarrollando ingentes esfuerzos por implementar un programa integral de producción nacional de semilla de papa (Jiménez-Terry, 2006).

En Cuba, en 1959, se contaba en la producción papera con muy pocas variedades; a partir de 1964 se iniciaron trabajos de evaluación de variedades procedentes de diferentes países, con el objetivo de ampliar la estructura varietal (Estévez *et al.*, 2007).

La producción de papa en Cuba es altamente costosa debido a su alto gasto pues casi el 40 % de la semilla es importada de Canadá y Holanda, solamente en compra de tubérculos- semillas se invierten 11 millones de dólares al año (Agramonte, 2010).

*Materiales y Métodos*

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Los experimentos que se desarrollaron durante el proceso *in vitro* y de aclimatización de las plantas fueron realizados en el Instituto de Biotecnología de las Planta perteneciente a la Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, en período comprendido entre septiembre de 2013 y febrero de 2015.

#### **Procedimientos generales**

##### **Material vegetal**

Como material vegetal se utilizaron cuatro variedades cubanas de papa obtenidas del programa de mejoramiento genético del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Las variedades se identificaron con los nombres de Yuya, Marinca, Grettel e Ibis.

Para iniciar el proceso de propagación *in vitro* fueron seleccionadas en campo tres plantas de cada variedad, las cuales se diagnosticaron para la detección de la bacteria *Ralstonia solanacearum* con antisueros producidos y estandarizados por el centro Nacional de sanidad Agropecuaria (CENSA). Además se efectuó el análisis de los virus PVX, PLRV, PVM, PVS y PVA mediante la técnica de ELISA-DAS y el diagnóstico del PVY mediante la técnica de UMELISA-DAS. Para ambas técnicas se emplearon los antisueros de la AGDIA (USA).

Los tubérculos de las plantas negativas fueron lavados con detergente comercial y abundante agua. Luego se colocaron en bandejas plásticas en condiciones de oscuridad total para estimular la brotación de las yemas o grelos, los cuales constituyen el material vegetal inicial para la propagación *in vitro* mediante la tecnología de producción de semilla de papa desarrollada por investigadores del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP, 2005).

##### **Medio de cultivo**

La propagación *in vitro* de las planta se desarrolló en medio de cultivo semisólido, con la utilización de 2.5 g l<sup>-1</sup> de Gelrite® (DUCHEFA). En la fase de establecimiento los meristemos se colocaron en medio de cultivo compuesto por el 100% de las sales y

vitaminas de Murashige y Skoog (1962), 20 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y 100 mg l<sup>-1</sup> de mioinositol y se utilizaron tubos de ensayos de tamaño 15.0cm x 2.0cm con 10 ml de medio de cultivo. Para la fase de multiplicación, los explantes se colocaron en medio de cultivo compuesto por el 100% de las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962), 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y 100 mg l<sup>-1</sup> de mioinositol y se utilizó frascos plásticos de 500 ml de capacidad total con 60ml de medio de cultivo. Todos los medios de cultivo se esterilizaron químicamente con la adición de 114 mg l<sup>-1</sup> de Vitrofur® y su pH se ajustó a 5.7 previo a la esterilización.

### **Condiciones de cultivo**

El material vegetal se colocó en cámaras de crecimiento de iluminación artificial con fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Se utilizaron lámparas con tubos fluorescentes blancos (PHILIPS TLD, 58 W/84) con intensidad lumínica de 37.5-43.7  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La temperatura de cultivo fue de 20  $\pm$ 2°C y humedad relativa osciló entre 60.0 y 70.0%.

### **Instrumental**

La desinfección de las pinzas y bisturíes utilizados en la propagación del material vegetal se realizó siguiendo la metodología propuesta por Agramonte *et al.*, (1993) y los platos metálicos usados en esa operación fueron esterilizados en la estufa a 180°C durante dos horas.

### **Análisis estadístico**

El procesamiento estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 21; para ambiente del sistema operativo Windows de Microsoft®. Como procedimiento común para todas las variables, se efectuó la comprobación de los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas. Las pruebas se efectuaron con un nivel de significación de 0,05.

### **Experimentos realizados**

Se desarrollaron dos experimentos durante el proceso de propagación *in vitro*, los cuales se enmarcaron en la fase de establecimiento o iniciación de meristemas y en la

fase de multiplicación de las plantas. Posteriormente, se efectuó un tercer experimento en condiciones *ex vitro* en casa de cultivo protegido.

### 3.1 Efecto del genotipo en el establecimiento o iniciación *in vitro* de los meristemas papa

El experimento se inició con la desinfección de los brotes o grelos de los tubérculos correspondientes a cada variedad objeto de estudio. Los brotes de aproximadamente 2.0 cm de longitud fueron separados de los tubérculos y colocados en frascos de vidrio de 250 ml de capacidad total (Figura 1 a b). Su desinfección superficial se realizó con una solución de etanol al 70.0% durante dos minutos. Seguidamente, se adicionó una solución de hipoclorito al 1,0% durante 10 minutos y se continuó con tres lavados sucesivos con agua destilada estéril.



Figura 1. Proceso de desinfección de los brotes de los tubérculos (a y b) y extracción de los meristemas de papa (c).

La extracción de los meristemáticos se realizó en la cabina de flujo laminar con el empleo de un microscopio estereoscópico y la ayuda de pinzas y bisturí número 11 (Figura 1 c). Para su extracción las hojas se separaron hasta observar el ápice meristemático constituido por tres primordiales foliares y un tamaño aproximado de 0,3-0,5 mm. La medición se efectuó con una escala milimétrica colocada en el ocular del microscopio estereoscópico.

A los 40 días de cultivo, se evaluó el porcentaje de supervivencia de los meristemas y la presencia de contaminación microbiana en el medio cultivo. Además, a los 60 días de cultivo se realizó una caracterización de su aspecto morfológico con la identificación

de plantas morfológicamente adecuadas para continuar el proceso de propagación *in vitro*. Las plantas morfológicamente adecuadas presentaron una coloración verde oscuro, tallo con una longitud entre 2.5 y 4.5 cm, definición de los entrenudos con presencia de hojas y raíces. Los datos correspondientes al porcentaje de supervivencia se compararon mediante la prueba *Mann-Whitney*.

### 3.2 Caracterización de las plantas durante la fase de la multiplicación

Las plantas obtenidas *in vitro* en el experimento anterior fueron transferidas a medio de cultivo de multiplicación. Para ello, se separó la yema apical de la planta y el resto se seccionó en segmentos de aproximadamente 1,0 cm de longitud que incluían una yema axilar (Figura 2).

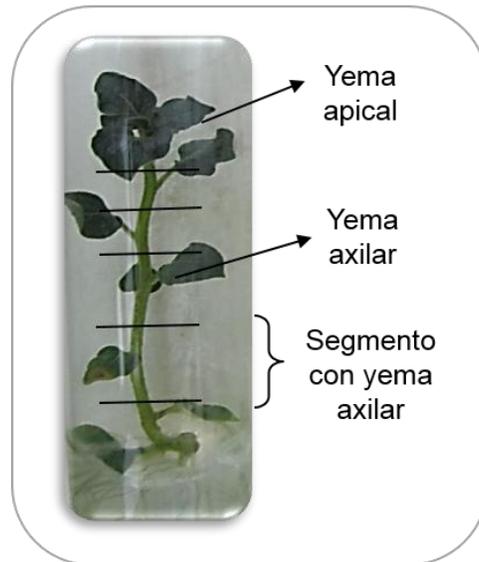


Figura 2. Representación esquemática de las secciones realizadas a las plantas durante el procedimiento de multiplicación.

A los 21 días de cultivo se realizó transferencia a medio de cultivo fresco y se colocaron 20 explantes por frasco de tipo magenta de 500 ml de capacidad total con 60ml de medio de cultivo. Se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado, donde se establecieron 20 réplicas (frasco) por cada tratamiento. Después de tres subcultivos se evaluó el coeficiente de multiplicación de las diferentes variedades a través de la siguiente expresión matemática: Coeficiente de multiplicación= número de explante final/ número de explante inicial. Además, se

describió el aspecto morfológico de las plantas como; la altura, coloración de las hojas, y la formación de entrenudos durante esta fase. Los datos correspondientes al coeficiente de multiplicación se compararon mediante la prueba paramétrica de Dunnett C.

### 3.3 Evaluación de las plantas en casa de cultivo

Las plantas obtenidas *in vitro* presentaban en el momento de la plantación de 6.5 a 7.0 cm de altura, de cuatro a cinco hojas y un sistema radical desarrollado (Figura 3 a).

#### Condiciones de cultivo

El experimento se desarrolló en una casa de cultivo cubierta de tela antiáfidos en cantero de 15.0m de longitud, 1.0m de ancho y 0.8m de profundidad, en un sustrato a base materia orgánica que se obtuvo a partir de cachaza descompuesta durante 12 meses. Se plantaron 200 plantas de cada variedad y se conformaron cuatro parcelas de 3.0 m de longitud con un diseño completamente aleatorizado. La distancia de plantación utilizada fue de 10x10cm entre planta e hileras, respectivamente. La plantación se realizó de forma manual a una profundidad de 2.0 cm (Figura 3 b).

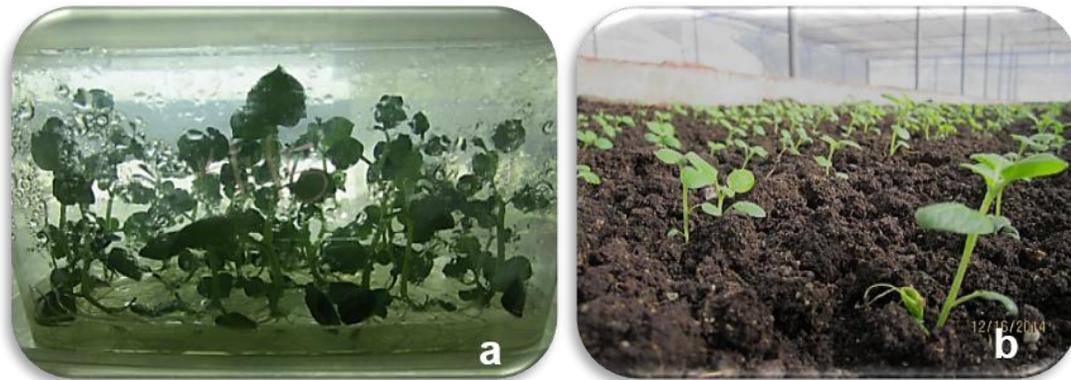


Figura 3. Plantas de papa obtenidas por cultivo *in vitro* de la variedad Ibis a los 21 días de cultivo (a). Plantas en condiciones *ex vitro* sobre sustrato de materia orgánica (b).

Se efectuaron las labores agrotécnicas y fitosanitarias establecidas en el Instructivo técnico para la producción de papa en Cuba (MINAG, 2012). Se implantaron las condiciones requeridas para el riego por microaspersión con caudal de 35 l.h<sup>-1</sup> con dos

bares de presión y norma de 20.46m<sup>3</sup> por hora de riego para 0.046 ha. Los primeros 15 días la frecuencia de riego fue tres veces al día con una duración de tres minutos. Hasta los 30 días de cultivo el riego se efectuó dos veces al día y a partir de este momento y hasta la suspensión para la cosecha se realizó un riego diario durante tres minutos.

Durante el ciclo del cultivo la humedad relativa promedio fue de 62.0%, mientras que la temperatura promedio durante el día fue de 25±2 °C y la mínima nocturna de 12±2 °C. La radiación varió de acuerdo a las condiciones ambientales de la época del año, comprendida entre los meses de diciembre a marzo.

A los 15 días de cultivo se evaluó el número de plantas vivas del total de plantas iniciales y se calculó el porcentaje de supervivencia. Cada 15 días durante todo el ciclo del cultivo se evaluaron 10 plantas al azar del área experimental. En cada evaluación se determinó la longitud del tallo (cm) medida desde su base hasta la yema apical utilizando una regla milimetrada; así como la masa fresca del follaje y del sistema radical incluido los minitubérculos en caso de estar presentes.

A los 75 días de cultivo, se caracterizaron morfológicamente las hojas y los minitubérculos según el descriptor de Huamán (2007). Además, se determinó el número de tallos y el número de minitubérculos por planta. A los minitubérculos se les determinó el diámetro (cm), el peso fresco (g); así como el contenido de masa seca (%). Esta se determinó mediante la siguiente expresión: Contenido de masa seca= masa seca (g)/masa fresca (g) x100. Posteriormente, los minitubérculos fueron agrupados por calibres según su diámetro; estableciendo para este estudio los siguientes rangos de calibres ≤ 1.5; 1.6 - 2.8; 2.9 - 3.5; 3.6 - 4.5; 4.6 - 5.5; ≥ 5.5.

En el ciclo del cultivo se evaluaron diferentes índices fisiológicos de crecimiento como la tasa absoluta de crecimiento (TAC) y tasa relativa de crecimiento (TRC), siguiendo la formulación propuesta por Hunt (1982) citado por Mora *et al.* (2006). El análisis de crecimiento involucró el muestreo destructivo de las plantas a intervalos de tiempo durante la fase de crecimiento vegetativo. Para ello, se evaluó cada 15 días la masa seca del follaje y del sistema radicular incluido los minitubérculos de las plantas. La determinación de la masa fresca se realizó con una balanza técnica marca OHAUS

modelo CS200 y para la obtención de la masa seca de las plantas se utilizó una estufa marca SAKURA a 70 °C hasta que la masa de las muestras se mantuvo constante.

La TAC se calculó por la siguiente fórmula:  $TAC = \frac{PSf - PSi}{Tf - Ti}$  y la TRC se calculó mediante la fórmula  $TRC = \frac{PSf - PSi}{(PSf + PSi)(Tf - Ti)}$ ; donde PSf y PSi es el peso seco final e inicial de la planta completa en intervalos de tiempo. Además, se calculó el porcentaje de masa seca de los tubérculos a los 75 días mediante la fórmula propuesta por Torres (1980) mediante la fórmula  $\% \text{ Masa seca} = \frac{\text{Masa seca} \times 100}{\text{Masa fresca}}$ .

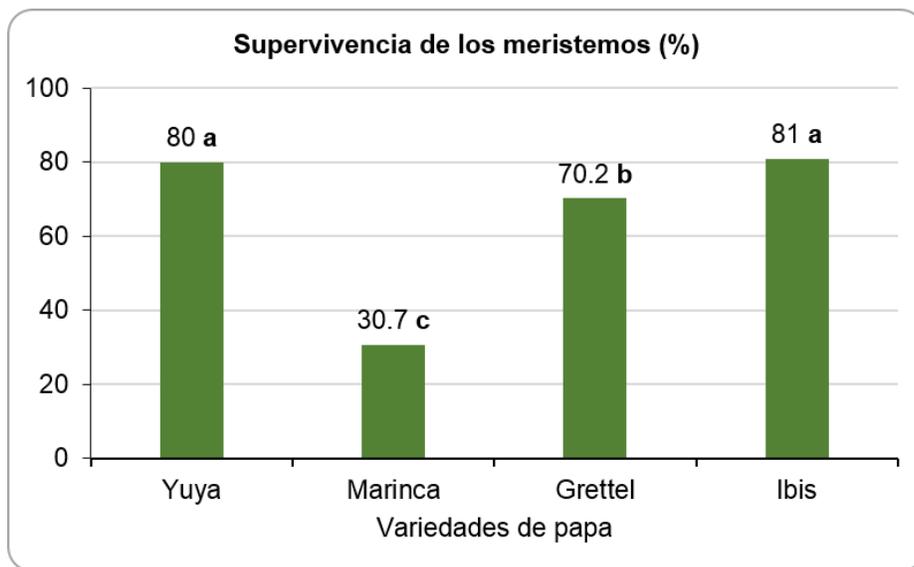
Para la comparación de las medias entre tratamientos se usó la prueba de proporciones para el porcentaje de supervivencia. Los valores de TCA y TCR se procesaron mediante la prueba no paramétrica Kruskal Wallis/Mann Whitney; mientras que los datos correspondientes al número, diámetro y peso de los minitubérculos se analizaron con la prueba paramétrica de Dunnett C.

*Resultados*

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efecto del genotipo en el establecimiento o iniciación *in vitro* de los ápices meristematos

Durante el establecimiento *in vitro* de los ápices meristemáticos no se observó la presencia de microorganismos contaminantes en el medio de cultivo. A los 40 días de cultivo se observaron diferencias significativas entre las variedades con respecto al porcentaje de supervivencia de los ápices meristemáticos. Las variedades Ibis y Yuya mostraron el mayor porcentaje de supervivencia de sus ápices sin diferencias estadísticas significativas entre ellas y sí con las variedades restantes (Figura 4).



*Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas entre las medias según la prueba Mann-Whitney para  $p \leq 0.05$ .*

Figura 4. Porcentaje de supervivencia de los ápices meristemáticos de papa durante la fase de establecimiento *in vitro*, a los 40 días de cultivo.

Como resultado de la caracterización morfológica se identificaron diferencias en el aspecto morfológico de las plantas obtenidas a partir de los ápices meristemáticos de papa, a los 60 días de cultivo. Se observaron plantas de aspecto normal con una coloración verde oscuro, tallo con una longitud entre 2.5 y 4.5 cm, definición de los entrenudos con presencia de hojas y raíces (Figura 5 a). Otro grupo de plantas

mostraron una coloración verde claro, tallo de menor longitud entre 0.5 y 1.5 cm de altura, entrenudos cortos, hojas lanceoladas y ausencia de raíces (Figura 5 b).



Figura 5. Aspecto morfológico de las plantas de papa obtenidas a partir de los ápices meristemáticos.

La frecuencia de aparición de los diferentes aspectos morfológicos varió entre los genotipos objeto de estudio. En las variedades Marinca, Ibis y Yuya más del 50% de las plantas obtenidas a partir de los ápices meristemáticos mostraron una morfología normal con coloración verde intenso y tallo con entrenudos bien definidos (Figura 6).

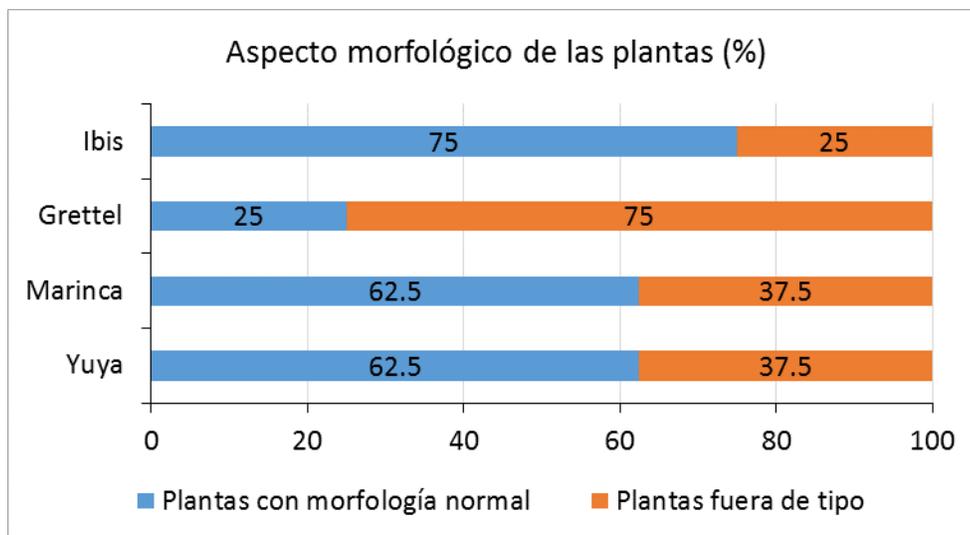


Figura 6. Influencia del genotipo en la morfología de las plantas obtenidas a partir de los ápices meristemáticos.

Por otra parte, las plantas de la variedad Grettel presentaron un mayor porcentaje con morfología fuera de tipo (Figura 6). Estas plantas mantuvieron esta morfología después de transferidas a medio de cultivo de multiplicación. Por tanto, deben ser descartadas durante el proceso de propagación.

#### 4.2 Caracterización de las plantas durante la fase de la multiplicación *in vitro*

Durante la fase de multiplicación *in vitro*, las plantas de las diferentes variedades mostraron hojas y tallos de aspecto normal y de color verde intenso. Además, de la presencia de raíces. Sin embargo, se observó que algunas plantas de las variedades Yuya e Ibis presentaban más de un tallo por la brotación de yemas axilares cercanas a la base de la planta (Figura 5 a). Este aspecto trajo como consecuencia el incremento del coeficiente de multiplicación en estas variedades, con diferencias significativas con respecto a las variedades Marinca y Grettel (Figura 7).

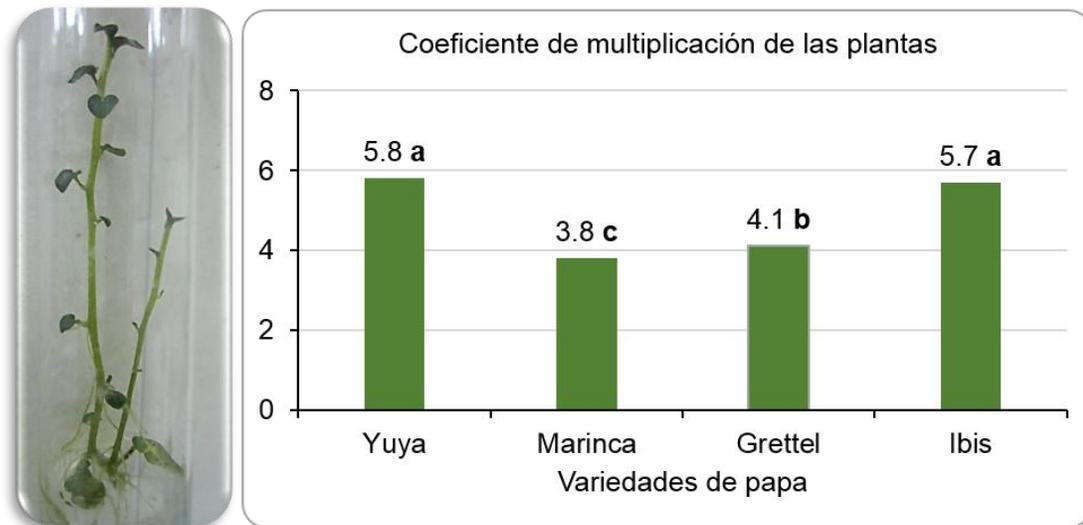
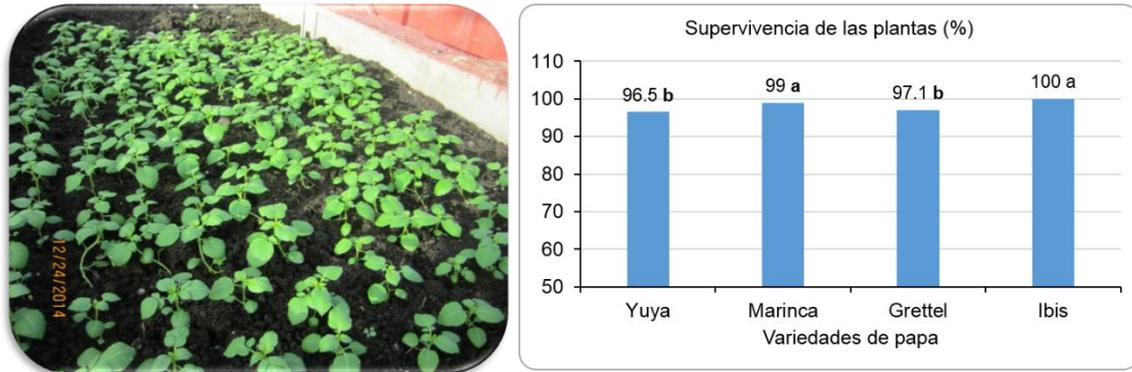


Figura 7. Aspecto morfológico de las plantas *in vitro* de la variedad Yuya y coeficiente de multiplicación de las variedades durante la fase de multiplicación.

#### 4.3 Evaluación de las plantas en casa de cultivo

Las plantas en condiciones *ex vitro* mostraron altos porcentajes de supervivencia, los cuales estuvieron entre el 96.0 y 100%. La variedad Ibis presentó una supervivencia del 100% de las plantas sin diferencias significativas con respecto a la variedad

Marinca. Sin embargo, ambas variedades mostraron diferencias significativas con respecto a los porcentajes de supervivencias obtenidos en la variedad Yuya con el 96.0% y Grettel con el 97.4% (Figura 8).



*Letras distintas sobre barras indican diferencias significativas entre las medias según la prueba Mann-Whitney para  $p \leq 0.05$ .*

Figura 8. Aspecto morfológico de las plantas de la variedad Yuya en casa de cultivo y porcentajes de supervivencia de las variedades de papa a los 15 días.

Durante la fase de crecimiento vegetativo de las plantas de papa se observó que la masa fresca del follaje inició su incremento a partir de los 15 días y se aumentó con los días de cultivo, en todas las variedades. Su máximo valor se produjo a los 75 días de cultivo en las variedades Yuya, Grettel e Ibis y a los 60 días en la variedad Marinca (Figura 9). A partir de estos momentos la masa fresca del follaje comienza a disminuir hasta los 90 días de cultivo donde se observó la senescencia o muerte de aproximadamente el 80 % de las plantas.

Al analizar la masa fresca del sistema radicular, se observó que inicia su incremento a partir de los 30 días de cultivo en las cuatro variedades. Aspecto que puede estar relacionado con el inicio del proceso de tuberización. A los 75 días se produce un incremento notable de la masa fresca de las raíces y minitubérculos en todas las variedades. La variedad Yuya mostró los mayores valores de masa fresca del follaje y de raíces y minitubérculos con valores de 117.2 y 170.84 g, respectivamente (Figura 9).

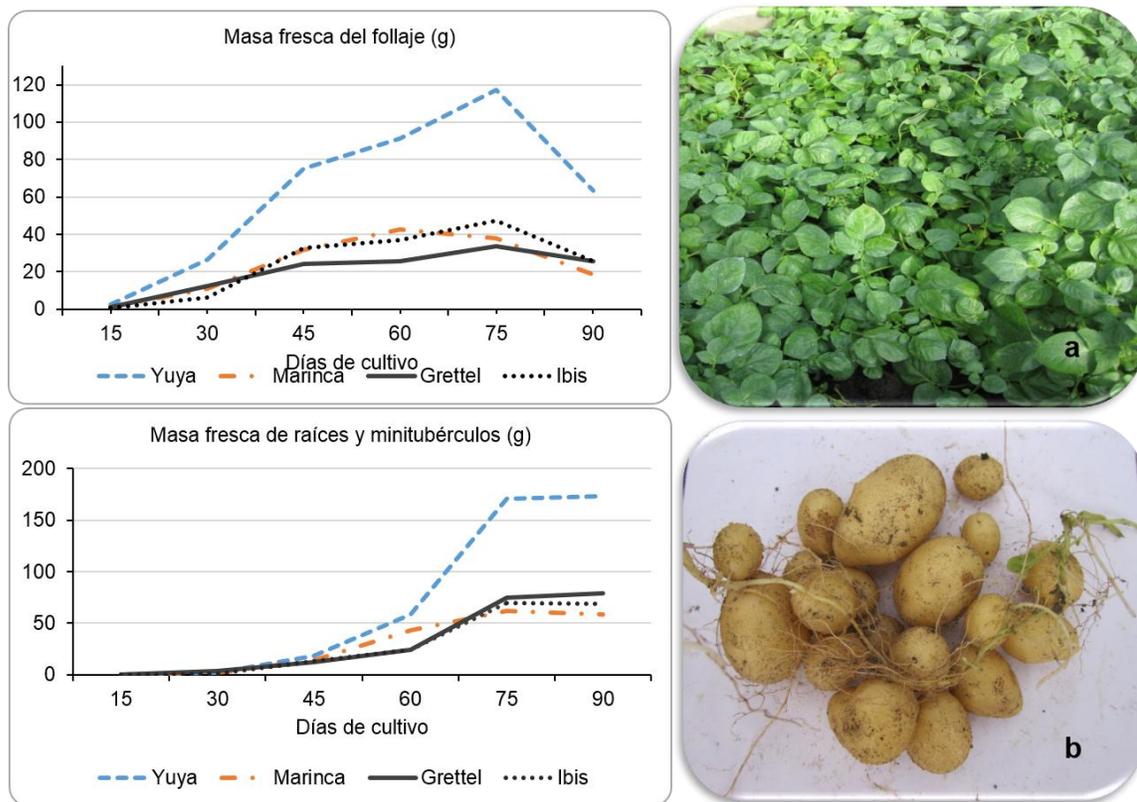


Figura 9. Respuesta en casa de cultivo de la masa fresca del follaje y del sistema radicular de las variedades de papa durante el periodo de cultivo. (a) Crecimiento vegetativo del follaje (a) y radicular (b) de la variedad Yuya, a los 75 días de la plantación.

La caracterización morfológica de las hojas mostró diferencias de acuerdo al Descriptor morfológico de papa elaborado por Huamán (2007). El número de pares de folíolos laterales primarios fue de tres pares en la variedad Yuya y Grettel y de dos en las demás variedades. De igual manera la variedad Yuya y Grettel presentaron cuatro pares de interhojuelas sobre el raquis principal, mientras que la Marinca presentó tres y la variedad Ibis no presentó interhojuelas sobre el raquis (Figura 10).

El grado de sobre posición entre los folíolos laterales primarios se presentó de manera diferencial entre las variedades. La variedad Yuya presentó el primer par de folíolos laterales sobrepuestos al folíolo central, los demás se encuentran separados (1-2 mm de separación). La variedad Marinca mostró los folíolos laterales muy separados (>2

mm de separación entre folíolos), Grettel los presentó sobrepuestos (1-2 mm de sobreposición) y la variedad Ibis los presenta unidos (Figura 10).

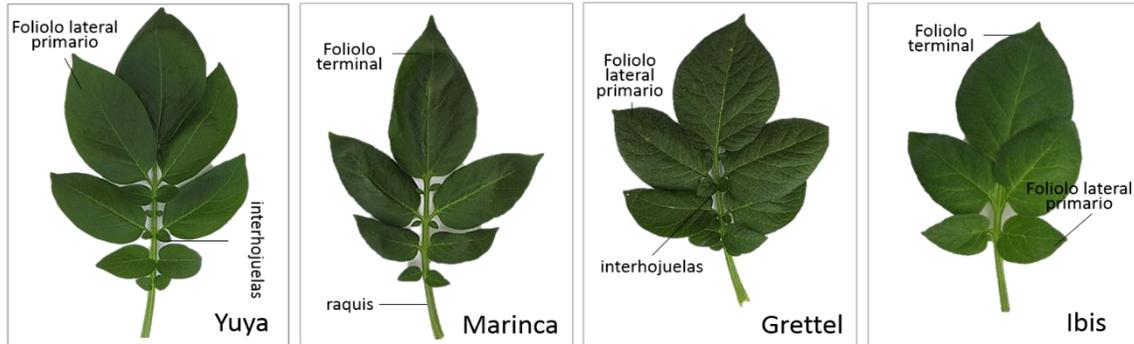


Figura 10. Características morfológicas de las hojas de las variedades de papa, según el Descriptor morfológico de Huamán (2007).

La Marínca presenta la forma del foliolo terminal lanceolada y las demás variedades presentan forma anchamente elíptica. La base del foliolo terminal presentó forma redondeada en Yuya y Marínca y Grettel mostró la forma del foliolo terminal cordado e Ibis con de forma asimétrica (Figura 10).

A los 75 días de cultivo, los minitubérculos de las variedades de papa mostraron diferencias en su aspecto morfológico siguiendo el Descriptor morfológico de papa de Huamán (2007). El color predominante de piel del minitubérculo en la variedad Yuya fue el blanco crema (159C) con forma ovoide. Igualmente, los minitubérculos la variedad Ibis presentaron forma ovoide y color de la piel blanco crema (155D). Por otra parte, la variedad Marínca mostró minitubérculos con forma largo oblongo y el color de la piel rosado (67D), mientras que Grettel presentó minitubérculo de forma del oblonga y piel de color blanco crema (159 D) (Figura 11).



Figura 11. Características morfológicas de los minitubérculos de las variedades de papa a los 75 días de la plantación, según el Descriptor morfológico de Huamán (2007).

El número de minitubérculos por planta mostró diferencias entre las variedades de papa, a los 75 días de cultivo. La variedad Ibis presentó el mayor número de minitubérculos con diferencias significativas respecto al resto de las variedades; mientras que Yuya y Marinca no mostraron diferencias significativas entre ellas. En este estudio, la variedad Grettel fue la de menor valor de minitubérculos por planta (Figura 12).

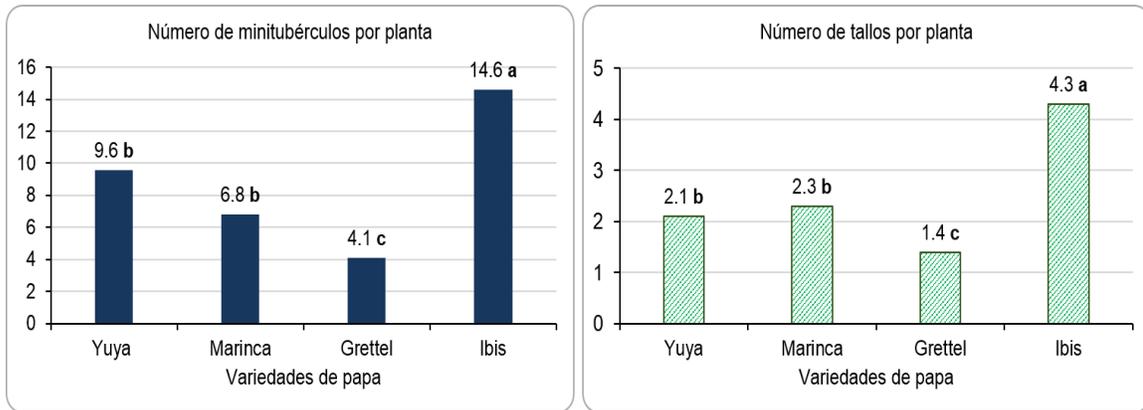


Figura 12. Respuesta de las variedades de papa con respecto al número de minitubérculos y tallos por planta, a los 75 días de cultivo.

La respuesta de las variedades de papa a la presencia de nuevos tallos se comportó de manera diferencial. A los 75 días, esta variable mostró el mayor valor en la variedad Ibis con un promedio de 4.3 tallos por planta y diferencias significativas con el resto de las variedades. La variedad Yuya y Marinca no mostraron diferencias significativas entre ellas con valores de 2.1 y 2.3, respectivamente. En esta variable la variedad Grettel fue la de menor valor de tallos por planta con diferencias significativas con las demás variedades (Figura 12).

El peso fresco de los minitubérculos fue mayor en las variedades Yuya y Grettel sin diferencias significativas entre ella y si con el resto de las variedades. De igual manera, la variedad Grettel mostró los mayores valores en el peso seco de los minitubérculos sin diferencias significativas con la variedad Ibis (Tabla 1).

Tabla 1. Promedio del peso fresco (g) y contenido masa seca (%) de los minitubérculos de las variedades de papa, a los 75 días de cultivo.

Varietal	Masa fresca (g)	Masa seca (%)
Yuya	18.67 a	17.6 b
Marinca	8.57 b	17.5 b
Grettel	23.20 a	19.3 a
Ibis	5.92 b	19.4 a

El diámetro de los minitubérculos a los 75 días de cultivo proporcionó una respuesta diferencial entre las variedades, con respecto a los valores de frecuencia de aparición de los rangos de calibres estudiados. Sin embargo, las variedades coinciden en presentar la mayor frecuencia de minitubérculos en el rango de calibre comprendido entre 1.6 a 2.8 cm de diámetro. Los minitubérculos de las variedades Ibis y Marinca presentaron una mayor homogeneidad de su diámetro y se ubicaron en los tres menores rangos de calibres (Figura 13).

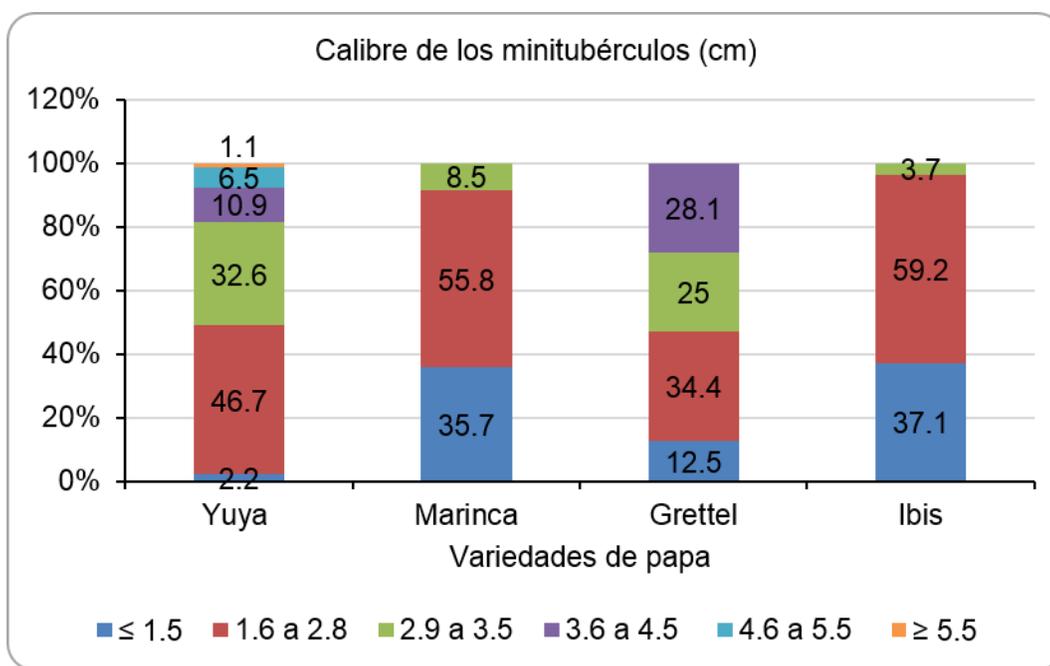


Figura 13. Frecuencia de aparición de los rangos de calibres según el diámetro de los minitubérculos de las variedades de papa, a los 75 días de cultivo.

#### *Índices fisiológicos de crecimiento*

Durante el ciclo del cultivo la tasa absoluta de crecimiento mostró diferencias significativas entre las variedades a partir de los 45 días de cultivo. Los mayores valores de esta tasa se obtuvieron a los 60 días en la variedad Yuya con 1.53 g días<sup>-1</sup>.

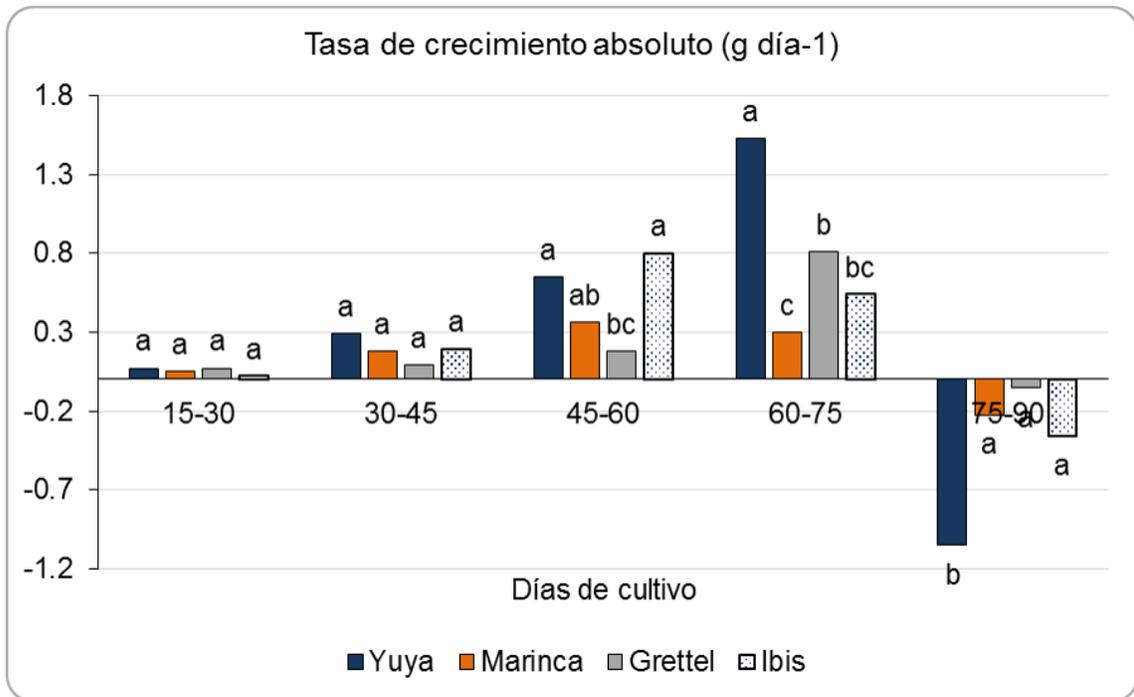


Figura 14. Tasa absoluta de crecimiento (TAC) de las variedades de papa en casa de cultivo.

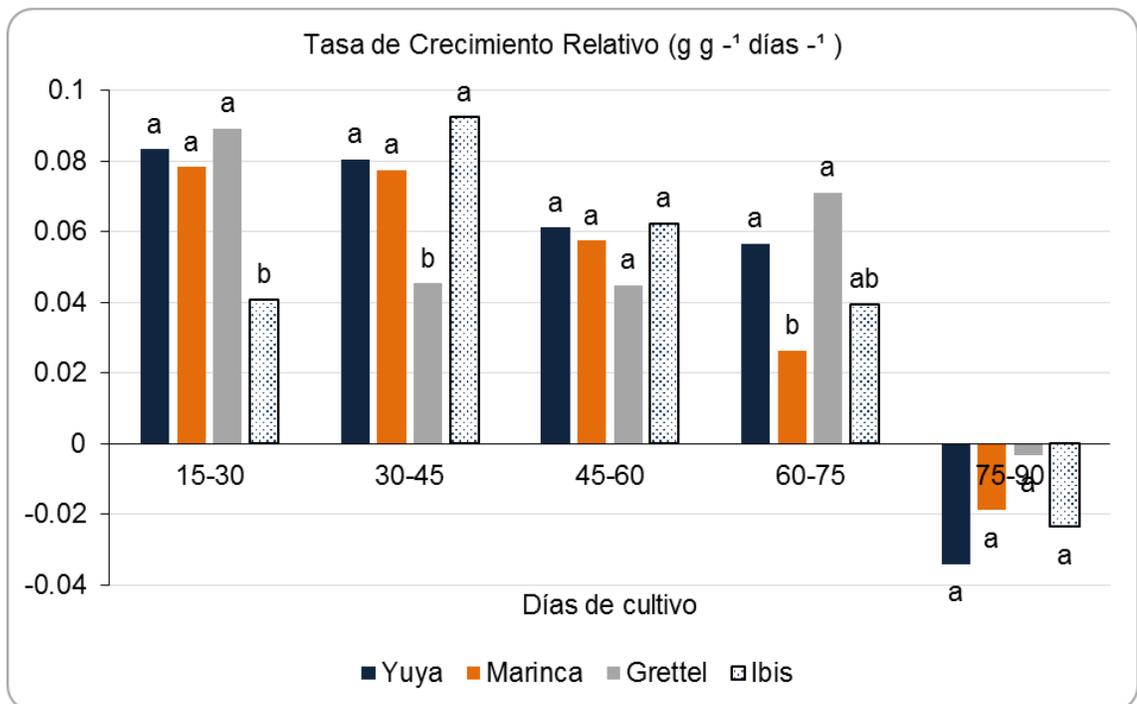


Figura 15. Tasa relativa de crecimiento (TCR) de las variedades de papa en casa de cultivo.

La mayor Tasa Relativa de Crecimiento se observó a los 30-45 días de cultivo en las variedades Yuya, Marinca e Ibis y en la Grettel a los 15-30 días de cultivo (Figura. 15). La variedad Ibis fue la cual produjo más cantidad de materia seca por unidad de tiempo durante del ciclo de vida con un valor de  $0.092 \text{ g g}^{-1}\text{días}^{-1}$  a los 30 – 45 días (Figura 15). Los valores de la tasa de crecimiento relativa disminuyeron de manera progresiva con la edad del cultivo en todas las variedades produciendo valores negativos a partir de los 75 días de plantación. Las cuatro variedades se clasifican según el Descriptor morfológico de Huamán (2007) como muy precoces porque la madurez del follaje se presenta antes de los 90 días después de la plantación. A los 90 días se observó la senescencia del 80% de las plantas.

A partir de los resultados de la investigación se pudo determinar la eficiencia en el crecimiento de las variedades cubanas durante el proceso de obtención de semilla de papa por técnicas biotecnológicas, mediante la caracterización morfológica y fisiológica de las plantas. Durante la fase *in vitro* las variedades Yuya e Ibis mostraron la mejor respuesta con altos porcentajes de supervivencia de los meristemos, mayores valores de plantas con características morfológicas adecuadas y altos coeficientes de multiplicación. Aspectos importantes para la propagación masiva de las variedades y obtención de grandes cantidades de plantas que deber ser plantadas en la casa de cultivo. En condiciones *ex vitro* la variedad Yuya mostró mayor crecimiento con respecto a las demás variedades, lo cual se constató a través de los altos valores de masa fresca del follaje y de la raíces y de su tasa absoluta de crecimiento. La variedad Ibis, Yuya y Marinca presentaron los mayores valores de tasa relativa de crecimiento durante el desarrollo vegetativo de las plantas con la mayor acumulación de biomasa. Sin embargo, a los 75 días de cultivo la variedad Ibis presentó el mayor número de tallos y minitubérculos por planta con alto contenido de materia seca. Estos resultados brindan el conocimiento necesario para la elección y manejo adecuado de las variedades de papa en el Programa de producción de semilla en Cuba.

*Discusión*

## 5. DISCUSIÓN

La obtención de plantas *in vitro* mediante técnicas de cultivo de tejidos es una vía eficiente para mantener de forma estable la calidad fitosanitaria y genética de la semilla de papa (Jiménez-Terry *et al.*, 2010).

El éxito del establecimiento *in vitro* de los ápices meristemáticos consiste en la obtención de explantes libre de microorganismos contaminantes y viables para iniciar el proceso de multiplicación. En este estudio, las variedades Ibis y Yuya mostraron altos porcentajes de supervivencia de sus meristemas y más del 50% de las plantas con una morfología normal. Durante la fase de multiplicación, estas variedades alcanzaron los mayores coeficientes de multiplicación. Estos resultados indican que la Ibis e Yuya responden mejor a la fase de establecimiento y la multiplicación *in vitro* en medios de cultivo semisólidos con respecto a las demás variedades estudiadas.

La supervivencia de las plantas en condiciones *ex vitro* está determinada por varios factores, entre ellos se encuentran la manipulación *in vitro*, las atenciones culturales y las condiciones climáticas (Park *et al.*, 2009). En este sentido, Kowalski *et al.* (2006) señalaron que condiciones fisiológicas favorables de las plantas durante las fases de cultivo *in vitro* repercutieron en las fases posteriores del proceso de producción de semilla de papa en casa de cultivo.

Al respecto, Hazarika, (2006) señalaron la influencia del estado de desarrollo de las plantas *in vitro* en su posterior aclimatización en casa de cultivo. Estos autores demostraron que plantas de mayor altura presentaron mayor supervivencia y crecimiento en la casa de cultivo con respecto a las plantas de menor altura. Los estudios de Igarza *et al.* (2013) demostraron que la calidad de las plantas *in vitro* tiene influencia sobre el desarrollo de las plantas *ex vitro* al utilizar plantas de papa de la variedad Andinita propagadas en sistemas de inmersión temporal.

En este estudio la supervivencia de las plantas obtenidas *in vitro* de las variedades cubanas de papa fue alta por el empleo de plantas morfológicamente adecuadas.

Resultados similares obtuvieron Jiménez-Terry *et al.* (2010), durante la obtención de minitubérculos de papa de la variedad 'Desirée' con el 97.8% de supervivencia de plantas en casa de cultivo con sustrato zeolita con respecto a la siembra directa de las plantas en campo.

En otros estudios Jiménez-Terry *et al.* (2013) obtuvieron altos porcentajes de supervivencia cuando utilizaron materia orgánica como sustrato (100 y 85.0%) para la formación de minitubérculos de papa en la casa de cultivo a partir de plantas obtenidas *in vitro*. En estas plantas se observaron los mayores valores de la tasa de crecimiento absoluta y las mayores tasas de crecimiento relativas. Las mayores tasas de crecimiento relativas significaron que para estos sustratos existió una producción similar de materia seca por masa total de la planta en la etapa de crecimiento hasta los 45 días de cultivo (Jiménez-Terry *et al.*, 2013).

Las características como el número de pares de folíolos laterales, número de pares de interhojuelas, color predominante de la piel del tubérculo, formas del tubérculo, nos indican que hay caracteres que describen la parte vegetativa y el tubérculo. Estas características sirven para diferenciar entre grupos genéticos. Los caracteres discriminantes que tienen valores altamente significativos sirven especialmente para identificar o diferenciar los morfotipos y subgrupos dentro de cada grupo de accesiones.

En este estudio a través de la caracterización morfológica de las hojas se pueden discriminar las variedades cubanas de papa. Se identificaron las características morfológicas más distintivas de sus hojas. Aspecto importante para la detección de variaciones somaclonales en poblaciones de plantas obtenidas por cultivo *in vitro*.

En la literatura científica varios autores han descrito la influencia del número de tallos por planta en la formación de estolones y por consiguiente en el mayor número de tubérculos por planta (Estévez *et al.*, 1982; Cabrera *et al.*, 2009). Este aspecto se puso de manifiesto en este estudio donde las variedades con mayor número de tallos se correspondieron con la mayor formación de minitubérculos, a los 75 días de cultivo. En este sentido, los resultados de Estévez *et al.* (1982) en cultivos diploides de papa mostraron correlaciones entre el rendimiento y el número de tallos. Al igual que

Cabrera *et al.* (2009), los cuales encontraron que el número de tallos influyó positivamente en el rendimiento agrícola de la variedad de papa Cal White.

La masa fresca del follaje de las variedades cubanas se incrementó con los días de cultivo (Fig. 9), lo que sugiere que los tallos presentan un mayor crecimiento vegetativo en este momento. En primeras etapas del cultivo la mayor proporción de asimilados se utiliza en la generación de hojas y crecimiento del tallo y no en el llenado de los tubérculos (Gawronska *et al.*, 1990). Al respecto, Moreno *et al.* (2013) plantean que durante la fase de crecimiento vegetativo los fotoasimilados no son distribuidos hacia los tubérculos, lo cual incrementa la masa fresca aérea. Similares resultados obtuvieron Aguilar *et al.* (2006) en las variedades de papa Alpha y Milagros.

Entre las cuatro variedades de estudio, la variedad Yuya alcanzó los mayores valores de masa fresca en todos los momentos de evaluación. Esta mostró mayor desarrollo del follaje y alcanzaron mayor altura los tallos tallo en la etapa de crecimiento vegetativo. Por ello, es recomendable distancias de plantación mayores para esta variedad para evitar el autosombreo y la competencia de las plantas durante la obtención de los minitubérculos.

Después de los 75 días de cultivo todas las variedades presentan un declive del contenido de masa fresca del follaje causado por la senescencia de las hojas y tallos, lo cual puede estar relacionado con el movimiento y distribución de asimilados en la planta y la demanda de los sitios de consumo. La mayor demanda de asimilados se presenta en estadios iniciales en las hojas y en los tallos; pero esto cambia con el crecimiento de los tubérculos, los que constituyen el principal sitio de almacenamiento (Mompies *et al.*, 2012).

La masa fresca de raíces y minitubérculos inició su incremento a partir de los 30 días y se incrementó con los días de cultivo llegando al máximo valor a los 75 días en todas las variedades (Fig. 10), lo cual presenta una similitud con la tendencia de la masa fresca del follaje de la planta donde presenta el máximo valor en el mismo periodo de tiempo del cultivo (Fig. 9).

Aunque el incremento de la masa fresca de los tubérculos empieza a partir de los 30 días, transcurre lentamente hasta los 75 días que alcanza su máximo valor. Esto se puede explicar por la mayor duración en el llenado del tubérculo (Moreno *et al.*, 2013).

La variedad Ibis presentó el máximo valor de minitubérculos por planta con un valor de 14.6 con diferencias significativas con respecto a las demás variedades de estudio (Fig. 12). Igualmente, la variedad Ibis presenta tallos ramificados más abiertos permitiéndole a la planta mayor actividad fotosintética porque tiene mayor follaje expuesto a la luz y hay una mayor eficiencia productiva y con ello una mayor cantidad de tubérculos producidos. Por su parte, Van der Veecken *et al.* (2009) plantearon que en los sistemas de producción de semilla de papa el objetivo principal era obtener un elevado número de tubérculos.

La variedad Grettel no tiene una buena producción de tubérculos (4.1 tubérculos por planta), debido a que su desarrollo vegetativo es muy pobre, tal vez porque esta variedad es más exigente las condiciones climáticas o diferentes condiciones de plantación (Moreno *et al.*, 2013).

La mayor parte de los minitubérculos en cada variedad de estudio correspondió a un calibre entre 1.6 – 2.8 cm. La producción de tubérculos mayores es favorable para plantaciones de papa para consumo, pero a su vez es desfavorable para la producción de tubérculos semilla, donde se requiere un mayor número de tubérculos de menor tamaño (Van der Zaag, 1987).

Se conoce que el diámetro de los tubérculos está determinado entre otros factores por la duración del ciclo de cultivo de la variedad o cultivar. A medida que avanza el ciclo vegetativo del cultivo, el rendimiento y el porcentaje de tubérculos grandes se incrementa (Igarza *et al.*, 2013). Algunos productores de semilla para evitar la formación de tubérculos muy grandes emplean prácticas agronómicas como el corte del follaje. Según Pozo (1997), se puede obtener hasta el 100% de tubérculos para semilla en períodos menores a 90 días, independientemente del diámetro de semilla usado para la plantación.

Estos resultados indican que la variedad Ibis presentó la mejor respuesta desde el punto de vista de producción de semilla pues logra tubérculos de pequeño tamaño pero en mayor número.

El contenido de masa seca entre diferentes variedades de papa permitirá establecer un criterio de selección de aquellos genotipos que logren tener un mayor contenido de reserva, lo cual se traduciría en un incremento del crecimiento de las plantas y una mayor precocidad del cultivo.

La variedad Yuya presentó los mínimos valores de masa seca durante del ciclo de crecimiento, aunque anteriormente presentó los máximos valores de masa fresca al respecto a las demás variedades. Esto puede ser debido a una mayor acumulación de agua en los tejidos de la planta. El alto contenido de agua que poseen los tubérculos, puede facilitar el ataque de insectos y microorganismos que ocasionan a menudo su destrucción. Es por ello que se torna difícil conservar tubérculos de papa por largo tiempo sin que se produzcan pérdidas, que a veces pueden ser de consideración.

La producción de materia seca total es el resultado de la eficiencia del follaje del cultivo en la intercepción y utilización de la radiación solar disponible durante el ciclo de crecimiento. Según Cacace *et al.* (1994) valores de masa seca de los tubérculos superiores al 20.0% constituye una característica de calidad importante para la agroindustria de la papa y está directamente determinada por la condición genética. Sin embargo, esta eficiencia puede estar influenciada por la cantidad de radiación solar, la habilidad de las hojas para fotosintetizar, el índice de área foliar, la arquitectura de la planta, la respiración, entre otros, lo que se resume en factores internos de crecimiento relacionados con el genotipo y factores externos relacionados con el ambiente y las prácticas de manejo utilizadas durante el ciclo (Mompies *et al.*, 2012).

Acorde a lo referido por Leiva-Mora *et al.* (2011), las plantas de papa obtenidas por cultivo *in vitro* que tenían una mayor producción de masa seca y área foliar alcanzaron mayor rendimiento. Según Núñez *et al.* (2009) las plantas de papa que tienen mayor producción de materia seca en las etapas iniciales hasta que comienza la tuberización; potencialmente pueden alcanzar mayor rendimiento si otros factores inductores y condiciones ambientales no afectan el desarrollo normal de este cultivo.

En este estudio implica que las variedades Grettel e Ibis tienen un mayor potencial en la producción de masa seca (Tabla 1) y por ende un mayor contenido de almidón en los tubérculos. Esto concuerda con lo informado por Torres (1980), quien logró determinar la correlación lineal entre el contenido de masa seca de los tubérculos y el contenido de almidón.

La Tasa de Crecimiento Absoluta (TCA) es un índice fisiológico relacionado con el crecimiento de las plantas que estima el ritmo de producción de materia seca por planta por unidad de tiempo (Valverde y Sáenz, 1985; Núñez *et al.* 2009).

La determinación de la tasa de crecimiento absoluta de acuerdo con la etapa fisiológica del cultivo permitirá valorar y acumulación de materia seca por la planta directamente relacionada con la fotosíntesis. La tasa de crecimiento absoluta debe evaluarse en la etapa de crecimiento del cultivo y por ello la selección de los momentos en lo que se realiza la evaluación, así como las etapas fenológicas que representan; pueden influir en los valores de este índice fisiológico y su interpretación. Jiménez-Terry *et al.* (2013)

A los 60-75 días de cultivo en las variedades Yuya, Grettel e Ibis mostraron el mayor comportamiento de la Tasa Absoluta de Crecimiento (Fig. 14). Mompies *et al.*, 2012, comprobó que en las plantaciones, se alcanzan un máximo en la superficie foliar alrededor de los 65 días después de la plantación lo cual aumenta la capacidad de la fotosíntesis, momento a partir del cual comienza a declinar de forma pronunciada.

A partir de los 75 días, todos los genotipos mostraron un pronunciado decremento de la TAC debido al proceso de senescencia de la parte aérea de la planta lo cual redujo captura de los radios solares y la capacidad fotosintética. La TAC indica que entre los 75y 90 días de cultivo la ganancia de masa seca por día fue menor, lo que sugiere, que la mayor acumulación de biomasa después de los 75 días se debería a la remobilización de carbohidratos de otras estructuras de la planta (hojas, tallo) hacia los tubérculos, lo que ocasiona la senescencia precoz del follaje (Leiva-Mora *et al.*, 2006) Las cuatro variedades se clasifican según el Descriptor morfológico de Huamán (2007) como muy precoces porque la madurez del follaje se presenta antes de los 90 días después de la plantación. A los 90 días se observó la senescencia del 80% de las plantas.

La tasa relativa de crecimiento (TCR) indica la acumulación de biomasa presente, por unidad de biomasa producida, por unidad de tiempo. La TCR inicialmente presentó valores altos debido a una mayor extensión del follaje en la etapa de crecimiento vegetativo, los cuales fueron disminuyendo con la edad la cual se debe en parte al aumento gradual de tejidos no asimilatorios (Maldonado, 1993; Jarma *et al.*, 1994). Por su parte, Lynch y Rowberry (1977), realizaron un análisis de crecimiento de la variedad de papa Russet Burbank en Guelph y obtuvieron resultados similares en el comportamiento de la TRC, donde decrece con el tiempo y alcanza un valor igual a cero.

*Conclusiones*

## **CONCLUSIONES**

1. Se determinó que la variedad Yuya e Ibis mostraron la mejor respuesta in vitro con altos porcentajes de supervivencia de los meristemos, mayores valores de plantas con características morfológicas adecuadas y altos coeficientes de multiplicación.
2. Se determinó que la variedad Ibis fue la de mayor potencial productivo en la obtención de semilla original de papa, con altos valores de TCR y TCA durante el desarrollo vegetativo y tuberización de las plantas.

*Recomendaciones*

## **RECOMENDACIONES**

- Proponer la variedad Ibis para el esquema de producción de semilla nacional de papa por medios biotecnológicos y evaluar su respuesta en campo.
- Evaluar los minitubérculos (semilla original) obtenidos en condiciones de campo para la obtención de las demás categorías de semilla.

# *Bibliografía*

## BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R. (1981) Comiendo en el edén; la superioridad nutricional de la comida primitiva: 177-182.
- Águila, L. G., Hernández, Z. C., Moya, T. P., Mederos, B. P. (2001) Cultivo de meristemas para la eliminación del virus S de la papa en plantas cultivadas *in vitro*. *Bioteología vegetal* (1):2: 117-119.
- Aguilar, M. G., Carrillo, J., Rivera, A., González, V. (2006) Growth analysis and sink-source relationships in two potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 29(2): 145–156.
- ALAP (2000) La agricultura no cañera en Cuba. La producción de papa. XIX Congreso Latinoamericano de la Papa. La Habana. Cuba
- Alonso, F. (1996) El Cultivo de la patata. Madrid, España
- Egusquiza, B. (2000) La papa, producción, transformación y comercialización
- Borba, N. (2008) La papa un alimento básico. Posibles impactos frente a la introducción de papa transgénica Brown, A. H. D. (1995) The core collection at the crossroads. En: *Core collection of plant genetic resources* 3-9 pp.
- Bryan, J., Meléndez, N., Jackson, M. (1981) Esquejes de brotes, una técnica de multiplicación rápida de papa. Centro internacional de la papa: 10 pp.
- Pozo, C.M. (1997) Producción de Tubérculos-semillas de Papa. Tuberización, tamaño de la semilla y corte de tubérculos. Centro Internacional de la Papa
- Cacace, J. E., Huarte, M. A., Monti, M.C. (1994) Evaluation of potato cooking quality in Argentina. *American Journal of Potato Research*. 71: 145-153 pp.
- Castillo, J. G., Estévez, A., González, M. E., Salomón, J. L. (2006) Informe de nuevas variedades Grettel, una nueva variedad cubana de papa para el consumo fresco e industrial. *Cultivos Tropicales*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. 27: 63 pp.
- Castillo, J. G., Jorge, L., Díaz, S., Estévez, A., Espinosa, H. M. M., González, A. P., Castiello, U. O., Monguía, R., Lorenzo, N., Tabera, O. (2011) Informe de nuevas variedades yuya, nueva variedad de papa cubana para doble propósito. *Cultivos Tropicales*. 32(2). 45 pp.
- Castro, J. I, Agramonte, D., Alvarado-Capó, Y., Fera, M., Pugh, T. (2012) Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. *Bioteología Vegetal*. 12(1): 3 – 24 pp.
- CIP (1997) Tissues Culture micro propagation, conservation and export of potato germoplasm. International Potato Center. Lima, Perú
- Cutter, E. G. (1978) The Potato Crop. En: *Estructure and developement of the Potato plant*. Chapman and Hall. London
- Dieme, A., Ourève, S. M. (2013) Environmental, morphological and physiological factors analyzes for optimization of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtuber *in vitro* germination. En: *Advances in Bioscience and Biotechnology*: 986-992 pp.
- Espinoza, N., Lizarraga, R., Sigueñas, C., Buitrón, F., .Bryan, J., Dodds, J. (1992) Tissue Culture micro propagation, conservation y export of potato germoplasm. International Potato Center. Lima, Perú

- Éstevez, A., Gonzalez, M. E., Castillo, J., Ortiz, U., Cordero, M. (1998) Informe de nuevas variedades Lizzette e Ibis dos nuevas variedades cubanas de papa. *Cultivos Tropicales*. 19(2):57
- Estévez, A., Guerra, J. P., Manso, F. (2007) Introducción, desarrollo y evolución en Cuba. En: Valdés E. A. (eds.) *El cultivo de la papa en cuba*. INCA. La Habana
- Estévez, A. (2005) La papa, importancia y situación mundial. En: Estévez, A. (eds.) *El cultivo de la papa en Cuba*. INCA. La Habana
- Fernando, B., Fernández, J. M., López, A., Parga, V. M., Murillo, M., Carvajal, A. (2000) Análisis de crecimiento en siete variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Agronomía mesoamericana*. 11(1): 145-149
- Gallegos, M. A. R. (2009) Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (Papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. Facultad de ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor De San Marcos
- García, L., Noa, J. C. (1998) Obtención de plantas libres de patógenos. En: Pérez J.N. (eds.) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas, Santa Clara: 135-148 pp.
- Gopal, J., Khurana, S.M.P. (2006) Handbook of potato production, improvement, and post-harvest management. En: Spooner, D.M., Salas A. (eds.) *Structure, biosystematics, and genetic resources*: 1-39 pp.
- Harris, P. (1978) *The potato crop: the scientist basis for improvement*. Chapman and Hall. London.
- Hawkes, J.G. (1963) A revision of the tuber bearing *Solanum*. *Scott plant breed*. 2: 181 pp.
- Hawkes, J. G. (1978) History of the potato. En: Harris, P. M. (ed.) *The Potato Crop*. London, UK
- Hawkes, J.G (1990) *The potato: evolution, biodiversity and genetic resources*. Belhaven Press. London
- Hijmans, R. J., Spooner, D.M. (2001) Geographic distribution of wild potato species: 2101-2112 pp.
- Hijmans, R.J.; Jacobs, M.; Bamberg, J. B. and Spooner, D. M. (2003) Frost tolerance in wild potato species: Assessing the predictivity families of taxonomic, geographic, and ecological factors: 47–59 pp.
- Huamán, Z. (2008) *Descriptores morfológicos de la papa (Solanum tuberosum L.)*. Cabildo de Tenerife. Centro de conservación de la biodiversidad agrícola de Tenerife
- Hunt, R. (1982) Plant growth curves. En: Arnold, E. (ed.) *The functional approach to plant growth analysis*. London: 48 pp.
- Hunt, R. (2002) A Modern Tool for Classical Plant Growth Analysis. *Annals of Botany*. 90(4): 485–488 PP.
- Igarza, J., de Feria, M., Alvarado-Capó, Y., Pugh, T., Pérez, M., Roman, M.S., Agramonte, D. (2013) Empleo de microtubérculos de papa cv. 'Andinita'

obtenidos en Sistemas de Inmersión temporal para producir minitubérculos en casa de cultivo. *Biotecnología Vegetal*. 13 (4).

- Jiménez-Terry, F., Agramonte, D., Pérez, M., León, M., Rodríguez, M., de Feria, M., Alvarado-Capó, Y. (2010) Producción de minitubérculos de papa var. 'Desirée' en casa de cultivo con sustrato zeolita a partir de plantas cultivadas *in vitro*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. *Biotecnología Vegetal*. 10.
- Jiménez-Terry, F., Agramonte, D., Pérez, M., Pons, M., Rodríguez, M., La, O M., Hurtado, O., Pérez, A., Leiva-Mora, M. (2013) Efecto del sustrato sobre la producción de minitubérculos de papa en casa de cultivo a partir de plantas *in vitro*. Instituto de biotecnología de las plantas. *Biotecnología Vegetal*. 13(3): 169 – 180pp.
- Leiva Mora, A.R., Ortiz, C. J., Rivera, P. A., Mendoza, C. C. A., Colinas, L. M. T., Lozoya, S. H. (2006) Índices de eficiencia de genotipos de papa establecidos en condiciones de secano. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 12(1): 85-94 pp.
- Leiva-Mora, M., Portela, Y., Torres, S., Veitía, N., Jiménez-Terry, F., Agramonte, D., León, M, Alvarado-Capó, Y., Acosta-Suárez, M., Cruz-Martín, M., Sánchez, C., Roque, B. (2011) Índices fisiológicos asociados al crecimiento de variedades de papa obtenidas por métodos biotecnológicos. *Biotecnología Vegetal*. 11(2): 119 – 120 pp.
- López, Z.M., Vázquez, B.E., López, F.R. (1995) Raíces y tubérculos. Pueblo y Educación
- Luna, J. R. H., Ardisana, E. H., Hernández, A. (2002) Estudio sobre la efectividad del RIZOBAC en el proceso de callogenesis en papa var. Desiree
- Manso, F. (2009) Informe final de la campaña de papa 2008-2009. MINAGRI: 32 pp.
- Meléndez, N., Quevedo, M., (1980) Técnicas de multiplicación rápida de papa. Centro Internacional de la papa. Lima, Perú
- Mompies E.J., Martín R. (2012) Comportamiento del crecimiento y el rendimiento de la variedad de papa (*Solanum tuberosum L.*) spunta. *Cultivos Tropicales*. 33: 53-58. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas
- Moreno, A. P.G, Mogollón, M.P.A.G., López, C. E. N., Villota, T. M. S., Torres, J. M. C. (2013) Análisis funcional de crecimiento y desarrollo de cuatro variedades de papa (*Solanum tuberosum* subsp. andigena). Universidad militar nueva Granada.
- Naik, P.S., Karihaloo, J. L. (2007) Micropropagation for production of quality potato seed in Asia-Pacific. Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology. New Delhi, India
- Núñez, C. E., Segura, M., Santos, M. (2010) Análisis de crecimiento y relación fuente-demanda de cuatro variedades de papa (*Solanum tuberosum L.*) en el municipio de Zipaquirá (Cundinamarca, Colombia). *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. 63(1): 5253-5266
- Recabarren, P. E. (2010) El mercado de la papa 2009 – 2010. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias – Odepa.

- Roca, W., Jayasinghe, U. (1982) El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca. Guía de estudio. Centro internacional de agricultura tropical. Colombia: 47 pp.
- Rodríguez, L., Barandalla, L, Ritter, E, Hasse, N.U., Galarreta, J. I. R. (2009) Evaluación del valor nutricional de germoplasma nativo de patata para su incorporación en programas de mejora genética. Revista Latinoamericana de la Papa. 15(1): 55-57 pp.
- Rodríguez, L. E. (2010) Origen y evolución de la papa cultivada. Agronomía Colombiana. 28(1): 9-17 pp.
- Salomón, J. L., Castillo, J. G., Estévez, A., Arzuaga, C. J., Ortiz, Ú., Caballero, A., Vásquez, E. R. (2010) Evaluación de genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L.) para caracteres reproductivos y agronómicos. Cultivo Tropical. La Habana. 31(2) pp.
- Sasson, A. (1993) La alimentación del hombre del mañana. UNESCO. Madrid: 807 pp.
- Struik, P. C., van der Putten, P. E. L., Caldi, z D. O., Scholte, K. (2006) Response of Stored Potato Seed Tubers from Contrasting Cultivars to Accumulated Day-Degrees. Crop Science. 46: 1156- 1168 pp.
- Tapia, M. E. (1993) Semillas andinas. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
- Torres, W. (1980) Relación entre el porcentaje de almidón y el porcentaje de materia seca en tubérculos de papa var. Desireé. Cultivos Tropicales. 2: 135-145 pp.
- Valdés, L. (1995) Las Biofábricas, una Alternativa para México. Ciclo de Conferencias para el Fitotecnista. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Fitomejoramiento. México
- Valdés L. (1998) Producción de Semilla Agámica de Papa y otras Especies Vegetales. Sistema de Investigación Alfonso Reyes: 22 pp.
- Valdés, L., C.G.S, Moreno, L. A., Sandoval E. (1999) Integración Tecnológica para Producir Semilla de Papa de Alta Calidad en el Noreste de México. IX Congreso Nacional de Productores de Papa. México
- Van der Veeke, A.J., Lommen, W.J. (2009) How planting density affects number and yield of potato minitubers in a commercial glasshouse production system. Potato Research. 52 (2): 105-119 pp.