



UNIVERSIDAD CENTRAL DE LAS VILLAS  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS

TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL TÍTULO ACADÉMICO DE  
MAGISTER SCIENTIAE EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

EMPLEO DE LOS SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL PARA LA  
PRODUCCIÓN DE MICROTUBÉRCULOS DE PAPA  
(*SOLANUM TUBEROSUM* L.)

Autor: Ing. Naivy Lisbet Pérez Alonso

Tutor: Dr. Elio Jiménez González

Consultante: Ing. Reinaldo Quiñones Ramos

Santa Clara  
2001

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo el desarrollo de un sistema semi-automatizado para la producción de microtubérculos de papa sobre la base de lograr un incremento en el número de microtubérculos por planta y la calidad de los mismos. Al compararse dos métodos de cultivo en medios líquidos: el control semicontinuo del nivel del medio y la inmersión temporal, los resultados mostraron que en el primer método se observó la presencia de moderados síntomas de hiperhidricidad. Se obtuvo 1,80 microtubérculos por planta de la variedad Atlantic, valor superado en la inmersión temporal (2,93) donde el proceso ocurrió con mayor calidad, siendo este método de cultivo el más adecuado para la producción de microtubérculos. Respecto a la metodología convencional en medio semisólido empleada como control, tanto en la fase de crecimiento de los explantes como en la tuberización, los mejores resultados se obtuvieron con la inmersión temporal en las variedades evaluadas. Se logró más del 60,00% de microtubérculos con calibre mayor que 7,00 mm en la variedad Desirée y más del 70,00% en la variedad Atlantic, mientras que en el control fue de solo un 15,00 y 41,90% respectivamente. Factores como la densidad de inóculo y el tiempo de inmersión tienen notable importancia en la calidad del proceso de microtuberización como muestran los resultados. Con 60 explantes el número de microtubérculos por sistema fue menor (168) en relación al tratamiento con 90 esquejes (234), sin embargo el 23,1% de estos, corresponde a microtubérculos deformados con menor peso fresco y diámetro. Se demostró que tiempos cortos de inmersión (dos minutos) favorecen la microtuberización, lográndose una mayor calidad en los microtubérculos obtenidos expresada en el calibre promedio con un valor de 10,13 mm en relación a 7,33 mm obtenido con 30 minutos de inmersión y en el peso fresco promedio con un valor de 0,90 g respecto a 0,50 g. Sobre la base de los resultados obtenidos se realizó a mayor escala la producción en frascos de 10,0 L, en los cuales se obtuvo un promedio de 2,60 microtubérculos por planta, con promedios en el peso fresco de 1,30 g y diámetro de 11,00 mm para la variedad Atlantic. Estos valores posibilitaron la siembra directa en campo de los microtubérculos mostrando un comportamiento superior a las vitroplantas respecto al peso total de los microtubérculos por planta con valores de 310,30 y 146,60 g y similar comportamiento en cuanto al diámetro con valores de 42,20 y 31,40 mm respectivamente, no se presentó diferencias estadísticas en el número de microtubérculos por planta. Los resultados obtenidos demuestran la factibilidad del empleo de la inmersión temporal en la producción de semilla original de papa, la cual puede ser combinada con los actuales métodos de propagación *in vitro*.

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
2.1. La papa. Generalidades.....	4
2.1.1. Origen y distribución.....	4
2.1.2. Ubicación taxonómica y diversidad genética.....	4
2.1.3. Variedades hortícolas Desirée y Atlantic.....	5
2.1.4. Importancia económica del cultivo.....	6
2.2. Producción de la semilla de papa.....	7
2.3. Micropropagación.....	8
2.3.1. Métodos de micropropagación empleados en la producción de semilla de papa.....	9
2.3.1.1. Producción de vitroplantas.....	9
2.3.1.2. Producción de microtubérculos.....	10
2.3.1.3. Producción de minitubérculos.....	11
2.3.2. Tuberización <i>in vitro</i> .....	12
2.3.3. Empleo de medios líquidos. Ventajas y desventajas.....	14
2.4. Automatización de la micropropagación.....	15
2.4.1. Sistemas de Inmersión Temporal.....	17
2.4.2. Producción de microtubérculos de papa en sistemas automatizados.....	18
<b>3. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1. Efecto del control semicontinuo del nivel del medio de cultivo y la inmersión temporal en la microtuberización.....	23
3.2. Efecto de la inmersión temporal en el crecimiento de los explantes y en la producción de microtubérculos en las variedades Desirée y Atlantic.....	26
3.3. Influencia de la densidad de inóculo.....	27
3.4. Influencia del tiempo de inmersión.....	28
3.5. Producción de microtubérculos de papa a gran escala.....	29
3.6. Comportamiento en campo de los microtubérculos obtenidos en los sistemas de inmersión temporal.....	30
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
4.1. Efecto del control semicontinuo del nivel del medio de cultivo y la inmersión temporal en la microtuberización.....	32
4.2. Efecto de la inmersión temporal en el crecimiento de los explantes y en la producción de microtubérculos en las variedades Desirée y Atlantic.....	35
4.3. Influencia de la densidad de inóculo.....	41
4.4. Influencia del tiempo de inmersión.....	43
4.5. Producción de microtubérculos de papa a gran escala.....	45
4.6. Comportamiento en campo de los microtubérculos obtenidos en los sistemas de inmersión temporal.....	48
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>6. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>56</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) introducida de América en Europa en el siglo XVI y luego diseminada por el mundo, ocupa el sexto lugar en América Latina entre los cultivos alimenticios en términos de producción total, después del maíz, yuca, trigo, arroz y plátanos y el octavo lugar con respecto a las áreas cultivadas después de los mismos productos, incluyendo además el sorgo y el frijol (Herrera, 1992). Es reconocida por su alta productividad y valor nutritivo, dados por la producción de energía y proteínas por unidad de tiempo y superficie (Estrada, 2000).

En Cuba, se invierten anualmente en este cultivo alrededor de 10 millones de dólares en la compra de semilla a Holanda y Canadá (Pérez y Suárez, 1998), con el riesgo de la introducción de agentes patógenos e insectos que existen inevitablemente en toda importación de grandes volúmenes de materiales de siembra (Pérez y Rodríguez, 1989). Precisamente por estas razones, desde hace varios años, instituciones científicas y productivas vienen desarrollando grandes esfuerzos por implementar un programa integral de producción nacional de semilla de papa.

Este programa contempla la producción de semilla en sus diferentes categorías lo cual garantiza la calidad genética y fitosanitaria, otorgándole un peso fundamental a la fase de producción de semilla original (Pérez y Suárez, 1998).

Debido a que los métodos convencionales no garantizan la disminución de las enfermedades que afectan al cultivo de la papa, la producción de microtubérculos (Wang y Hu, 1980) y vitroplantas (Espinoza *et al.*, 1992) se han convertido en las vías más eficientes para la propagación de este cultivo.

Para las condiciones de Cuba, la producción de microtubérculos representa una vía alternativa para la obtención de semilla original ante algunas limitantes que tiene la producción de vitroplantas. Los microtubérculos se pueden producir sin tener en cuenta la época del año, ni la demanda del mercado y ser almacenados durante meses sin perder su potencialidad, facilitando la comercialización y el intercambio de germoplasma, así como la mecanización para su plantación (Agramonte, 1999).

Hasta el presente, la microtuberización en medios de cultivo semisólidos se ha caracterizado por una baja producción de microtubérculos por vitroplanta y el pequeño tamaño de los mismos, factores que limitan la plantación directa en condiciones de campo, constituyendo

éste su principal problema (Jiménez *et al.*, 1999). Internacionalmente se han desarrollado varias estrategias con el fin de reducir estas desventajas entre las cuales se encuentran las modificaciones en la composición del medio de cultivo como es el contenido de sacarosa y el uso de reguladores de crecimiento (Estrada *et al.*, 1986; Harvey *et al.*, 1991; Leclerc *et al.*, 1994); la manipulación de las condiciones de cultivo como la temperatura, la luz y el fotoperíodo (Menzel, 1995; Levy *et al.*, 1993; Seabrook *et al.*, 1993) y el uso de medios de cultivo líquidos en agitación o biorreactores (Akita y Takayama, 1994a y b; Avila *et al.*, 1996; Ziv y Shemesh, 1996).

Autores como Preil (1991), Ziv (1991, 1995) sugieren el empleo de biorreactores para la micropropagación de plantas vía organogénesis o embriogénesis somática. Según Ziv (1995) los biorreactores facilitan la automatización, ya que permiten un mayor control interno de los parámetros físico-químicos, aunque su uso en la propagación masiva implica un alto costo de inversión y mantenimiento del equipo, incrementando el costo por propágulo.

Se han desarrollado sistemas semi-automatizados basados en la inmersión temporal así como biorreactores con y sin ventilación forzada para la producción de microtubérculos con el objetivo de incrementar el rendimiento por planta y la calidad de los mismos (Akita y Takayama, 1994a y b; Ziv y Shemesh, 1996; Ziv *et al.*, 1998; Akita y Ohta, 1998; Teisson y Alvard, 1999; Yu *et al.*, 2000).

Los sistemas de inmersión temporal basados en el contacto intermitente con los explantes constituyen una tecnología más accesible y permiten una mayor facilidad para el desarrollo de los procesos a gran escala y el aumento de la productividad del material propagado, lo que significa una reducción en los costos de producción (Aitken-Christie, 1991; Escalona, 1999; Lorenzo *et al.*, 1998; Ventura *et al.*, 1998). Estos han sido diseñados de varios tamaños y formas, con el uso o no de soportes para las plantas, forma y frecuencia de aplicación de los nutrientes entre otras especificaciones que los diferencian en el manejo y el costo (Escalona, 1999).

Parámetros como el tiempo de inmersión de los explantes y variables como la densidad de inóculo requieren gran atención en el proceso de micropropagación en los sistemas de inmersión temporal. Esta optimización pudiera provocar mayores rendimientos biológicos a través de una mejor respuesta morfológica.

Teniendo en cuenta la problemática anteriormente expuesta es que se proponen en el presente trabajo los siguientes objetivos:

1. Comparar el efecto de dos métodos de cultivo en medios líquidos, el control semicontinuo del nivel del medio de cultivo y la inmersión temporal, en la producción de microtubérculos de papa de la variedad Atlantic.
2. Estudiar el efecto de la inmersión temporal en las fases de crecimiento de los explantes y microtuberización, en las variedades Desirée y Atlantic.
3. Evaluar el comportamiento en condiciones de campo de los microtubérculos de la variedad Atlantic, producidos en los sistemas de inmersión temporal.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. La papa. Generalidades.**

#### **2.1.1. Origen y distribución.**

La papa es originaria de la Cordillera de los Andes, en América del Sur y a pesar de que no existe ningún documento específico de la ruta de su introducción en Europa, al parecer sucedió en 1570 según Hawkes (1990). Desde España, fue llevada a Italia, luego a Inglaterra en 1586 y después a Alemania en 1601. Clusius, botánico belga, estando en Viena en 1588, recibió dos tubérculos; al año siguiente recibió una acuarela, la primera representación pictórica de la planta en el viejo mundo (Brown, 1995).

Debido a su adaptación a períodos diurnos cortos, las papas introducidas tuberizaban tardíamente y sólo producían pequeños tubérculos en ambientes con períodos diurnos excepcionalmente largos, libres de heladas. Consecuentemente, por muchos años, el potencial de la papa como cultivo comestible no fue muy destacado y fue vista más bien como una novedad botánica (Hawkes, 1990).

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, 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 la actualidad se emplean 16 variedades comerciales foráneas mayormente holandesas y se trabaja en el desarrollo de variedades cubanas. La mayor cantidad de área sembrada se concentra en la región occidental de la Isla con el 55% (ALAP, 2000).

#### **2.1.2. Ubicación taxonómica y diversidad genética.**

Las extensas recolecciones de los últimos cincuenta años han permitido la elaboración de un cuerpo considerable de conocimiento biosistémico. Taxonómicamente las especies tuberosas han sido clasificadas por su morfología, poliploidía y localización geográfica y representan una serie de poliploides que van de diploides a hexaploides.

La papa es una planta dicotiledónea, herbácea anual potencialmente perenne por su capacidad de reproducción por tubérculos. Su ubicación taxonómica según Cronquist (1988) es la siguiente:

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Sub clase: *Asteridae*

Orden: *Gentianales*

Familia: *Solanaceae*

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum tuberosum*

Se conoce que ocho especies de papa son cultivadas y aproximadamente 200 especies silvestres están distribuidas desde el suroeste de Estados Unidos hasta Chile y Argentina en Sudamérica (Brown, 1995). Entre las especies cultivadas se incluyen diploides, triploides, tetraploides (*S. tuberosum* spp. *tuberosum* y *S. tuberosum* spp. *andígena*) y pentaploides.

#### 2.1.3. Variedades hortícolas Desirée y Atlantic.

En Cuba se han plantado diferentes variedades hortícolas, entre estas tenemos las variedades Desirée y Atlantic, descritas por Barclay (1997) en el Catálogo de variedades de papa.

##### Variedad Desirée

Origen genético: Urgenta x Depesche, obtenida en 1962. Los tubérculos son grandes, forma larga ovalada de coloración parda, ojos superficiales y pulpa amarilla ligera. La planta es vigorosa, desarrolla rápidamente el follaje y cubre pronto el campo y el rendimiento es alto pero produce una alta proporción de tubérculos deformados. Tiene muy buena resistencia a la sequía, moderadamente susceptible al Tizón tardío y al Enrollamiento de la hoja, susceptible a la Costra común, frente a *Alternaria solani* muestra buena resistencia con desarrollo lento de la enfermedad y bastante resistente al PVY. Tiene buenas características para el almacenamiento con corto reposo vegetativo.

##### Variedad Atlantic

Origen genético: Wauseon x B5141-6, obtenida en 1976. Los tubérculos son de forma ovalada a redondos con ojos superficiales, la piel es amarillenta, firme y algo áspera, la pulpa es blanca y tiende a producir tubérculos muy grandes. La planta es de tamaño mediano a grande, erecta, de hojas grandes, con un rendimiento alto y una baja proporción de



tubérculos con grietas, heridas y deformaciones. Es resistente a la cepa 0 del Tizón tardío y a la Necrosis reticular de los tubérculos, frente a *Alternaria solani* muestra buena resistencia con desarrollo lento de la enfermedad. En lo que respecta al almacenamiento tiene muy buenas cualidades, mantiene buen color y con un reposo vegetativo mediano.

#### 2.1.4. Importancia económica del cultivo.

La producción anual de la papa representa aproximadamente la mitad de la producción mundial de todos los tubérculos, tanto de origen caulinar como radicular. El producto llega a más de mil millones de consumidores de todo el mundo, dentro de este total, figuran 500 millones de consumidores de los países en vías de desarrollo, cuya dieta básica incluye la papa (Contreras, 1999).

En la actualidad la producción mundial anual suma 275 millones de toneladas y cubre 18 millones de hectáreas. 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 veinte años después han aumentado su contribución hasta el 30%. Como consecuencia la papa 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 (Lorence, 1997).

La gran importancia económica de la papa se basa en su elevada capacidad de producción de sustancias alimenticias por unidad de superficie que es tres veces mayor que en los cereales, ofreciendo posibilidades de consumo, bien sea como alimento directo para el hombre y el ganado o como materia prima en destilerías, fábricas de fécula o en la producción de derivados. Además la papa es un cultivo de período vegetativo corto, que posee una gran versatilidad para ser integrada dentro de los sistemas de cultivo, por otro lado es ampliamente adaptable, lo que le permite desarrollarse en condiciones y climas muy diversos (López *et al.*, 1995).

La papa es un alimento saludable, nutricional y bajo en grasa, que suple muchos de los nutrientes importantes de la dieta. Contiene aproximadamente 78% de agua, 22% de materia seca y menos del 1% de grasa. Cerca del 82% de la materia seca son carbohidratos, como el almidón, no obstante algunos azúcares están presentes en pequeñas cantidades. Este cultivo contiene 11% de proteína por peso seco, por lo menos 12 vitaminas esenciales y minerales, como la tiamina, el hierro, el ácido fólico y algunas fibras (Shaupmeyer, 1997).

#### 2.2. Producción de la semilla de papa.

En las últimas dos décadas la producción de semilla de papa en Latinoamérica ha experimentado notables avances gracias al desarrollo de los métodos de multiplicación rápida y en las técnicas de eliminación de patógenos por medio del cultivo de meristemos y la termoterapia (Bernal, 1997). Paralelamente se desarrollaron métodos serológicos y de hibridación de ácidos nucleicos para la detección de patógenos, especialmente de los virus y viroides que por su presencia sistémica en la planta se difunden fácilmente por la multiplicación vegetativa. Estos métodos se difundieron ampliamente en América Latina mediante un intensivo programa de capacitación auspiciado por el Centro Internacional de la Papa. Desde 1972 hasta 1992 varios países tomaron la decisión de reducir sus importaciones de semilla con la finalidad de ahorrar divisas y otros no importadores decidieron mejorar la calidad de su semilla (Ezeta, 1999).

En Cuba la semilla de papa de alta calidad que actualmente se produce, es todavía insuficiente para satisfacer las necesidades de plantación. La mayor parte de la semilla de papa que se utiliza para cubrir el área que se destina para este cultivo, es importada de Canadá y Europa (Pérez y Suárez, 1998).

Actualmente la semilla se produce a partir del material *in vitro* y se reproduce bajo el sistema oficial de certificación de semillas con cuatro categorías. El Programa Nacional de Producción de Semilla prevee aumentarla paulatinamente en los próximos años hasta llevarla a satisfacer el 30% de la necesidad (ALAP, 2000).

Es uno de los cultivos con más requerimientos tecnológicos para producir la semilla, porque está expuesto al ataque de organismos patógenos y virus. El objetivo fundamental es producir un material de siembra con alto grado de pureza varietal y de calidad fitosanitaria. El tubérculo de la papa se considera como la semilla unitaria tradicional y su calidad refleja las condiciones en que se ha desarrollado el cultivo incluyendo su estado fitosanitario. En muchos países, la imposibilidad de producir semilla básica de modo estable ha incrementado la importación de ésta en cantidades significativas (Lago, 1991).

La propagación vegetativa garantiza que la constitución genética de la variedad se mantenga casi inalterable, pero con limitantes como la transmisión de enfermedades y los altos costos de manipulación (CEVIPAPA, 2001).

Entre los métodos de producción de semilla se incluyen la selección clonal, la producción de semilla botánica y los métodos de reproducción acelerada. Este último se refiere a un conjunto de técnicas que aumentan los coeficientes de multiplicación de semilla básica a

niveles no alcanzados por los métodos tradicionales donde la micropropagación juega un papel fundamental (Lago, 1991).

### 2.3. Micropropagación.

La micropropagación fue definida como cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plantas y permitan el desvío tanto del proceso sexual normal, como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente (Krikorian, 1991).

La papa, como cultivo de propagación vegetativa, es propensa a la infección acumulativa por bacterias, hongos, virus y viroides, proceso éste generalmente conocido como degeneración, afectando el rendimiento y la calidad comercial. Muchos investigadores hacen mención a los problemas de contaminación microbiológica que pueden ser muy difíciles de suprimir (Espinoza *et al.*, 1992). Debido a los efectos drásticos causados por dichas infecciones, es que la aplicación de cultivo de tejidos y las técnicas rápidas de multiplicación en los programas de semilla de papa, se han extendido y desarrollado muy pronto por el mundo (Struik y Lommen, 1990).

La forma de propagación *in vitro* de la papa es vía yemas axilares. Esta fue descrita por Hu y Wang (1983) como la técnica que se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas o primordios de las hojas, los cuales son divididos y subcultivados repetidamente.

Ha sido demostrado para muchas especies que la micropropagación vía organogénesis mediante la formación de yemas axilares, es el método más empleado en la propagación comercial y el más confiable para lograr un proceso de proliferación repetible, sin alteraciones genéticas y libre de agentes contaminantes de carácter patógeno o endofítico (Orellana, 1998). Su principal desventaja radica en la laboriosidad del proceso lo cual implica altos costos por mano de obra, los bajos coeficientes de multiplicación en comparación con otros sistemas y la escasa posibilidad de automatización del proceso productivo (Kozai *et al.*, 1997).

Kitto (1997) plantea que la micropropagación es una industria joven con un excelente futuro, pero su incremento dependerá del desarrollo de nuevas técnicas para la automatización de los procesos y del mejoramiento de los sistemas de aclimatización de las plantas.

#### 2.3.1. Métodos de micropropagación empleados en la producción de semilla de papa.

##### 2.3.1.1. Producción de vitroplantas.

La producción de vitroplantas ha alcanzado un gran auge en el mundo y es empleado por muchos países en sus programas nacionales para la producción total o parcial de semilla. Este método constituye la mayor aplicación del cultivo de tejidos, siendo las tecnologías de propagación vía organogénesis las más empleadas para tales fines (Pérez *et al.*, 2000).

En el concepto actual el proceso de micropropagación consta de cinco fases desde la 0 hasta la IV. La fase preparativa (0) comprende la selección de plantas madres y algunos pretratamientos, en la fase de iniciación (I) se logra el establecimiento de cultivos axénicos y fisiológicamente vigorosos con los que se inicia la multiplicación (Fase II). Esta fase comprende la multiplicación de las plantas a través de microesquejes en medios de cultivo semisólidos (Espinoza *et al.*, 1992) o en estado físico líquido en agitación (Estrada *et al.*, 1986). El crecimiento de los explantes ocurre bajo condiciones de fotoperíodo de 16 horas luz, condición indispensable para mantener el estado juvenil y por consiguiente su continua multiplicación durante períodos relativamente largos (Agramonte, 1999). En esta fase la concentración de sacarosa fluctúa entre un 2,0 y 3,0% y se emplean reguladores del crecimiento como el ácido giberélico, ácido naftalenacético, 6-bencilaminopurina, kinetina, ancimídol, paclobutrazol, que aunque el uso de estos últimos no es muy frecuente, han sido señalados por Estrada *et al.* (1986), Ziv y Shemesh (1996), Ziv *et al.* (1998). Para el enraizamiento (Fase III), el manejo de los explantes es similar a la fase de multiplicación, incrementándose los niveles de sacarosa y la intensidad luminosa con el objetivo de estimular el fortalecimiento de las vitroplantas, que serán posteriormente transplantadas a ambientes exteriores. Este proceso concluye con la fase de adaptación (IV) a las condiciones ambientales de las plantas cultivadas *in vitro*.

Otros autores como Miyashita *et al.* (1996); Heo y Kozai (1999) han descrito sistemas de micropropagación de plantas completamente autotrófico con una alta intensidad luminosa y enriquecido en CO<sub>2</sub> sin la utilización de la sacarosa. Estos mismos autores plantean además, que estos sistemas pueden reducir los costos de micropropagación, lograr un incremento en el crecimiento y en la supervivencia de los explantes, así como prevenir el crecimiento de los microorganismos.

Las vitroplantas al ser incubadas en condiciones favorables a la tuberización, producen microtubérculos, los cuales según Yu *et al.* (2000) son considerados propágulos ideales para la producción de semilla de alta calidad.

#### 2.3.1.2. Producción de microtubérculos.

La producción de microtubérculos surgió como una alternativa a los métodos de producción de semilla y ha sido ampliamente estudiada siendo posible la producción de grandes volúmenes de propágulos en pequeños ambientes (Rosell *et al.*, 1987; Ranalli *et al.*, 1994; Duplessis *et al.*, 2000).

Según Lago (1991) los microtubérculos ofrecen grandes ventajas, como son la posibilidad de producirse en cualquier época del año, almacenarlos en pequeños espacios, sirven de material de partida para programas que carecen de infraestructura adecuada y de experiencia en cultivo de tejidos, permiten un escalonamiento de la producción pues pueden utilizarse en siembras tempranas en campo. Autores como Yamamoto y Nakata (1997) consideran que los microtubérculos se han convertido en el material más importante para el intercambio internacional de germoplasma y otros como McCown y Joyce (1991) y Belletti *et al.* (1994) les atribuyen mayor fortaleza que otros propágulos como los microesquejes, mayor facilidad de manejo, almacenamiento y factibilidad para la plantación automatizada.

Otros investigadores como Ezeta (1999) y Struik y Lommen (1990) reportan que las dificultades en el manejo, almacenamiento y brotación han sido limitantes para el uso práctico de esta metodología debido a los pequeños calibres, aproximadamente de 2,0 a 10,0 mm. Los microtubérculos son muy susceptibles a la deshidratación durante el almacenamiento y son además difíciles de brotar aún utilizando sustancias químicas estimulantes.

Para que los métodos de producción conviertan a los microtubérculos en un propágulo admisible para la comercialización, el peso fresco promedio mínimo requerido de los mismos debe ser de 0,5 g (Struik y Lommen, 1990; Lommen y Struik, 1994). Muchos sistemas han producido microtubérculos con un peso fresco promedio por debajo de 0,5 g (Tovar *et al.*, 1985; Rosell *et al.*, 1987; Seabrook *et al.*, 1993) y pocos sistemas destacan microtubérculos con un peso fresco promedio superior a 0,5 g, pero menor que 1,0 g (Akita y Takayama, 1994a; Leclerc *et al.*, 1994; Oka y Sluis, 1996).

La cosecha de los microtubérculos se puede realizar en área aséptica o al aire libre con un posterior tratamiento con desinfectantes. Luego son separados por tamaño en: menores de 4,0 mm, de 4,0-6,0 mm y mayores de 6,0 mm (Tovar *et al.*, 1985) y son colocados en un lugar con buena ventilación durante seis o siete días para que subericen.

#### 2.3.1.3. Producción de minitubérculos.

Ambos métodos de propagación pueden llevar a una tercera variante que es la producción de minitubérculos. Esta se realiza en ambientes protegidos por malla antiáfido o directamente en campo y este producto que proviene de los microtubérculos o vitroplantas recibe la denominación de semilla original (Agramonte, 1999).

Este modelo ha sufrido diversas modificaciones resultantes de desarrollos tecnológicos o de la necesidad de ajustarlo a situaciones particulares a cada centro de producción. Algunas de estas modificaciones han contribuido a mejorar la calidad y eficiencia del modelo. Otras, sin embargo, han aumentado el riesgo de contaminación o disminuido la eficiencia productiva. La primera variación fue el empleo de vitroplantas, en lugar de esquejes enraizados para la producción de minitubérculos. Esta innovación fue posible gracias al desarrollo de metodologías de laboratorio que facilitaron la producción masiva de plántulas a partir de secciones de tallo en el medio de cultivo (Ezeta, 1999).

Otra modificación sustancial al modelo ha sido el trasplante directo al campo de las vitroplantas (Agramonte, 1999). Estas pasan por un período de adaptación en ambientes protegidos de la radiación solar directa, donde son transplantadas en sustratos que permiten el desarrollo radicular y aclimatización de la plantas antes del trasplante definitivo al campo. Este método ha sido probado en varios países pero la mayoría de ellos lo han abandonado por las dificultades en el manejo de las vitroplantas, la baja tasa de sobrevivencia y el alto costo.

Quantum Tubers Corporation (2000) señala que el cultivo intensivo de plantas en condiciones estériles provoca un ahorro en el tiempo y en el costo de producción, al mismo tiempo que disminuye la degeneración que se produce al plantar variedades nuevas y existentes en la producción. Los minitubérculos producidos y comercializados por esta compañía pueden ser plantados directamente en campo con una viabilidad del 95% y con requerimientos mínimos para el cultivo de tejidos.

Los minitubérculos son fáciles de almacenar, uniformes en el tamaño y económicos, además de romper la dormancia de igual manera que cualquier tubérculo de mayor tamaño. Estos al ser plantados en campo producen plantas fuertes con altos rendimientos (DokaGene Technologies Company, 2001).

La alta capacidad productiva de minitubérculos por unidad de superficie está dada por el estado juvenil del material *in vitro*. Los rendimientos se sitúan entre 300 y 800 tubérculos por m<sup>2</sup> y se pueden obtener hasta tres cosechas por año, sin embargo, la producción masiva de vitroplantas requiere de instalaciones apropiadas y de personal calificado (Ezeta, 1999).

Según Yu *et al.* (2000) el tamaño de los minitubérculos destinados a la plantación directa en campo tiene un efecto importante en el desarrollo del cultivo. Estudios realizados a minitubérculos (Lommen y Struik, 1994) y a microtubérculos (Haverkort *et al.*, 1991) mostraron que los tubérculos más pequeños emergieron más lento, con menor uniformidad y rendimiento que las plantas establecidas de tubérculos de semilla convencional.

### 2.3.2. Tuberización *in vitro*.

La tuberización *in vitro* o microtuberización en la papa es un proceso de desarrollo muy complejo, influenciado por una amplia variedad de factores genéticos, ambientales y fisiológicos (Villafranca *et al.*, 1998).

El primer reporte de la tuberización *in vitro* fue publicado por Barker (1953), quien usó brotes etiolados para inducir la tuberización en un medio de cultivo con 80 g/L<sup>-1</sup> de sacarosa (citado por Bizarri *et al.*, 1995). Desde entonces la utilización de reguladores del crecimiento a favor de la microtuberización ha sido objeto de intensas investigaciones (Leclerc *et al.*, 1994).

Para inducir la tuberización *in vitro* son varios los medios de cultivo que han sido utilizados, en su mayoría basados en modificaciones realizadas a partir del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962). No obstante, en todos ha sido un requisito fundamental la concentración elevada de sacarosa en el medio de cultivo (6, 8 y 9% los más utilizados), incluso en muchos casos se plantea que es el factor más importante dentro del conjunto que influye en este suceso (Agramonte, 1999; Yu *et al.*, 2000).

Muchos científicos han tratado de alterar el balance hormonal de la planta para favorecer a la tuberización, modificando las concentraciones en el medio de cultivo de citoquininas, como el 6-BAP, la Kinetina y Zeatina (Tovar *et al.*, 1985; Zarrabeitia *et al.*, 1997; Gopal *et al.*, 1998); retardadores del crecimiento como el Cloruro de Cloro Colina (Estrada *et al.*, 1986; Yamamoto y Nakata, 1997) Ancymidol y Paclobutrazol (Alchanatis *et al.*, 1994, Ziv y Shemesh, 1996) y Acido Acetil Salicílico (López-Delgado y Scott, 1997).

El medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento ha sido ampliamente empleado (Akita y Takayama, 1994a y b; Agramonte, 1999) y se han estudiado factores como el fotoperíodo (Seabrook *et al.*, 1993; Levy *et al.*, 1993), la intensidad luminosa (Menzel, 1995) y la temperatura (Akita y Takayama, 1994a) con la finalidad de favorecer el proceso de microtuberización. Todos estos métodos han dado por resultado la formación *in vitro* de tubérculos, variando el rendimiento por vitroplanta así como el peso de los mismos.

La respuesta a la inducción de la tuberización y el desarrollo del proceso está fuertemente influenciada por el genotipo (Levy *et al.*, 1993; Zarrabeitia *et al.*, 1997). Estrada *et al.* (1986) desarrollaron investigaciones para inducir los microtubérculos en un rango amplio de genotipos de papa. Se pudo comprobar que se indujo la formación de tubérculos en todos los genotipos probados. Como promedio, una de diez yemas axilares de plantas cultivadas *in vitro* desarrolló estolones con pequeños tubérculos en sus extremos. Cada tubérculo pesó entre 3,0 y 38,0 mg, tenía dos o más ojos y expresaba, aún siendo de pequeño tamaño, caracteres como el color y la forma.

Gopal *et al.* (1998) encontraron que no todos los genotipos estudiados durante la tuberización formaron microtubérculos y mostraron respuestas diferentes a los tratamientos evaluados al variar las condiciones de cultivo como el fotoperíodo, la temperatura y la presencia de hormonas en el medio de cultivo. Zarrabeitia *et al.* (1997) señalan que en estudios realizados, los genotipos que fueron evaluados respondieron de manera positiva a la influencia del nitrógeno, aunque no todos de igual manera y algunos genotipos favorecidos por las condiciones de oscuridad. Anjum y Villiers (1997) muestran las diferencias entre varios genotipos en cuanto al tiempo requerido para la formación de los microtubérculos.

La densidad de inoculación reportado por Sarkar *et al.* (1997) es una variable de gran importancia que influye en la propagación masiva de tubérculos *in vitro* que no ha sido investigado intensamente. Sin embargo, la necesidad de optimizar la densidad de inoculación para el rápido desarrollo de las plantas y lograr un aumento en la calidad del propágulo ha sido reportado en un gran número de especies ( Chun *et al.*, 1986; Mackay y Kitto, 1988).

Todavía se requieren mejoras en los métodos de producción de microtubérculos, ya que los sistemas más corrientes presentan problemas con la obtención de microtubérculos de suficiente tamaño para ser plantados en campo (Ranalli *et al.*, 1994), limitante que se resolverá empleando métodos más eficientes.

### 2.3.3. Empleo de medios líquidos. Ventajas y desventajas.

El empleo de los medios de cultivo en estado líquido es un aspecto primordial en la automatización de la micropropagación (Aitken-Christie *et al.*, 1995; Ziv, 1995) y en el desarrollo de técnicas para la producción a gran escala, empleados exitosamente en *Amelanchier x grandiflora* (Krueger, 1991), *Spathiphyllum sp.*(Simonton *et al.*, 1991), *Musa sp.* (Alvard *et al.*, 1993; Albany, 2001), *Stevia rebaudiana* (Akita *et al.*, 1994), *Hevea brasiliensis* (Teisson y Alvard, 1994), *Solanum tuberosum* (Akita y Takayama, 1994a y b; Jiménez *et al.*, 1999), *Ipomoea batatas* (Bieniek *et al.*, 1995), *Ananas comosus* (Escalona,



1999), *Citrus deliciosa* (Cabasson *et al.*, 1997), *Saccharum spp.* (Lorenzo *et al.*, 1998), *Gladiolus nanus* (Ziv *et al.*, 1998), *Coffea arabica* (Etienne-Barry *et al.*, 1999).

Para la micropropagación de la papa se han empleado los medios en estado líquido aunque el estado semisólido ha sido el mayormente empleado. Sus ventajas incluyen la facilidad de preparación, esterilización y manipulación, mayor rapidez en la absorción de sustancias nutritivas y la difusión de sustancias tóxicas producidas por el metabolismo de las plantas, el aumento de la productividad de los operarios de cabina de flujo laminar debido a que los explantes sólo deben ser colocados en contacto con el medio sin necesidad de manipularlos de forma individual. Además el cambio en la composición del medio puede efectuarse por simple transferencia, brinda grandes posibilidades para la automatización y la reducción de los costos de producción (Orellana, 1998).

Sin embargo, en condiciones estáticas provoca un efecto depresivo sobre el crecimiento del tejido en el cultivo *in vitro*, ya sea por hipoxia o por hiperhidricidad (Debergh, 1983; Alvard *et al.*, 1993; Ziv *et al.*, 1998). La hipoxia es causada por una baja disponibilidad de oxígeno, necesaria para el desarrollo de los tejidos, que le produce serias afectaciones en el crecimiento de los explantes (Orellana, 1998). La hiperhidricidad, anteriormente nombrada vitrificación y redefinida por Debergh *et al.* (1992), ha sido reportada con mayor frecuencia y es el término empleado para caracterizar las malformaciones hiperhídricas que afectan tanto a las plantas herbáceas como las leñosas durante su propagación vegetativa *in vitro*. Es descrita como un severo desorden fisiológico, según Ziv (1995) causado por la presencia de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de los tejidos. Las hojas y los tallos de las plantas hiperhídricas muestran una apariencia turgente y superficie acuosa, sus órganos son de cierto modo translúcidos, menos verdes y se quiebran con facilidad (Piqueras *et al.*, 1998). Ha sido observado en varias especies y reportado por diferentes autores como Krueger *et al.* (1991); Simonton *et al.* (1991); Berthouly *et al.* (1995).

Para evitar este problema en los medios de cultivo líquido se han hecho diferentes propuestas. Se han desarrollado sistemas de control para alterar factores físico- ambientales cerca del tejido para la producción de menor número de plantas anormales como el aumento de la aireación mediante agitación o burbujeo en el medio de cultivo líquido y han sido diseñados nuevos tipos de biorreactores y sistemas semiautomatizados de cultivo líquido basados en la inmersión parcial y temporal de los explantes (Simonton *et al.*, 1991; Ziv y Shemesh, 1996; Akita y Takayama, 1994a y b; Teisson *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2000).

#### 2.4. Automatización de la micropropagación.

Uno de los problemas a resolver en la producción masiva es el alto costo de producción de plantas mediante el cultivo de tejidos (Levin *et al.*, 1988). El empleo de la automatización reduce los costos, el trabajo manual e incrementa los ritmos de producción así como una mejora en la producción de plantas (Aitken-Christie *et al.*, 1995; Teisson *et al.*, 1996).

Los costos por mano de obra, están comprendidos entre el 70,0 - 80,0% del costo final de las plantas según Wang *et al.* (1999). Mientras que Pérez *et al.* (2000) sugieren que pueden ser calculados entre un 50,0 y 80,0%. Estos costos por mano de obra en la micropropagación han restringido la expansión de la industria para muchas otras especies (Ziv, 1995).

Teniendo en cuenta que los bajos ritmos de producción obtenidos en muchas especies aumentan los costos del proceso, algunos autores como Pérez *et al.* (1998) señalan que la eficiencia está determinada por la etapa de multiplicación y su parámetro fundamental es el coeficiente de multiplicación; indicando que por cada unidad de aumento en el mismo, disminuyen los costos en un 10%, mientras que Zimmerman y Debergh (1991) (citados por Pérez *et al.*, 2000) plantearon que un 10% de aumento en los coeficientes de multiplicación disminuyen los costos totales en un 3,0%.

La micropropagación automatizada en biorreactores puede ser una opción para la micropropagación masiva de plantas vía organogénesis o embriogénesis somática (Preil, 1991 y Leathers *et al.*, 1995) ya que tienen la posibilidad de producir grandes volúmenes de plantas y mayor facilidad de escalado, los brotes están siempre en contacto con el medio de cultivo y por tanto la absorción de nutrientes y la tasa de crecimiento se ven estimulados y están diseñados con un sistema computarizado que brindan las máximas oportunidades para el monitoreo y el control de las condiciones microambientales (Jiménez y de Fera, 1998).

El empleo de los biorreactores fue reportado por primera vez en la producción masiva de brotes de Begonias por Takayama y Mizawa en 1981. Desde entonces se han empleado para la producción de brotes, bulbos, microtubérculos y cormos de varias especies.

Aitken-Christie y Davies (1988) diseñaron un sistema semi-automatizado en el cual los brotes de pino se cultivaron en recipientes de policarbonato. Los brotes se desarrollaron en medio solidificado con agar. La adición y eliminación de los nutrientes se controlaron por bombas peristálticas y un reloj de tiempo programable.

Otro sistema automático fue desarrollado por Weather *et al.* (1988) basado en la aspersión del medio de cultivo nombrado "Mistifier". Este sistema consistió en la aplicación de una niebla fina de nutrientes, la cual se produjo por un transductor ultrasónico sumergido. Los

tejidos asperjados crecieron sobre un soporte poroso que facilitó el drenaje del exceso de medio de cultivo.

En 1988, Levin *et al.* describieron un proceso integral de micropropagación con el empleo de biorreactores hasta la plantación en el suelo. Los brotes son separados y distribuidos a recipientes de cultivo automáticamente por un bioprocesador y enraizados para luego ser transplantados de forma mecanizada. Según estos autores, el sistema fue aplicado exitosamente en 14 especies, tanto para la producción de plantas, como bulbos, microtubérculos, lográndose reducir los costos en un 60% comparado con los métodos convencionales de cultivo de tejidos.

Un modelo de biorreactor con aireación y sin agitación mecánica fue empleado por Akita *et al.* (1994) para la propagación de brotes múltiples de *Stevia rebaudiana*. Con ello se logró un rendimiento total de 64,6 Kg de brotes a partir de 460 g de inóculo. Recientemente, Akita y Ohta (1996) diseñaron un modelo de biorreactor de 10 L de capacidad con un cilindro rotatorio central para la propagación de cormos de *Colocasia esculenta*.

Los problemas actuales de los sistemas automatizados para la organogénesis están dados principalmente por la hiperhidricidad y el desarrollo anormal de las plantas en medios líquidos así como el elevado capital necesario para la inversión (alto costo de los equipos) y los altos costos de mantenimiento (Jiménez, 2001).

#### 2.4.1. Sistemas de Inmersión Temporal.

Otros recipientes más baratos han sido desarrollados basados en la adición y remoción del medio de cultivo líquido evitando en gran medida los problemas de hiperhidricidad. Aunque muchos han sido nombrados “biorreactores”, no cumplen con tal definición por no estar equipados para la medición y el control de los parámetros ambientales (Jiménez y de Feria, 1998).

Esta técnica se desarrolló con los objetivos de reducir los problemas de asfixia e hiperhidricidad, los daños mecánicos, la complejidad del equipamiento así como lograr un aumento en la eficiencia de la micropropagación dado por el incremento de los ritmos de producción y la calidad de los propágulos (Alvard *et al.*, 1993; Teisson y Alvard, 1994; Escalona, 1999). El sistema provee a todos los explantes de un contacto con el medio de cultivo durante un período de tiempo muy corto con una determinada frecuencia diaria. Además es de fácil manejo y uso.

En los sistemas de inmersión temporal, intervienen una serie de factores que posibilitan una mejor respuesta fisiológica logrando mayor eficiencia en el cultivo con respecto a los medios estáticos. La duración del tiempo de inmersión tiene gran importancia tanto para la asimilación de los nutrientes como para controlar la hiperhidricidad que puede aparecer en los explantes desarrollados en medios líquidos controlando así la atmósfera interna del vaso de cultivo (Escalona, 1999).

Este factor ha sufrido muchas variaciones en dependencia del cultivo, variedad y el método de propagación que se emplee. Ha sido observado en la microtuberización de la papa que tiempos de inmersión largos (1 hora) han favorecido el proceso (Akita y Takayama, 1994b), mientras que para otras especies como el café, la piña, el banano, tiempos de corta duración favorecen el desarrollo del cultivo (Etienne *et al.*, 1997; Cabasson *et al.*, 1997; Etienne-Barry *et al.*, 1999). Es de interés además la frecuencia de las inmersiones, encontrándose también variedad de respuestas ante el aumento o la disminución de las frecuencias en el día en las especies antes señaladas.

En 1983, Harris y Mason describieron un sistema en el que se combinó la aireación y el medio líquido en *Vitis vinifera*, con 30 seg. de inmersión cada 30 seg. A partir de entonces numerosos sistemas empleando el principio de la inmersión temporal han sido desarrollados. El sistema descrito por Tisserat y Vandercook (1985), consiste en una cámara de cultivo para el crecimiento de las plantas con entrada y salida para los nutrientes, los cuales fueron bombeados por una bomba peristáltica entre 5-10 minutos cada 12 horas y el sistema fue controlado por un microcomputador. Krueger *et al.* (1991) reportan un incremento en el número, peso y tamaño de los brotes de *Amelanchier x grandiflora* sometidos al contacto intermitente durante 5 minutos cada 30 o 60 minutos, con el medio de cultivo en frascos de 7 litros de capacidad. Observó el fenómeno de hiperhidricidad al emplear la menor frecuencia.

Otros sistemas fueron desarrollados empleando unidades de filtración comerciales Nalgene, las cuales fueron modificadas conectando el compartimiento inferior con el superior a través de un tubo de vidrio y colocando un disco poroso en el fondo del compartimiento superior para impedir que los callos, embriones o tejidos fueran a la parte inferior. Al aplicar una presión de aire en la parte inferior se hace subir el medio de cultivo que baña periódicamente los explantes, de acuerdo a un programa predeterminado que es controlado mediante un programador y válvulas solenoides (Teisson y Alvard, 1994).

Los recipientes de inmersión temporal comercialmente denominados RITA fueron diseñados en el laboratorio Biotrop del CIRAD en Montpellier a partir de este principio (Teisson *et al.*,

1996) y han sido utilizados exitosamente en bananos, cítricos, café, piña, árbol de caucho; en diferentes sistemas de multiplicación (proliferación de meristemos, cultivo de microestacas, desarrollo de embriones a partir de callos, germinación y conversión de embriones somáticos), principalmente para procesos embriogénicos pues para la organogénesis se requiere de recipientes de mayor tamaño y más baratos.

#### 2.4.2. Producción de microtubérculos de papa en sistemas automatizados.

Un biorreactor simple fue desarrollado por Akita y Takayama (1988) para la propagación masiva de microtubérculos de papa con una metodología similar a la utilizada por Estrada *et al.* (1986) con agitación en medio líquido. Este proceso ocurrió en dos fases: primeramente el crecimiento del cultivo de brotes y luego la manipulación de factores físicos, microambientales y químicos para la inducción de la formación de microtubérculos. Determinaron que las respuestas en relación a la tuberización son diferentes en cultivos estáticos y en el biorreactor.

Estos autores en 1994a desarrollaron un esquema para la micropropagación masiva con el empleo de un vaso de biorreactor. En las dos fases que se desarrolló el proceso los explantes se mantuvieron inmersos en el medio de cultivo con aireación y se observó la formación de tubérculos en las partes aéreas, es decir por encima del nivel del medio de cultivo. En el mismo año (1994b) emplearon un sistema de control semicontinuo del nivel del medio. En la inducción y desarrollo de los microtubérculos transfirieron el medio del vaso de reserva al vaso de cultivo cada seis horas retirándolo a la hora, permitiendo que todos los explantes fueran sumergidos completamente a intervalos.

Un sistema automatizado con reconocimiento de imágenes fue descrito por Alchanatis *et al.* (1994) para evaluar la morfología y los cambios de color en el cultivo de plantas de papa al emplear diferentes concentraciones de ancymidol. Con 0,25 mg/L se obtuvieron los mejores resultados que se requieren para la automatización de la micropropagación masiva. La longitud entre los nudos fue suficientemente grande y el contraste de color entre hojas y tallos fue significativamente mejorado así como el número de yemas/planta fue superior al control.

Ziv y Shemesh (1996) a partir de segmentos nodales de papa desarrollaron brotes en clusters utilizando ancymidol en cultivos en medio líquido en agitación y biorreactor. Estos formaron tubérculos después de un subcultivo a un medio inductor con kinetina, ancymidol y 6,0% de sacarosa. El número de tubérculos por cluster y el tamaño de estos fueron superiores en medio sólido sobre el que fue añadida una capa de medio líquido, en relación al cultivo en medio líquido en agitación y en el biorreactor.

Es reportado por Ziv *et al.* (1998) el empleo de un biorreactor muy barato para la proliferación de brotes en clusters de papa. Este está diseñado con una configuración cónica con un puerto de inoculación y cosecha y con accesorios de múltiples usos. La agitación es mediante flujo de aire conocido como “airlift”. Los brotes en clusters obtenidos según Ziv y Shemesh (1996) fueron inoculados en el biorreactor y después de 25 - 30 días desarrollaron hasta 30-32 yemas/cluster. Fueron cultivados en un medio de cultivo sólido de inducción al que se le añadió una capa de medio líquido. Luego de 8-10 semanas, por 10,0 g de peso fresco inoculado se obtuvieron 36 tubérculos de un peso fresco que osciló entre 392 – 672 mg.

Akita y Ohta (1998) desarrollaron un sistema simple y barato con el empleo de un biorreactor sin aireación forzada. Los explantes fueron cultivados en condiciones estáticas durante la fase de crecimiento colocados sobre un soporte de poliuretano. Luego de 1 mes el medio de cultivo fue reemplazado por el medio inductor de la tuberización con 90,0 g/L de sacarosa. El vaso de cultivo fue colocado en un cilindro plástico, el cual fue continuamente rotado a 1 rpm durante el período de duración de esta segunda fase (3 meses). El número y peso fresco total de los tubérculos se incrementó en 1,45 y 2,43 unidades comparado con el cultivo sin rotación, respectivamente.

Un sistema nombrado como “Doble RITA” fue descrito por Teisson y Alvard (1999). La producción de microtubérculos fue evaluada en tres cultivares (Bintje, Ostara y Desirée) obteniéndose a las 10 semanas de cultivo 1,5; 2,3 y 1,4 número de microtubérculos por planta respectivamente. En relación al tamaño de los microtubérculos, el 50,0% tenían un peso superior a 0,5 g.

Recientemente, Yu *et al.* (2000) señalan la producción de microtubérculos en un biorreactor rotatorio. Al reemplazar el 75,0% del medio de cultivo cada dos semanas lograron aumentar el número de microtubérculos de 1,0 g de peso fresco en comparación con el cultivo control. Determinaron que la producción de microtubérculos de mayor tamaño en el biorreactor, se obtiene con un adecuado suministro de sacarosa en la fase de desarrollo de los microtubérculos.

Es reportado por varios autores que la calidad de plantas y microtubérculos producidos en sistemas semiautomatizados o automatizados es mejor que los producidos por métodos convencionales (Teisson y Alvard, 1994; Aitken-Christie *et al.*, 1995). Los nuevos desarrollos en análisis de imagen, robot, biorreactores, máquinas de encapsulación, control del

crecimiento y desarrollo de plantas y el control de la atmósfera pueden contribuir a mejorar los sistemas automatizados para el cultivo de tejidos de plantas en el futuro.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Biorreactores del Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas y en la Estación Experimental “Pedro Lantigua” de Remedios, Villa Clara durante el período comprendido entre Enero 1997 y Abril 1999.

#### Procedimientos generales

**Material vegetal:** Se utilizaron vitroplantas de papa (*S. tuberosum* L.) de las variedades Atlantic y Desirée establecidas según el protocolo descrito por Espinoza *et al.* (1992) que se encontraban en fase de crecimiento entre un 3<sup>er.</sup> y 7<sup>mo.</sup> subcultivo. Como explante se consideró una sección nodal que incluye una yema axilar con la hoja. Las manipulaciones de los explantes se realizaron bajo condiciones de asepsia empleando una cámara de flujo laminar horizontal, platos metálicos esterilizados en estufa a 180°C durante dos horas e instrumental desinfectado por inmersión en hipoclorito de sodio al 1% durante 15 minutos.

**Medios de cultivo:** Para el crecimiento de los explantes se empleó el medio de cultivo compuesto por las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962) complementado con 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mioinositol y 2,0% de sacarosa; en el caso de los medios semisólidos se gelificaron con Agar a razón de 7,0 g.L<sup>-1</sup>. Para la fase de inducción de la microtuberización se utilizó un medio de similar composición en estado líquido, pero con un incremento en la concentración de sacarosa (8,0%) según la metodología propuesta por Agramonte *et al.* (1996). El pH fue ajustado a 5,8 previo a la esterilización. Para el caso de los medios en estado semisólido la esterilización se realizó durante 20 minutos en autoclave vertical a una temperatura de 121°C y 1,2 Kg.cm<sup>-2</sup> de presión; mientras que para los sistemas de inmersión temporal (a los cuales se hará referencia en lo adelante como SIT) el tiempo de esterilización varió en dependencia del volumen de medio de cultivo utilizado, condición esta que se especifica durante la descripción de cada experimento.

**Condiciones de cultivo:** En todos los experimentos los explantes se incubaron en cámaras de crecimiento de luz artificial con un fotoperíodo de 16 horas luz, una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 42,0-48,0  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  y temperatura de 20±2,0°C. La fase de inducción de la tuberización tuvo una duración de 40 días, la misma se realizó en condiciones de completa oscuridad con una temperatura de 20±2,0°C.



Para detectar posibles microorganismos contaminantes presentes en el material se desarrolló una fase de testaje, para ello los explantes fueron colocados en frascos plásticos denominados “tarrinas” con 25 mL de medio de cultivo líquido (Figura 1A) y una densidad de inóculo de 20 explantes. Este material se mantuvo por cinco días en condiciones de agitación (100 rpm) (Figura 1B) y en cámaras de crecimiento de luz artificial con un fotoperíodo de 16 horas luz, una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de  $42,0-48,0 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  y temperatura de  $20\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ . Los explantes libres de microorganismos contaminantes fueron empleados como inóculo para los experimentos.

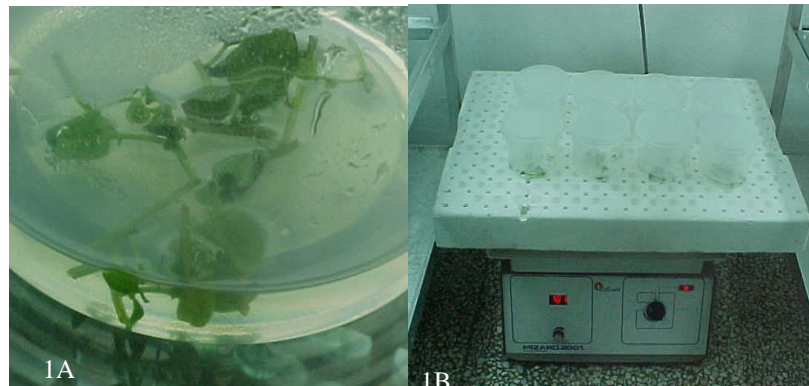


Figura 1. Desarrollo de la fase de testaje de explantes de papa var. Atlantic en frascos plásticos “tarrinas”(1A) en cámara de crecimiento de luz artificial en agitador orbital a 100 rpm (1B).

Los diferentes sistemas de cultivo en medios líquidos empleados en los experimentos fueron sometidos a una fase de testaje antes de la inoculación. Estos sistemas se mantuvieron funcionando durante tres días previo a la inoculación, con el objetivo de favorecer el desarrollo de cualquier posible microorganismo contaminante que se introdujera como resultado de los manejos realizados después de la esterilización. De esta forma se estableció tanto para el material vegetal como para los diferentes tipos de sistemas con medios líquidos, un mecanismo de control para disminuir las pérdidas por posibles contaminaciones.

### 3.1. Efecto del control semicontinuo del nivel del medio de cultivo y la inmersión temporal en la microtuberización.

Este estudio se realizó con el objetivo de comparar el efecto de dos métodos de cultivo en medios líquidos, primero el control semicontinuo del nivel del medio de cultivo descrito por Akita y Takayama (1994b) y segundo la inmersión temporal, en la producción de microtubérculos de papa de la variedad Atlantic.

Tratamiento 1: corresponde al método de cultivo propuesto por Akita y Takayama (1994b) empleado para la estimulación de la microtuberización mediante el control semicontinuo del nivel del medio de cultivo, el cual fue modificado. Estas modificaciones realizadas al sistema son en cuanto al tipo de frasco (capacidad de 3 500 mL) y demás aditamentos, con un montaje más simple sin el empleo de vasos de biorreactores, menos costoso y más fácil para el manejo. El proceso ocurre en dos fases según describen Akita y Takayama (1994b), la fase de crecimiento de los explantes y la de inducción de la tuberización.

La primera fase de crecimiento de los explantes ocurre en condiciones de aireación mediante burbujeo constante permaneciendo los explantes en contacto continuo con el medio de cultivo (Figura 2), durante 21 días. Se utilizó un volumen de 500 mL de medio de cultivo líquido descrito en procedimientos generales esterilizado durante 25 minutos.



Figura 2. Explantes de papa var. Atlantic cultivados en contacto continuo con el medio de cultivo líquido durante la fase de crecimiento, según proponen Akita y Takayama (1994b).

En la inducción de la tuberización (segunda fase) se transfirió al frasco de cultivo, 3 000 mL de medio de cultivo, con una frecuencia de cuatro veces al día y una duración de inmersión de dos minutos según estudios previos, a diferencia de la hora de inmersión propuesta por Akita y Takayama (1994b).

Tratamiento 2: corresponde a un sistema basado en la inmersión temporal de los explantes empleado durante las fases de crecimiento de los explantes y la de inducción de la tuberización.

El sistema de inmersión temporal (Figura 3), estuvo conformado por dos frascos de cristal de 3 500 mL de capacidad, uno para el crecimiento de los explantes (1) y el otro como reservorio de medio de cultivo (2). Estos frascos se conectaron entre sí por una manguera de silicona de

6 mm de diámetro (3) mediante conectores de vidrio que atraviesan la tapa (4). En la parte interna de la misma se coloca una manguera menos flexible (5), la cual desciende hasta el fondo en ambos recipientes sin suspenderse junto con los explantes y el medio de cultivo al momento de la inmersión. El medio de cultivo circula de un frasco a otro en dependencia de la apertura o cierre de dos electroválvulas de tres vías (6), las cuales están conectadas a un temporizador programable (7) para determinar la frecuencia y duración de la inmersión. A la entrada de los frascos se colocan filtros hidrofóbicos (0,22  $\mu\text{m}$ , Midisart 2000, Sartorius AG) para garantizar la esterilidad del aire (8), la presión del aire es regulada por un manómetro (9). El compresor de aire con encendido automático (10) tendrá una capacidad del tanque en función del número de unidades que se utilicen.

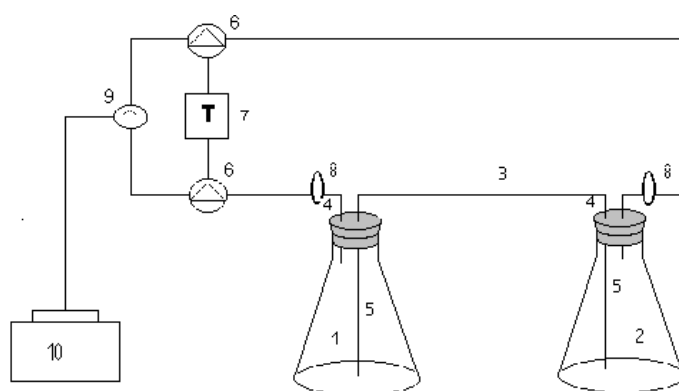


Figura 3. Diagrama que integra los diferentes componentes de un sistema de cultivo líquido basado en la inmersión temporal.

Se utilizó un volumen de 2 000 mL de medio de cultivo durante la fase de crecimiento y al término de la misma (21 días) fue sustituido por el medio de cultivo para la inducción de la tuberización a razón de 3 000 mL por sistema.

Los explantes durante la fase de crecimiento se desarrollaron en contacto intermitente con el medio de cultivo con una frecuencia de ocho inmersiones por día, con dos minutos de duración en la fase de crecimiento. Durante la segunda fase se redujo a cuatro el número de inmersiones diarias con igual tiempo de inmersión (dos minutos). La frecuencia y el tiempo de inmersión en cada fase fueron definidos según estudios previos.

Cada sistema de cultivo en medio líquido fue inoculado con 50 explantes provenientes del material testado y libre de microorganismos contaminantes y el medio de cultivo empleado en cada fase es el descrito en procedimientos generales. Este experimento tuvo cuatro repeticiones por cada tratamiento.

Se determinó el momento en que aparecieron los primeros microtubérculos en el transcurso de la segunda fase. Al momento de la cosecha (61 días de cultivo), se evaluó el número y peso fresco total de los microtubérculos por sistema, el número de microtubérculos por planta, así como el peso fresco (g) y el diámetro (mm). Los microtubérculos obtenidos se clasificaron en tres calibres (menores que 4,0 mm; de 4,0 mm-7,0 mm y mayores que 7,0 mm), determinándose el porcentaje de microtubérculos por cada calibre. Se evaluó además la aparición de microtubérculos deformados.

### 3.2. Efecto de la inmersión temporal en el crecimiento de los explantes y en la producción de microtubérculos en las variedades Desirée y Atlantic.

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de los sistemas de inmersión temporal de manera comparativa con la metodología propuesta por Agramonte *et al.* (1996) en medios de cultivo semisólidos. Se utilizaron para esto, plantas *in vitro* de las variedades Desirée y Atlantic.

Se empleó el principio básico de los sistemas de inmersión temporal, descrito en el tratamiento 2 del epígrafe anterior, pero utilizando frascos de cristal de 5 000 mL de capacidad con tapa roscada (Figura 4). La densidad de inóculo fue de 50 explantes por frasco. Se mantuvieron las condiciones experimentales con ocho inmersiones por día de dos minutos de duración durante la fase de crecimiento y cuatro inmersiones por día con dos minutos de duración en la fase de inducción de la tuberización.

El volumen del medio de cultivo para el crecimiento de los explantes fue de 2 000 mL, el cual fue cambiado a los 21 días por 4 000 mL de medio de cultivo inductor de la tuberización.



Figura 4. Sistema de inmersión con el empleo de frascos de cristal con tapa roscada de 5000 mL de capacidad.

Tratamiento control en medio semisólido: Se emplearon frascos de cristal de 250 mL de capacidad con 30 mL de medio de cultivo semisólido de multiplicación, se colocaron siete explantes por frasco y se incubaron en cámaras de crecimiento de luz artificial con un fotoperíodo de 16 horas luz, una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 42,0-48,0  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  y  $20\pm 2,0^{\circ}\text{C}$  de temperatura. A los 21 días las vitroplantas fueron colocadas en nuevos frascos con 25 mL de medio de cultivo líquido para la inducción de la tuberización según Agramonte *et al.* (1996) en condiciones estáticas e incubadas a la oscuridad durante 40 días con temperatura de  $20\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ .

La calidad de las vitroplantas fue evaluada mediante la determinación de la altura y el número de entrenudos por planta al término de la primera fase (21 días). Al momento de la cosecha se evaluó el número de microtubérculos por planta, así como el peso fresco (g) y el diámetro (mm) promedios. Los microtubérculos obtenidos se clasificaron en tres calibres (menores que 4,0 mm; de 4,0 mm-7,0 mm y mayores que 7,0 mm), determinándose el porcentaje de microtubérculos por cada calibre.

En los sistemas de inmersión temporal se utilizaron cuatro repeticiones y para el tratamiento control en medios de cultivo semisólidos 20 frascos.

### 3.3. Influencia de la densidad de inóculo.

A partir de los resultados obtenidos en los SIT con condiciones predeterminadas por la experiencia en el manejo de los mismos, se estudió la densidad de inóculo con el objetivo de mejorar las condiciones de cultivo así como la calidad del proceso. Se evaluó la influencia de dos densidades de inóculo; 60 y 90 explantes en la producción de microtubérculos con cuatro repeticiones por tratamiento.

El sistema de cultivo líquido empleado es el descrito en el tratamiento 2 del epígrafe 3.1 y las condiciones de cultivo fueron las empleadas en los experimentos anteriores al utilizar esta técnica.

El volumen de medio de cultivo en la fase de crecimiento de las vitroplantas fue de 2 000 mL por SIT y al término de esta fase (21 días) fue sustituido por el de inducción de la microtuberización a razón de 3 000 mL en ambos tratamientos.

Se mantuvieron ocho inmersiones diarias de dos minutos durante 21 días, momento en el cual se redujo a cuatro la frecuencia de inmersiones diarias con igual tiempo de inmersión durante 40 días.

Se evaluó el momento en que aparecieron los primeros microtubérculos en el transcurso de la segunda fase. Al momento de la cosecha (61 días de cultivo), se evaluó el número y peso total de los microtubérculos por sistema, el número de microtubérculos por planta, así como el peso fresco (g) y el diámetro (mm). Se evaluó además la aparición de microtubérculos deformados. Como variable cualitativa de la calidad de las vitroplantas y microtubérculos se consideró el color y el aspecto de los mismos.

#### 3.4. Influencia del tiempo de inmersión.

Este experimento se realizó con el objetivo de mejorar las condiciones de cultivo así como la calidad del proceso de microtuberización.

El sistema de cultivo líquido empleado es el descrito en el tratamiento 2 del epígrafe 3.1 con frascos de cristal de 3 500 mL de capacidad. Se utilizaron 60 explantes por sistema como densidad de inóculo por ser el mejor resultado en el experimento anterior. Durante la primera fase (crecimiento de los explantes), estos fueron incubados a la luz artificial y en la segunda fase a la oscuridad, acorde a las condiciones señaladas en procedimientos generales.

El volumen de medio de cultivo en la fase de crecimiento de las vitroplantas fue de 2 000 mL por SIT y al término de esta fase (21 días) fue sustituido por el de inducción de la microtuberización a razón de 3 000 mL en ambos tratamientos.

Durante la fase de crecimiento los explantes fueron mantenidos bajo una frecuencia de ocho inmersiones diarias de dos minutos de duración.

En la fase de inducción de la microtuberización se evaluaron dos tiempos de inmersión, dos y 30 minutos manteniendo la frecuencia cada seis horas en ambos tratamientos (cuatro inmersiones diarias).

Se emplearon cuatro repeticiones por tratamiento y se evaluaron las mismas variables de los experimentos anteriores. Como variable cualitativa de la calidad de los microtubérculos se consideró el aspecto de los mismos.

#### 3.5. Producción de microtubérculos de papa a gran escala.

El escalado de la producción de microtubérculos se realizó sobre la base de los experimentos anteriores. Además, se tuvo en cuenta las experiencias en el manejo a menor escala de los SIT empleando diferentes frascos de cultivo en cuanto a forma y volumen.

Para realizar el diseño de la unidad de producción con sistemas de inmersión temporal se utilizaron 12 sistemas con frascos de cultivo del tipo Clearboys (Nalgene, USA) de 10,0 L de capacidad, con tapa roscada y puertos de entrada y salida para el aire y el medio de cultivo como muestra la figura 5.



Figura 5. Unidad de producción con sistemas de inmersión temporal para la producción de microtubérculos de papa var. Atlantic.

Cada SIT fue inoculado con 120 explantes de la variedad Atlantic provenientes del material testado en medios líquidos en agitación. Para el crecimiento de los mismos se utilizó el medio de cultivo anteriormente descrito para este fin. Se empleó un volumen de 4 000 mL por sistema, esterilizado durante 35 minutos. Se mantuvieron las condiciones de temperatura y fotoperíodo descritas en los experimentos anteriores durante 21 días de cultivo.

Para la etapa de inducción de la microtuberización se utilizaron 9 000 mL de medio de cultivo por sistema y las vitroplantas fueron mantenidas en condiciones de oscuridad durante 40 días hasta realizar la cosecha.

Las variables evaluadas fueron el número y peso fresco total de microtubérculos por sistema y el número promedio por planta así como el peso fresco y calibre de los mismos.

Los microtubérculos cosechados fueron lavados con agua corriente hasta eliminar los restos de cosecha, fueron sumergidos en una solución de Hipoclorito de sodio al 0,01% durante 10 minutos y luego secados al aire según Agramonte *et al.* (1996). Se conservaron durante nueve meses a temperaturas de 4-6°C en una cámara de frío y posteriormente fueron utilizados para el experimento de campo.



### 3.6. Comportamiento en campo de los microtubérculos obtenidos en los sistemas de inmersión temporal.

Este experimento se realizó con el objetivo de evaluar el comportamiento en campo de los microtubérculos de la variedad Atlantic obtenidos en los SIT en el experimento anterior, sin previa etapa de aclimatización.

Previo a la plantación, los microtubérculos fueron sumergidos en una solución de Ácido Giberélico ( $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ ) durante cinco minutos, posteriormente fueron ventilados y colocados a la oscuridad durante siete días y luego a la luz natural difusa con humedad relativa entre 80-90% y temperatura de  $25 \pm 1,0^\circ\text{C}$ . Transcurridos 28 días se sembraron directamente en condiciones de campo sobre un suelo ferralítico rojo (Figura 6A).

Se incluyó como control la siembra de vitroplantas obtenidas por el método convencional de micropropagación (Figura 6B). Las vitroplantas fueron aclimatizadas durante 15 días bajo un umbráculo cubierto por una malla plástica (Zarán), con la cual se logró una reducción de la intensidad luminosa del 70%. Se utilizaron bandejas de polieturano y como sustrato fue empleado el Compost 100% (Agramonte, 1999).

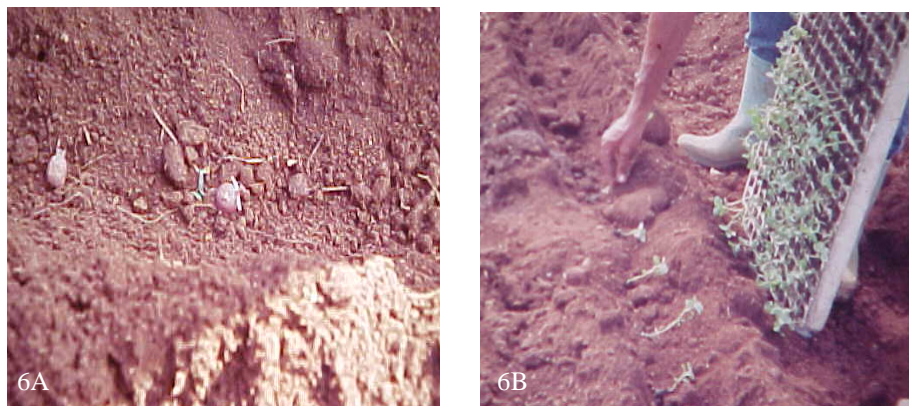


Figura 6. Siembra en campo de diferentes propágulos de papa var. Atlantic, microtubérculos obtenidos en los sistemas de inmersión temporal (6A); Vitroplantas propagadas por el método convencional y aclimatizadas durante 15 días (6B).

Se empleó un diseño de bloques al azar con cuatro réplicas. Las parcelas experimentales estaban formadas por cuatro surcos con un total de 120 vitroplantas o microtubérculos por réplica, la distancia de plantación utilizada fue de  $0,90 \times 0,20 \text{ m}$  según la metodología propuesta por Pérez (1991). La agrotecnia y las aplicaciones de productos comerciales se realizaron según las Normas Técnicas para este cultivo (1982).



Se evaluó el porcentaje de supervivencia a los 15 y 35 días, se determinó además la altura (cm) y el número de tallos por planta a los 45 días de cultivo. La cosecha se realizó de forma manual a los 70 días y se evaluó el número de minitubérculos por planta, el peso fresco por planta (g) y diámetro de los minitubérculos a 60 plantas ubicadas en los surcos internos, para un total de 240 plantas por tratamiento.

#### Procesamiento estadístico

Para el procesamiento estadístico de los resultados de los experimentos realizados fue empleado el análisis de varianza de clasificación simple, denominado ONEWAY, luego de realizar la Prueba de homogeneidad de varianzas. Se empleó el paquete estadístico computacional SPSS/PC versión 9,0 para Windows.

Para el análisis de las variables de porcentajes determinados al clasificar los microtubérculos según el calibre, se utilizó la Prueba de Hipótesis para proporciones binomiales mediante el Paquete estadístico Statgraphics versión 2,1.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Efecto del control semicontinuo del nivel del medio de cultivo y la inmersión temporal en la microtuberización.

El método de cultivo propuesto por Akita y Takayama (1994b) y la inmersión temporal, resultaron ser efectivos en la oxigenación de los tejidos evitando la muerte de los mismos por hipoxia. Las yemas brotadas durante la fase de testaje, mostraron un crecimiento más lento durante la primera semana de cultivo en el tratamiento 1 pues permanecieron en contacto continuo con el medio, con respecto al tratamiento 2 donde este proceso ocurrió con mayor rapidez. En ambos sistemas las plantas se desarrollaron, aunque se observaron síntomas de hiperhidricidad como la alteración en el color de las hojas, grosor del tallo y apariencia ligeramente turgente. Akita y Ohta (1998) plantean que se requiere de una aireación vigorosa para estimular el crecimiento de las plantas con el inconveniente para la micropropagación masiva de que es muy costosa.

Las plantas cultivadas en ambos tratamientos mostraron respuestas distintas durante la fase de inducción de la tuberización. Las plantas desarrolladas en el tratamiento 1 (método Akita y Takayama, 1994b) tardaron 14 días en formar microtubérculos. Se logró una producción de 90 microtubérculos por sistema con un peso fresco total de 55,80 g, mientras que las vitroplantas desarrolladas en los SIT formaron los primeros microtubérculos a los seis días de cultivo y produjeron 147 microtubérculos con un peso fresco total de 132,30 g por sistema. Los microtubérculos obtenidos en el tratamiento 1 mostraron menores calibres y pesos con respecto a los obtenidos en el segundo tratamiento, con diferencias estadísticas para las variables evaluadas como muestra la Tabla 1.

Tabla 1. Efecto del control semicontinuo del nivel del medio de cultivo (Akita y Takayama, 1994b) modificado y la inmersión temporal como métodos de cultivo en medios líquidos, en la microtuberización de la papa var. Atlantic.

<b>Variables</b>	<b>Tratamiento 1</b> <b>X±ES</b>	<b>Tratamiento 2</b> <b>X±ES</b>
Nº de microtub./planta	1,80±0,06 b	2,93±0,08 a
Peso fresco promedio (g)	0,62±0,07 b	0,90±0,06 a
Diámetro promedio (mm)	8,70±0,03 b	11,80±0,03 a

*Letras distintas en una misma fila difieren estadísticamente para  $p < 0,05$ .*

Las yemas que permanecieron inmersas en el medio de cultivo no formaron microtubérculos, mientras que la tuberización ocurrió en las partes de las plantas que fueron expuestas a una fase aérea durante el crecimiento. Akita y Takayama (1988) al emplear un sistema de contacto continuo con aireación encontraron que la tuberización sólo es observada en la superficie del medio de cultivo y se inhibe claramente en las yemas que permanecen en continua inmersión coincidiendo con nuestros resultados.

Akita y Takayama (1994a) estiman la presencia de un factor estimulante de la tuberización en la fase aérea aunque aún no ha sido dilucidado. Akita y Ohta (1998) consideran que el desarrollo de yemas durante el crecimiento de los explantes en la parte aérea del vaso es un prerrequisito para la propagación exitosa de tubérculos *in vitro*. El principal problema radica en la sensibilidad de los brotes a la hiperhidricidad cuando crecen y se desarrollan en contacto directo con el medio líquido (Shigeoka *et al.*, 1994).

Respecto a los porcentajes obtenidos según la clasificación de los microtubérculos (menores que 4,00 mm, 4,00 mm-7,00 mm y mayores que 7,00 mm) no hubo diferencias estadísticas para cada calibre entre los tratamientos. El menor porcentaje se obtuvo en los microtubérculos con diámetro menor que 4,00 mm, los que son muy susceptibles a la deshidratación durante el almacenamiento y difíciles de brotar aún con sustancias químicas según Ezeta (1999).

Se logró más de un 95% de microtubérculos aprovechables (calibre superior a 4,0 mm con facilidad en el manejo, la conservación y la brotación) en ambos tratamientos. Resultados similares son señalados por Akita y Takayama (1994b) con el empleo de biorreactores, quienes muestran que el control semicontinuo del nivel del medio de cultivo en la fase de inducción de la tuberización, tuvo como resultado un incremento en la formación de microtubérculos de buen tamaño con un peso superior a 0,20 g.

En el tratamiento 1 los microtubérculos obtenidos presentaron una consistencia acuosa y sin calidad para la comercialización ni para una buena conservación. Esto se debió posiblemente a la menor calidad de las vitroplantas que se desarrollaron en contacto continuo con el medio de cultivo y con aireación vigorosa, en comparación con las desarrolladas en el tratamiento 2. El empleo de la inmersión temporal en la segunda fase no fue suficiente para reducir las anomalías producidas en la consistencia y calidad de los microtubérculos, lo que muestra la influencia de las condiciones de cultivo durante el desarrollo y crecimiento de las plantas.

Además, en el tratamiento 1 se observó la aparición de microtubérculos deformados (15%) aspecto negativo e indeseable, no ocurriendo así en el segundo tratamiento (inmersión temporal), donde los microtubérculos presentaron una calidad superior.

En el cultivo de la piña Escalona (1999) evaluó tres conformaciones de sistemas de cultivo líquido: inmersión total de los brotes con aireación constante, inmersión parcial e inmersión temporal. Los mejores resultados los alcanzó con la inmersión temporal mientras que con la inmersión total con aireación constante el 100% de los brotes presentaron un alto grado de hiperhidricidad y necrosamiento.

Ha sido señalado por Ziv (1995) y Aitken-Christie *et al.* (1995) que los sistemas de cultivo en medios líquidos en condiciones no estáticas ya sea mediante aireación constante o parcial permiten un mejor intercambio gaseoso. No obstante, la aireación vigorosa y la continua inmersión en el medio líquido provocó afectaciones en el proceso de microtuberización según indican los resultados. La inducción de la microtuberización está fuertemente influenciada por las condiciones de cultivo en la fase de crecimiento de las plantas. En los SIT se conjugan factores que permiten la renovación de la atmósfera, un aporte más eficiente de elementos nutritivos, la eliminación de sustancias tóxicas, así como un mejor intercambio gaseoso (Teisson *et al.*, 1996). Estas condiciones provocan en las plantas cambios fisiológicos favorables al proceso de microtuberización, una mayor estimulación en las yemas para formar microtubérculos así como un aumento considerable en la calidad de los mismos expresada en peso fresco y calibre, en relación al método de cultivo propuesto por Akita y Takayama (1994b). Además tiene como ventaja el evitar el fenómeno de hiperhidricidad.

El no emplear vasos de biorreactores en un sistema semiautomatizado, tiene como ventaja la disminución en los costos iniciales, además que permite una mayor facilidad en la instalación y el manejo de los mismos en relación a las tecnologías más complejas empleando biorreactores modificados para el cultivo de plantas como proponen Akita y Takayama (1994b).

Para los siguientes experimentos, se seleccionó el sistema de inmersión temporal como el más adecuado para la semiautomatización de la producción de microtubérculos de papa con un montaje más simple y fácil para el manejo, menos costoso y con un aumento en los niveles de producción.

4.2. Efecto de la inmersión temporal en el crecimiento de los explantes y en la producción de microtubérculos en las variedades Desirée y Atlantic.

Las plantas cultivadas en los SIT incrementaron la altura en aproximadamente tres veces y el número de entrenudos en más de dos veces comparadas con las plantas cultivadas en el medio de cultivo semisólido, efecto que se observó en ambos genotipos, siendo más notable en la variedad Desirée (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la inmersión temporal en el crecimiento de las plantas de papa vars. Desirée y Atlantic a los 21 días de cultivo.

Variables	Desirée		Atlantic	
	Medio semisólido	Inmersión temporal	Medio semisólido	Inmersión temporal
	X±ES	X±ES	X±ES	X±ES
Altura promedio (cm)	6,50 ± 0,11 b	22,50 ± 0,41 a	6,60 ± 0,14 b	19,50 ± 0,15 a
No. de entrenudos	4,50 ± 0,20 b	11,50 ± 0,18 a	4,50 ± 0,20 b	9,50 ± 0,13 a

*Letras distintas en una misma fila para cada variedad difieren estadísticamente para  $p < 0,05$ .*

En estos resultados influye el hecho de que el medio de cultivo líquido a diferencia del medio de cultivo semisólido permite un aumento en la incorporación de los nutrientes, Ávila *et al.* (1996) muestran resultados que corroboran esta idea. La influencia del agar en el medio de cultivo puede ser explicado por su efecto en la reducción de la velocidad a la cual los nutrientes son difundidos en el medio (Pierik, 1990). Además, algunos cultivos responden negativamente a la adición de gelificantes cuyas propiedades químicas y de soporte pueden variar con el tiempo (Epp, 1987).

La utilización del medio de cultivo semisólido tiene una serie de inconvenientes en el proceso de preparación, dosificación, manipulación y sobre todo el aumento de los costos del medio de cultivo, que pueden oscilar entre un 70 y 80% (Orellana, 1998).

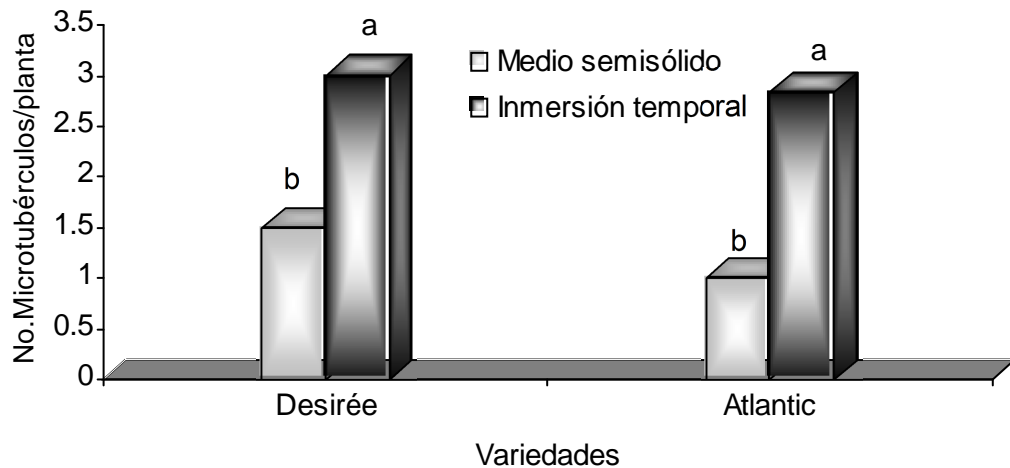
El cultivo en inmersión temporal permite además aumentar el volumen del medio de cultivo líquido por explante sin producir afectaciones como la hiperhidricidad. Este valor (volumen

/planta) según Kozai *et al.* (1995) en métodos convencionales se encuentra entre 4,0 y 10 mL por planta como es el caso del control empleado en este experimento donde la disponibilidad de los nutrientes se encuentra reprimida. En los SIT se empleó 40 mL por planta y al estar el explante recubierto por una fina película de medio renovado con una frecuencia determinada, se redujo considerablemente la disponibilidad limitada de los nutrientes del medio de cultivo que se observa en los medios solidificados. Esta reducción en el agotamiento de los nutrientes esenciales próximo a los explantes y en la acumulación de sustancias tóxicas está dada por una mezcla más completa del medio de cultivo y al aumento de la aireación en los SIT (Harris y Mason, 1983), lo que se traduce en un mayor desarrollo y vigor de las plantas.

Estos sistemas además proveen a los explantes de mejores condiciones de cultivo para su crecimiento, pues el contacto con el medio a una determinada frecuencia y corta duración permite la renovación de la atmósfera interna del frasco y mejora la oxigenación de los tejidos reduciendo las desventajas del medio de cultivo líquido en condiciones estáticas, con lo cual se logra un incremento en la fotosíntesis de las plantas (Akita y Takayama, 1994b; Teisson *et al.*, 1996; Kozai *et al.*, 1997).

De esta forma se demuestran las ventajas del SIT en la fase de crecimiento de las vitroplantas, que asociado o no a la producción de microtubérculos constituye una alternativa a los actuales métodos de propagación de esta especie y puede utilizarse para la propagación de nuevos genotipos o para aumentar la disponibilidad de explantes al inicio de las campañas de propagación.

El incremento del área de la hoja, disponible para recibir el estímulo del fotoperíodo así como la mayor área en contacto con el medio de cultivo logrado al emplear los SIT, pudo contribuir a aumentar la producción de microtubérculos, resultados que coinciden con lo reportado por Leclerc (1994). En la inducción de la microtuberización la inmersión temporal de los explantes estimuló el incremento de las zonas de tuberización de las plantas (yemas), lo cual se expresó en una mayor producción de microtubérculos por planta en ambos genotipos (Figura 7).



*Letras distintas para cada variedad difieren estadísticamente para  $p < 0,05$*

Figura 7. Número de microtubérculos obtenidos por vitroplanta de papa vars. Desirée y Atlantic en medio semisólido y en sistemas de inmersión temporal.

Hay una estimulación más uniforme en todas las yemas de las plantas al estar las mismas en contacto con el medio de cultivo por períodos cortos, lo cual hace que la señal inductora de la tuberización llegue a la vez a todas las yemas. Este efecto no se consigue en los sistemas de cultivo estáticos o en agitadores donde el rendimiento promedio de microtubérculos por planta es uno (Tovar *et al.*, 1985; Rosell *et al.*, 1987; Belletti *et al.*, 1994; Bizarri *et al.*, 1995). Semejante observación había sido realizada con anterioridad por Akita y Takayama (1994b), al señalar que se logró aumentar las zonas de tuberización con el empleo de un sistema de cultivo intermitente donde los explantes fueron sumergidos completamente en el medio de cultivo cada seis horas.

Investigadores como Belletti *et al.* (1994), encontraron que el limitado número de microtubérculos por planta (en un rango entre 0,46 y 0,84 según el genotipo) producido en un medio libre de reguladores del crecimiento en cultivos estáticos así como el bajo peso fresco de los mismos (0,07 y 0,19 g), dependió principalmente del genotipo estudiado.

Pudo constatarse que se indujo la formación de tubérculos en los dos genotipos sin mostrar respuestas diferentes tanto en la metodología convencional (control) como en los sistemas de inmersión temporal. Otros autores como Gopal *et al.* (1998) encontraron que no todos los genotipos estudiados durante la tuberización formaron microtubérculos y mostraron respuestas diferentes, obteniéndose de 0,9 a 2,0 microtubérculos por planta en los genotipos que respondieron positivamente.

En el momento de la cosecha se observó que los microtubérculos de ambas variedades obtenidos en los SIT fueron de superior calidad manifestada en un mayor peso y diámetro (Tabla 3), mostrando diferencias estadísticas entre los métodos de cultivo empleados para ambas variedades.

Tabla 3. Efecto del medio semisólido y los sistemas de inmersión temporal en la microtuberización de *Solanum tuberosum* L. vars. Desirée y Atlantic.

Variables	Desirée		Atlantic	
	Medio semisólido	Inmersión temporal	Medio semisólido	Inmersión temporal
	X±ES	X±ES	X±ES	X±ES
Peso fresco promedio (g)	0,16 ± 0,01 b	1,04 ± 0,11 a	0,35 ± 0,03 b	0,92 ± 0,08 a
Diámetro promedio (mm)	7,30 ± 0,03 b	10,6 ± 0,05 a	6,90 ± 0,03 b	12,0 ± 0,04 a

*Letras distintas en una misma fila para cada variedad difieren estadísticamente para  $p < 0,05$ .*

El peso fresco de los microtubérculos obtenidos en medios de cultivo en condiciones estáticas es muy bajo en comparación con los obtenidos con el empleo de los SIT. Belletti *et al.* (1994) señalan un peso fresco promedio de 0,09 g, que se incrementa hasta 0,13 g al utilizar reguladores del crecimiento como el BAP en el medio de cultivo. Harvey *et al.* (1991) en la variedad Desirée evaluando varios medios inductivos reportan un máximo de 0,05 g de peso fresco por microtubérculo en un período de 6 semanas.

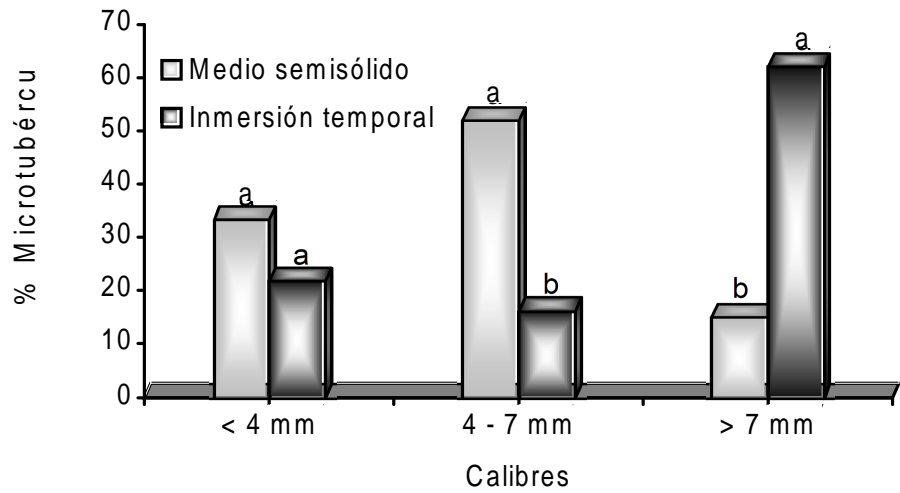
Muchos sistemas han producido microtubérculos con un peso fresco promedio por debajo de 0,50 g y un diámetro promedio menor que 6,00 mm (Tovar *et al.*, 1985; Rosell *et al.*, 1987; Seabrook *et al.*, 1993) y pocos sistemas destacan microtubérculos con un peso fresco promedio superior a 0,50 g, pero menor que 1,00 g (Akita y Takayama, 1994a; Leclerc *et al.*, 1994; Oka y Sluis, 1996).

Las figuras 8 y 9 muestran el porcentaje de microtubérculos clasificados por calibre para los genotipos estudiados. Los mayores porcentajes en el calibre mayor que 7,00 mm se obtuvieron en los sistemas de inmersión temporal, 62,00% en Desirée y 72,00% en Atlantic, mientras que en el tratamiento control fueron 15,00 y 41,00% respectivamente.

Es importante señalar que los microtubérculos con un diámetro mayor que 7,00 mm presentan una mayor resistencia a la conservación, facilidad en la manipulación, una mejor

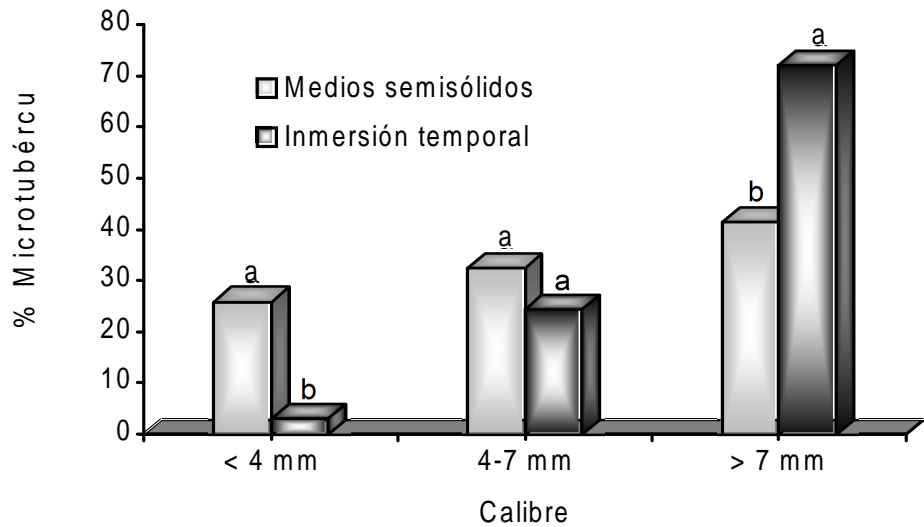


brotación lo que permite la plantación en campo sin necesidad de brotarlos en un área de aclimatización (Belletti *et al*, 1994; Agramonte, 1999).



*Letras distintas para cada calibre difieren estadísticamente para  $p<0,05$*

Figura 8. Porcentaje de los microtubérculos de papa var. Desirée, obtenidos en medio semisólido (n=159) e inmersión temporal (n=155), clasificados según el calibre.



*Letras distintas para cada calibre difieren estadísticamente para  $p<0,05$ .*

Figura 9. Porcentaje de los microtubérculos de papa var. Atlantic, obtenidos en medio semisólido (n=109) e inmersión temporal (n=140), clasificados según el calibre.

El aumento del área vegetativa antes de la inducción de la microtuberización, favorece la producción de microtubérculos y el incremento del peso fresco de los mismos (Garner y Blake, 1989). Esto corrobora las ventajas del empleo de la inmersión temporal en la cual se logra un mayor crecimiento vegetativo durante la fase de crecimiento y por consiguiente un incremento en cuanto al número y el peso de los microtubérculos en comparación con los obtenidos en cultivos estáticos. Por otra parte, cuando los brotes crecen en frascos pequeños, están expuestos a un limitado potencial hídrico y osmótico en el medio de cultivo y un limitado intercambio de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> según Ziv (1995) a diferencia del cultivo en los SIT.

La inmersión temporal ha tenido un efecto muy marcado en el aumento de los coeficientes de multiplicación y la obtención de plantas con mayor calidad con relación a los métodos de cultivo en medios semisólidos o líquidos. Alvard *et al.* (1993) al realizar un estudio comparativo entre diferentes formas de cultivo (semisólido, líquido en agitación e inmersión temporal) señalan un aumento hasta cinco veces los coeficientes de multiplicación de brotes de banano con el cultivo en inmersión temporal. Ventura *et al.* (1998) en el cultivar de banano FHIA 18, determinaron un coeficiente de multiplicación mayor (15,30) que en la propagación convencional (3,70).

En la micropropagación de la caña de azúcar empleando los SIT, Lorenzo *et al.* (1998) señalan un coeficiente de multiplicación de 8,13, mientras que en medio semisólido obtuvo 3,96 y 4,00 en el cultivo en medio líquido. La altura de los brotes se duplicó en los SIT, permitiendo una reducción en los costos en un 46,0%.

Castro (2001) demostró la eficiencia de la inmersión temporal para la propagación *in vitro* de *Eucaliptus grandis*. Obtuvo un coeficiente de multiplicación de 11,60 en relación al 3,60 que se obtiene con el método convencional de micropropagación. Además se obtuvo una mejor calidad de los brotes en cuanto al tamaño y se observó un incremento significativo en las masas fresca y seca de los brotes.

Se demostraron las ventajas de los sistemas de inmersión temporal en comparación con los medios semisólidos tanto para la fase de crecimiento de los explantes como en la inducción de la tuberización, obteniéndose un mayor número de microtubérculos por planta y mayor calidad de los mismos expresada en el diámetro y el peso fresco.

#### 4.3. Influencia de la densidad de inóculo.

En los SIT, debido al mayor volumen en relación a los frascos empleados en la micropropagación convencional, una menor densidad pudiera ocasionar la subutilización de

los recipientes y cámaras de cultivo. Por otra parte densidades elevadas, provocarían malformaciones fenotípicas. De aquí la importancia de valorar experimentalmente este factor aprovechando la capacidad de los recipientes.

Las densidades de inóculo estudiadas no afectaron el desarrollo normal de las vitroplantas, observándose un comportamiento similar en coloración y vigor alcanzado en ambos tratamientos. Autores como Chun *et al.* (1986), Mackay y Kitto (1988) han planteado en varias especies la necesidad de optimizar este parámetro para alcanzar un rápido crecimiento en la micropropagación.

Durante la fase de inducción de la tuberización, en el tratamiento con mayor densidad de inóculo (90 explantes) los tallos presentaron un engrosamiento excesivo y se formaron en la superficie de los mismos callosidades de consistencia acuosa. La coloración de los tallos varió a pardo rojiza y mostraron estrangulamiento en la zona apical. Estos síntomas visuales están precedidos por cambios en la fisiología de los explantes, debido posiblemente a la baja disponibilidad de oxígeno en el interior del recipiente, causando hipoxia. Sin embargo la aparición de microtubérculos en ambos tratamientos ocurrió simultáneamente a los siete días de haberse realizado el cambio de medio de cultivo.

En el tratamiento con 60 esquejes, el número de microtubérculos por sistema fue de 168, menor que el alcanzado en el tratamiento con densidad de inóculo de 90 esquejes donde se obtuvieron 234 microtubérculos. En cuanto al peso fresco total por sistema, se observó un comportamiento diferente. Con 60 esquejes se obtuvieron 164,70 g, superior a los 47,00 g de peso fresco de microtubérculos por sistema alcanzado con 90 esquejes.

El 23,1% del total de microtubérculos obtenidos en el tratamiento con 90 explantes, corresponde a microtubérculos deformados sin calidad. El resto, en su mayoría, manifestaron una consistencia acuosa, base ennegrecida y a la semana de la cosecha se deshidrataron completamente.

En las restantes variables analizadas se muestran diferencias significativas, resultando como mejor tratamiento el de 60 esquejes por frasco, donde el volumen de medio por explante fue mayor y hubo un mejor aprovechamiento de los nutrientes, presentando los microtubérculos una calidad superior expresada en el peso y calibre (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la densidad de inóculo en la microtuberización de papa var. Atlantic a los 61 días de cultivo.

Variables	Densidad de inóculo/sistema	
	X±ES	
	60 esquejes	90 esquejes
Nº de microtub./planta	2,80±0,08 a	2,60±0,08 a
Peso fresco promedio (g)	0,98±0,09 a	0,20±0,01 b
Diámetro promedio (mm)	10,00±0,04 a	5,90±0,01 b

*Letras distintas en una misma fila difieren estadísticamente para  $p < 0,05$ .*

En el cultivar Gran Enano empleando los SIT, Albany (2001) señala que la variable que determina un incremento en el coeficiente de multiplicación, peso de los brotes, peso final y peso útil, es la densidad de inóculo, obteniendo los mejores resultados con 25 explantes.

De Feria *et al.*(1998) recomiendan una densidad de 40 brotes de caña de azúcar por recipiente en los SIT, la cual les permitió obtener mayor coeficiente de multiplicación (10,92) y un peso promedio de 574 mg por brote.

#### 4.4. Influencia del tiempo de inmersión.

La duración del tiempo de inmersión es un aspecto fundamental tanto para la asimilación de los nutrientes como para controlar la hiperhidricidad que puede aparecer en los explantes desarrollados en medio líquido controlando así la atmósfera interna del frasco de cultivo (Escalona, 1999).

La aparición de los microtubérculos se observó a los seis días en el tratamiento con dos minutos y seis días después aparecen en el segundo tratamiento. La tabla 5 muestra el efecto de los tiempos de inmersión evaluados; el contacto de los explantes con el medio de cultivo durante 30 minutos provocó afectaciones al cultivo, mientras que con dos minutos se obtuvieron los mejores resultados. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Akita y Takayama (1994a) y Teisson y Alvard (1999) quienes emplean períodos largos de inmersión (una hora) sin observar afectaciones al cultivo.

Tabla 5. Efecto de la duración del tiempo de inmersión en la microtuberización de papa var. Atlantic a los 61 días de cultivo.

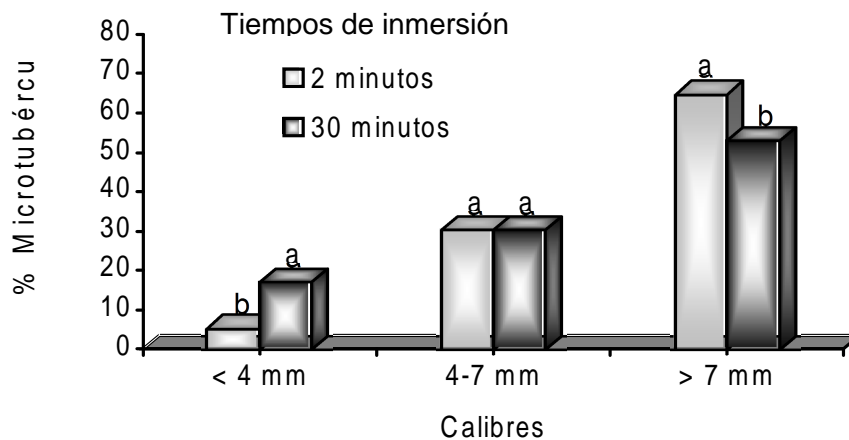
Variables	Tiempos de inmersión	
	X±ES	
	2 minutos	30 minutos
No. de microtub./planta	3,10±0,02 a	2,27±0,03 b
Peso fresco promedio (g)	0,90±0,03 a	0,50±0,03 b
Diámetro promedio (mm)	10,13±0,03 a	7,33±0,03 b

*Letras distintas en una misma fila difieren estadísticamente para  $p < 0,05$*

En el tratamiento con dos minutos de inmersión se obtuvo un incremento en el número de microtubérculos totales por sistema (187) con un peso fresco total de los microtubérculos de 164,92 g, mientras que con 30 minutos el número total de microtubérculos por sistema fue de 136 con un peso fresco total de 69,35 g.

Los microtubérculos mostraron un mejor aspecto y mayor calidad con mayor resistencia a la deshidratación en el tratamiento con dos minutos de inmersión. Los microtubérculos obtenidos en el tratamiento con 30 minutos de inmersión mostraron una callosidad en las lenticelas, superficie rugosa y yemas brotadas que trajo como resultado una pobre calidad del mismo.

Disminuyó el porcentaje de microtubérculos menores que 4,00 mm y aumentó el correspondiente a mayores que 7,00 mm en el tratamiento en que se utilizó dos minutos de inmersión respecto al segundo tratamiento como muestra la figura 10 con diferencias estadísticamente significativas. Se observó la influencia del tiempo de inmersión en la calidad de los microtubérculos y por consiguiente en la eficiencia del proceso de microtuberización.



*Letras distintas para cada calibre difieren estadísticamente para  $p < 0.05$ .*

Figura 10. Porcentaje de los microtubérculos de papa var. Atlantic, obtenidos al evaluar dos (n=187) y 30 minutos de inmersión (n=136), clasificados según el calibre.

La duración del tiempo de inmersión ha sufrido muchas variaciones en dependencia del cultivo, variedad y el método de propagación que se emplee y ha sido de gran importancia dentro de las distintas especies. Berthouly *et al.* (1995) al evaluar el desarrollo de esquejes de *Coffea arabica*, observaron poca hiperhidricidad con 15 minutos de inmersión, mientras que con períodos largos de inmersión esta sintomatología apareció en gran medida en los tejidos.

La embriogénesis somática en *Coffea arabica* se ha visto favorecida con la utilización de tiempos muy cortos de inmersión (un minuto cada 24 horas), lográndose una multiplicación intensiva de agregados embriogénicos. Al utilizar tiempos de 15 minutos cada seis horas se favoreció la formación de pro-embriones (Teisson y Alvard, 1994).

En la proliferación de embriones de bananos el empleo de un minuto cada seis horas estimuló la producción de embriones adventicios. Mientras, en la maduración, germinación y conversión de los embriones de Caucho, los mejores resultados se obtuvieron con un período extremadamente breve de inmersión de un minuto una vez por semana (Etienne *et al.*, 1997).

Castro (2001) señala que durante la fase de proliferación de brotes de *Eucalyptus grandis*, al emplear una frecuencia de 24 horas con una duración de tres minutos, el número de brotes por explante fue significativamente superior al obtenido con un minuto de inmersión, sin embargo en ambos, se observó la presencia de brotes hiperhidratados.

Los efectos del tiempo de inmersión en la respuesta morfogénica de los tejidos deben estar relacionados con las relaciones hídricas y el intercambio gaseoso que se logra en esta forma de cultivo según Escalona (1999).

Las densidades de inóculo y los tiempos de inmersión que se ensayaron según las posibilidades de automatización, mostraron que con 60 esquejes por sistema y con dos minutos de inmersión empleado en los experimentos anteriores, se obtienen los mejores resultados en cuanto a producción y calidad de los microtubérculos.

#### 4.5. Producción de microtubérculos de papa a gran escala.

Se observó durante la etapa de crecimiento (Figura 11), que los explantes mostraron un rápido y vigoroso crecimiento sin la presencia de síntomas de hiperhidricidad.



Figura 11. Vitroplantas de papa. var Atlantic desarrolladas en sistemas de inmersión temporal durante 21 días de cultivo.

Se obtuvo un total de 312 microtubérculos por sistema para un promedio por planta de 2,60 microtubérculos con un peso fresco promedio de 1,27 g y diámetro promedio de 11,40 mm. La figura 12 muestra las vitroplantas en la fase de microtuberización próximo a la cosecha.



Figura 12. Vitroplantas de papa var. Atlantic cultivadas en sistemas de inmersión temporal de 10,0 L de capacidad durante la fase final de microtuberización.

El 36,00% de los microtubérculos alcanzaron un peso fresco mayor que 1,00 g, valores superiores a los señalados por otros autores como Teisson y Alvard (1999) que obtuvieron un 21,80% al utilizar un sistema semiautomatizado nombrado “Doble RITA” empleando la variedad Desirée. Este sistema RITA tiene como inconvenientes para la producción de microtubérculos el bajo volumen y el alto precio por unidad.

Por otra parte, autores como Alchanati *et al.* (1994) en un sistema con reconocimiento de imágenes para la producción de microtubérculos con el uso del ancymidol en la variedad Desirée, obtuvieron un peso fresco promedio por microtubérculo de 0,30 g después de 12 semanas.

Akita y Ohta (1998) desarrollaron un sistema semi-automatizado, simple y barato con el empleo de un biorreactor sin aireación forzada. Las plantas fueron inmersas intermitentemente en el medio de cultivo mediante la rotación del biorreactor. El número y peso fresco total de los tubérculos se incrementó en 1,45 y 2,43 unidades comparado con el cultivo control en condiciones estáticas, aunque el promedio del peso fresco por microtubérculo fue aún bajo con un valor de 0,27 g.

Es reportado por Ziv *et al.* (1998) el empleo de un biorreactor desechable y muy barato para la proliferación de brotes en clusters de papa. Luego de 8-10 semanas, por 10,00 g de peso fresco inoculado se obtuvieron 36 tubérculos de un peso fresco que osciló entre 0,39 y 0,67 g.

Al clasificar los microtubérculos cosechados de los SIT según el tamaño, el 2,90% correspondió al calibre menor que 4,00 mm, 19% a calibres de 4,00 mm a 7,00 mm, mientras que el 78,10% presentó un calibre superior a 7,00 mm. Los microtubérculos correspondientes



a este calibre fueron los que mostraron un mejor comportamiento pues facilitaron la manipulación y no hubo pérdidas por deshidratación.

Es de gran importancia en la micropropagación de la papa contar con un sistema que produzca un alto porcentaje de microtubérculos de calibre mayor que 7,00 mm para así disminuir las pérdidas durante la conservación y un mejor comportamiento en campo. Haverkort *et al.* (1991) señalan que los microtubérculos con calibres menores que 5,00 mm tienden a desecarse bajo condiciones de campo y son más susceptibles a las enfermedades.

La producción a gran escala en sistemas de inmersión temporal tiene una gran importancia en la producción comercial de un gran número de especies hasta el momento estudiadas. Los sistemas de cultivo líquido que han sido desarrollados bajo principios similares como los propuestos por Tisserat y Vandercook (1985), Weathers *et al.* (1988), Simonton *et al.* (1991), Akita y Takayama (1994a y b), Teisson y Alvard (1994), Teisson y Alvard (1999), Escalona (1999) van encaminados a mejorar la respuesta morfogénica y con ella a aumentar la calidad del material propagado. Lograr la semiautomatización o automatización posibilita la práctica de una tecnología más eficiente.

Estos sistemas semiautomatizados permitieron incrementar la producción, así como una mayor calidad de las plantas y los microtubérculos producidos en estos sistemas con respecto a los métodos convencionales. Esto es el resultado de condiciones físicas creadas en el frasco de cultivo donde la atmósfera interna es renovada casi completamente a intervalos regulares permitiendo la eliminación de gases tóxicos y se logra una mayor disponibilidad y asimilación de los nutrientes (Teisson y Alvard, 1994).

El uso del medio líquido, la ausencia de reguladores de crecimiento así como la menor fuerza de trabajo requerida para el manejo de los explantes en los sistemas semiautomatizados, pudieran reducir los costos de producción de microtubérculos, pues se reduce la manipulación y se simplifican las operaciones del cambio de medio de cultivo (Aitken-Christie *et al.*, 1995).

Aunque la inversión inicial es relativamente elevada, producto de los frascos y demás aditamentos empleados en el diseño del sistema, en poco tiempo el costo de producción disminuye. Influye entre otros factores el empleo del medio líquido, que trae consigo una disminución considerable de los costos por la exclusión del agar como gelificante, lo que aumenta en más del 50% la productividad según Pérez *et al.* (1998), siendo además un paso de avance para lograr la automatización del proceso al disminuir la fuerza de trabajo. Adicionalmente mejora la calidad de las plantas e incrementa los ritmos de producción a

niveles no alcanzados por otros métodos. La calidad de los microtubérculos obtenidos es superior expresada en un mayor peso y calibre disminuyendo las desventajas de la producción de tubérculos *in vitro* mediante métodos convencionales.

4.6. Comportamiento en campo de los microtubérculos obtenidos en los sistemas de inmersión temporal.

Los microtubérculos bajo condiciones de campo presentaron un 89,00% de brotación a los 15 días y un 77,30% de supervivencia a los 35 días, mientras que las vitroplantas presentaron un 74,00% y 57,50% de supervivencia a los 15 y 35 días respectivamente. Agramonte (1999) obtuvo menos del 50,00% de supervivencia en microtubérculos de calibre superior a 4,00 mm sin aclimatizar provenientes de medios estáticos y un 90,00% al ser previamente brotados en la fase de aclimatización.

Otros parámetros evaluados en esta etapa de desarrollo vegetativo, mostraron diferencias significativas entre el comportamiento en campo de los microtubérculos y las vitroplantas (Tabla 6). Estos resultados no coinciden con lo reportado por Struik y Lommen (1990) quienes plantean que las vitroplantas muestran un mayor vigor que el material proveniente de los microtubérculos.

Tabla 6. Resultados de la evaluación en campo de las plantas de papa var. Atlantic durante la fase de crecimiento vegetativo, obtenidas de microtubérculos y vitroplantas.

Variables	Microtubérculos X ±ES	Vitroplantas X ±ES
Altura (cm)	22,77±0,40 a	15,32±0,41 b
No. de tallos y ramas por planta	1,51±0,05 a	1,16±0,03 b

*Letras distintas en una misma fila difieren estadísticamente para  $p < 0.05$*

Al evaluar ambos tratamientos después de realizada la cosecha, el número de microtubérculos por planta no presentó diferencias estadísticas, no coincidiendo estos resultados con los obtenidos por Agramonte (1999) quien encontró diferencias significativas entre microtubérculos provenientes de cultivo semisólido y vitroplantas, siendo mayor los resultados en estas últimas. Es de destacar que los microtubérculos empleados por dicho autor, eran de

calidad inferior con menores calibres y pesos con respecto a los obtenidos en los sistemas de inmersión temporal donde las condiciones de cultivo son mejores que en medios semisólidos. Yu *et al* (2000) señalan que el tamaño de los tubérculos destinados a la plantación directa en campo tiene un efecto importante en el desarrollo del cultivo.

En las restantes variables evaluadas, los resultados del tratamiento con microtubérculos, fueron estadísticamente superiores con respecto a los resultados obtenidos de las vitroplantas (Tabla 7).

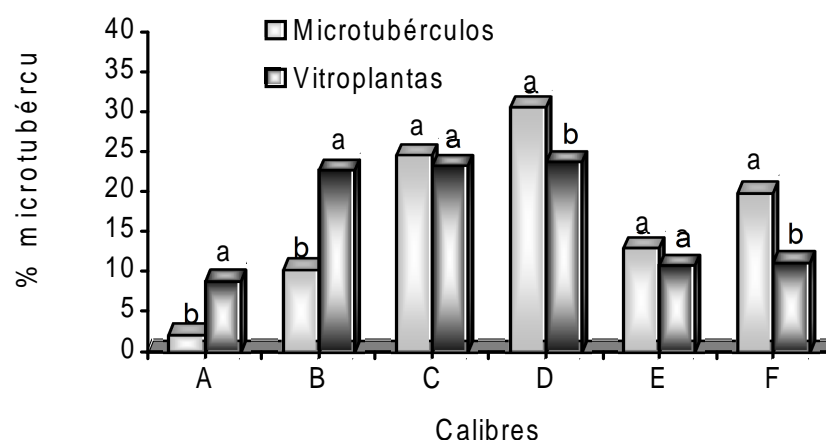
Tabla 7. Resultados de la evaluación en campo de la producción de minitubérculos de papa var. Atlantic, a partir de microtubérculos y vitroplantas.

Variables	Microtubérculos X±ES	Vitroplantas X±ES
N de minitubérculos por planta	5,83±0,42 a	5,40±0,44 a
Peso de tubérculos por planta (g)	310,30±16,6 a	146,60±12,9 b
Diámetro de los tubérculos (mm)	42,20±0,14 a	31,40±0,10 b

*Letras distintas en una misma fila difieren estadísticamente para  $p < 0,05$*

Jiménez (2000) obtuvo un promedio de minitubérculos de un valor superior a 5 en plantaciones de vitroplantas en condiciones de casa de cultivo con zeolita como sustrato. El peso de minitubérculos por planta varió entre 424 y 500 en dependencia de la distancia de plantación.

Según Struik y Lommen (1990) las vitroplantas muestran superior uniformidad que los microtubérculos aunque es baja en comparación con el tubérculo normal, constituyendo así una problemática de estos métodos que dependen del tamaño del propágulo. En la figura 13, se observa una estabilidad en la producción de minitubérculos procedentes de las vitroplantas con los calibres B, C y D .



A: < 9mm; B: 9 – 20mm; C: 20 – 35mm; D: 35 – 45mm; E: 45 – 55mm; F: ≥ 55mm

*Letras distintas para cada calibre difieren estadísticamente para  $p < 0.05$ .*

Figura 13. Porcentaje de minitubérculos de papa var. Atlantic obtenidos a partir de microtubérculos y vitroplantas, clasificados según calibres.

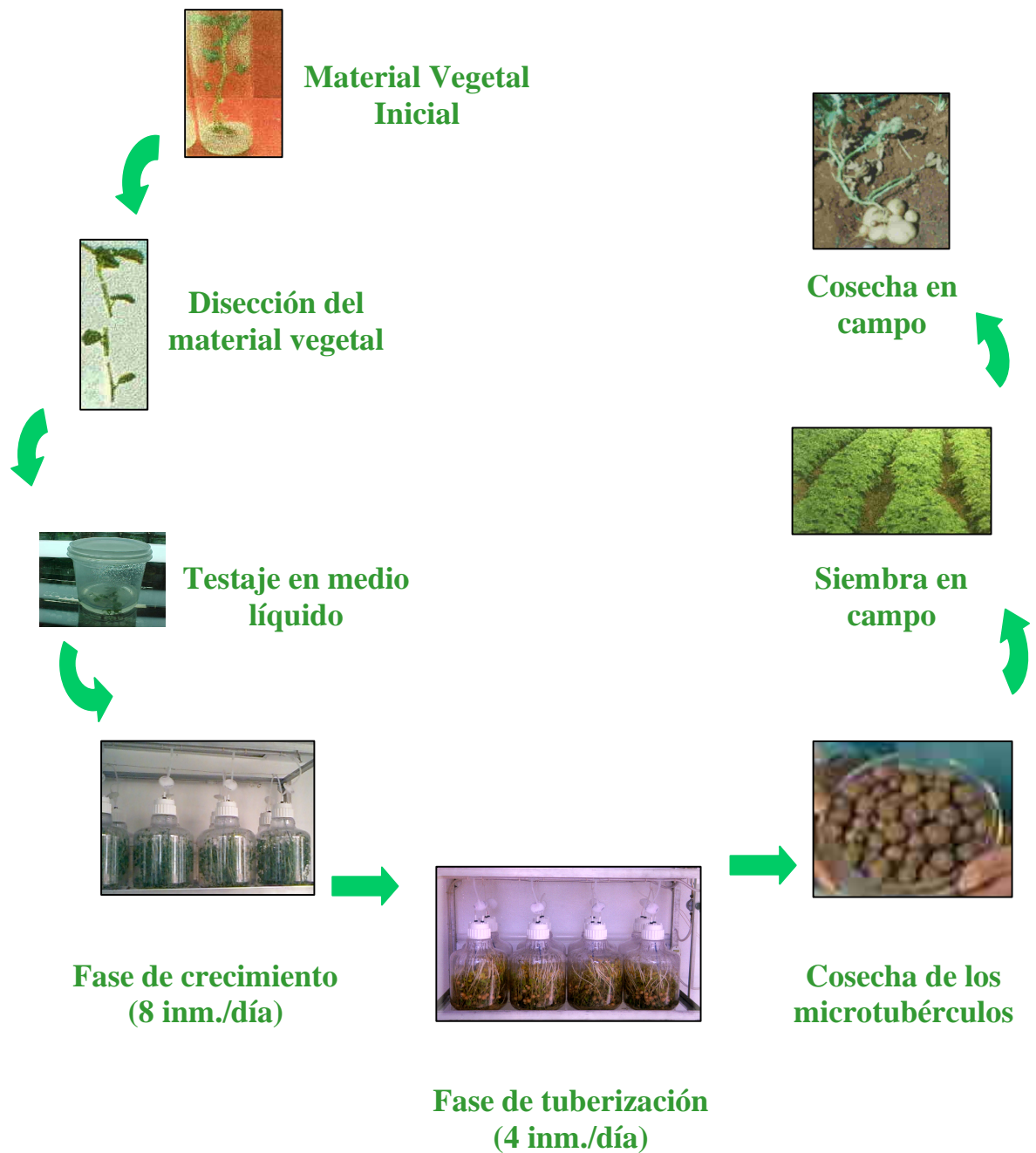
Las plantas obtenidas *in vitro* son muy frágiles y pequeñas para el transplante directo al campo, de ahí la necesidad de la fase de aclimatización que incrementa el manejo del material y los costos de producción (Jiménez, 2001). Por otra parte los microtubérculos tienen mayor posibilidad para el almacenamiento y la transportación en relación a las vitroplantas por ocupar un mayor volumen. La transportación de las plantas *in vitro* y la plantación en campo se dificultan porque las pequeñas plantas requieren de un cuidadoso trabajo del personal dedicado a realizar el mismo, a diferencia de las plantaciones que se realizan con tubérculos donde es más fácil el manejo y brinda la posibilidad de mecanizar la siembra (Pérez, 1998).

La etapa de aclimatización de las plantas *in vitro* provoca pérdidas del 20 -30% de las plantas por no realizar un adecuado manejo de la tecnología de las mismas, lo que provoca que muchas plantas lleguen al campo sin el desarrollo foliar necesario, pierden el sustrato que estaba adherido a sus raíces, no resisten el transplante y se quedan pequeñas o mueren (Pérez, 1998).

Belletti *et al.* (1994) señalan que las plantas derivadas de los microtubérculos son normales y fuertes, por lo que pueden jugar un papel importante en la producción de semilla original. McCown y Joyce (1991) les atribuyen mayor fortaleza en relación a otros propágulos, mayor facilidad de manejo, almacenamiento y factibilidad para la plantación mecanizada.

Los resultados obtenidos demuestran la factibilidad de desarrollar un esquema de producción de microtubérculos en los sistemas de inmersión temporal para la obtención de semilla original (Figura 14). La tecnología actual sólo incluye vitroplantas, las cuales requieren mayor manejo tanto en el laboratorio como en el campo.

La técnica de inmersión temporal constituye una variante de interés para la producción de microtubérculos de papa no sólo por la inducción de un mayor número de microtubérculos por planta con respecto a métodos convencionales sino por el incremento del peso y tamaño de los mismos. Estas ventajas posibilitan una mayor facilidad para el manejo y la posibilidad de plantarlos en campo sin previa aclimatización, por lo que es posible emplear este método de propagación como una posible técnica para la obtención de semilla original, combinándolo con los métodos de propagación propuestos por Agramonte (1999), esquema basado en la producción de altos volúmenes de vitroplantas, microtubérculos, yemas encapsuladas.



**Figura 14.** Esquema para la obtención de semilla original a partir de la producción de microtubérculos de papa en Sistemas de Inmersión Temporal.

## 5. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo 2,93 microtubérculos por planta con el empleo de los SIT donde el proceso ocurrió con mayor calidad, siendo este método de cultivo el más adecuado para la producción de microtubérculos.
2. Se demostraron las ventajas de los SIT tanto para la fase de crecimiento como en la inducción de la microtuberización, obteniéndose un mayor número de tubérculos por planta y mayor calidad de los mismos expresada en el calibre y el peso fresco.
3. Con 60 explantes el número de microtubérculos por sistema fue menor (168) en relación al tratamiento con 90 esquejes, sin embargo el 23,1% de estos, corresponde a microtubérculos deformados con menor peso fresco y diámetro.
4. Se demostró que dos minutos de inmersión favorecen la microtuberización, lográndose una mayor calidad en los tubérculos.
5. Los microtubérculos producidos en los SIT pueden ser plantados directamente en campo, mostrando un comportamiento superior a las vitroplantas respecto al peso total de tubérculos por planta y el calibre que los procedentes de las vitroplantas, no se encontró diferencias significativas en el número de microtubérculos.
6. Es factible el empleo de la inmersión temporal en la producción de semilla original de papa, la cual puede ser combinada con los actuales métodos de propagación *in vitro*.

## **6. RECOMENDACIONES**

1. Emplear los sistemas de inmersión temporal para la producción de microtubérculos de papa en las variedades Desirée y Atlantic.
2. Aplicar el método desarrollado a otras variedades de papa de interés para los programas de producción de semilla.
3. Estudiar diferentes tiempos y frecuencia de inmersión para las distintas fases del proceso de microtuberización.
4. Realizar una caracterización fotosintética y fisiológica del proceso de microtuberización en los SIT.
5. Evaluar comparativamente el comportamiento en campo e invernadero de microtubérculos obtenidos en SIT y mediante la metodología convencional en medios semisólidos.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Agramonte, D. 1999. Métodos biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis para aspirar al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 110 p.
- Agramonte, D.; F. Jiménez; O. Medina; M. Pérez; O. Gutiérrez; D. Ramírez y J. Pérez. 1996. Metodología para la producción y manejo de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.). IV Coloquio de Biotecnología Vegetal. Libro de reportes. pp. 25-26. Santa Clara, Cuba.
- Aitken- Christie, J; T. Kozai y S. Takayama. 1995. Automation in plant tissue culture-general introduction and overview. En: Aitken Christie, J; T. Kozai y M.A. Smith (Eds). Automation and environment control in plant tissue culture. pp. 1-18.
- Aitken-Christie, J. y H.E. Davies. 1988. Development of a semi-automated micropropagation system. Acta Hort. 230: 81-87.
- Akita, M. y S. Takayama. 1988. Mass propagation of potato tubers using jar fermentor techniques. Acta Hort. 230: 55-61.
- Akita, M. y S. Takayama. 1994a. Induction and development of potato tubers in a jar fermentor. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 36: 177-182.
- Akita, M. y S. Takayama. 1994b. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. Plant Cell Reports. 13: 184-187.
- Akita, M. y Y. Ohta. 1996. Development of s system for mass propagation of *Colacasia esculenta* in large scale without forced aeration. Acta Hort. 440: 554-559.
- Akita, M. y Y. Ohta. 1998. A simple method for mass propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a bioreactor without forced aeration. Plat Cell Reports. 18: 284-287.
- Akita, M.; T. Shigeoka; Y. Koizumi y M. Kawamura. 1994. Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* in a large scale biorreactor. Plant Cell Reports. 13: 180-183.
- ALAP (Asociación Latinoamericana de Papa). 2000. La Agricultura no cañera en Cuba. Datos básicos. La producción de papa. La Habana, Cuba. pp. 4-5.
- Albany, N. 2001. Efecto de retardantes del crecimiento en la micropropagación de bananos en medios de cultivo líquidos en agitador orbital y sistemas de inmersión temporal. Tesis para optar al grado científico de Magister Scientiae en Biotecnología

Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.

- Alchanatis, V.; K. Peleg y M. Ziv. 1994. Morphological control and mensuration of potato plantlets from tissue cultures for automated micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 36: 331-338.
- Alvard, D.; F. Cote y C. Teisson. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32: 55-60.
- Anjum, M. y T. Villiers. 1997. Induction of microtubers *in vitro* from stem segments of *Solanum tuberosum* L., *S. commersonii* Dun. and *S. acaule* Bitt. *Scientia Horticulturae*. 70: 231-235.
- Ávila, A. del; S. Pereyra y J. Argüello. 1996. Growth of cultivars in solid and liquid media. *Potato Research*. 39: 253-258.
- Barclay, M. 1997. Variedades de papas en Canadá. Barclay, M. y P. Scott (Eds). Departamento de Agricultura y Desarrollo Rural de Nuevo Brunswick.
- Belletti, P.; S. Lanteri; S. Lotito y F. Saracco. 1994. Production of potato micro-tubers through *in vitro* culture. *Acta Horticulturae*. 362: 141-148.
- Bernal, F. 1997. Técnicas de saneamiento para la obtención de papa (*Solanum tuberosum* L.) var. Desirée libre del virus del enrollamiento de la hoja. Tesis de Maestría. IBP-UCLV. Santa Clara, Cuba.
- Berthouly, D.; D. Alvard, C. Carasco; L. Alemano y C. Teisson. 1995. Coffee micropropagation in a liquid medium using the temporary immersion technique. En: ASIC Publishers (Eds). 16<sup>th</sup> International Scientific Colloquium on Coffee, Kyoto, Japon. pp. 514-519.
- Bieniek, M.; R. Harrell y D. Cantliffe. 1995. Enhancement of somatic embryogenesis of *Ipomea batatas* in solid cultures and production of mature somatic embryos in liquid cultures for application to a bioreactor production system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 41: 1-8.
- Bizarri, M.; L. Borghi y P. Ranalli. 1995. Effects of activated charcoal effects on induction and development of microtubers in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann. Appl. Biol.* 127: 175-181.
- Brown, R. 1995. Difusión del Germoplasma de Papa y la Propagación Moderna. En: Frederick, R.; I. Virgin y E. Lindarte (Eds.). Riesgos ambientales de las plantas transgénicas en centros de diversidad: La papa como modelo. Memorias del Taller

Regional, Parque Nacional Iguazú, Argentina. Biotechnology Advisory Commision - IICA.

- Cabasson, C; D. Alvard; D. Dambie;, P. Ollitrault y C. Teisson. 1997. Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 50: 33-37.
- Castro, D. 2001. Propagación mixotrófica de *Eucaliptus grandis* Hill ex Maiden en biorreactores de inmersión temporal. Tesis para aspirar al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila, Centro de Bioplantitas. Cuba.
- CEVIPAPA. Centro Virtual de la Papa. 2001. [url:http://www.cevipapa.org.co/generalidades.html](http://www.cevipapa.org.co/generalidades.html) [Consulta: 22 Mayo 2001].
- Contreras, A. 1999. La papa en la década de los 90. *Revista de la Papa. ACHIPA*, Año 1, No. 3. pp. 6-7.
- Cronquist, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. Second Edition. USA.
- Chun, Y.W.; R.B. Hall y L.C. Stephens. 1986. Influences of medium consistency and shoot density on *in vitro* shoot proliferation of *Populus alba* x *P. grandidentata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 5: 179-185.
- De Feria, M.; E. Jiménez y M. Chávez. 1998. Influencia de la densidad de inóculo y la frecuencia de renovación del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de la caña de azúcar *Saccharum spp.* híbrido) utilizando sistemas de inmersión temporal. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO'98. Libro de resúmenes. p. 42.
- Debergh, P. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant*. 59: 270-276.
- Debergh, P.; J. Aitken-Christie; B. Cohen; S. Von Arnold, R. Zimmerman y M. Ziv. 1992. Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 30: 135-140.
- DokaGene Thechnologies Company. [http://www.dokagene.ru/f2\\_e.htm](http://www.dokagene.ru/f2_e.htm) [Consulta: 22 Mayo 2001].
- Duplessis, T.; T. Lewis; L. Maskewich y K. Andrew. Seed Potato Program [en línea]: Crop Diversification Centers 1999 Annual Report. 5 Julio 2000. [http://www.agric.gov.ab.ca/ministry/pid/cdc/seedpotato\\_ar.html](http://www.agric.gov.ab.ca/ministry/pid/cdc/seedpotato_ar.html) [Consulta: 22 Mayo 2001].

- Epp, M.D. 1987. Somaclonal variation in Bananas: A case study with *Fusarium* wilt. En: Persley, G.J. y Delanghe, E.A. (Eds). Banana and Plantain Breeding Strategies. ACIAR Proceeding. 21: 187.
- Escalona, M. 1999. Propagación de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en sistemas de inmersión temporal. Tesis para aspirar al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila, Centro de Bioplasmas. Cuba. 102 p.
- Espinoza, N.; P. Estrada; P. Tovar; P. Bryan y J. Dodds. 1992. Tissue culture micropropagation, conservation and export of potato germoplasm. Especialized Technology Document 1, CIP, Lima.
- Estrada, N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Bolivia, PROINPA-CID-CIP. p. 372.
- Estrada, R.; P. Tovar y J. Dodds. 1986. Induction of *in vitro* tubers in a broad range of potato genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 7: 3-10.
- Etienne, H.; M. Lartaud; N. Michaux-Ferriere; M.P. Carron; M. Berthouly y C. Teisson. 1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) using the temporary immersion technique. *In vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant. 33: 81-87.
- Etienne-Barry, D.; B. Bertrand; N. Vasquez y H. Etienne. 1999. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. 19: 111-117.
- Ezeta, F. 1999. Producción de semilla de papa en América Latina. Boletín de la papa. Vol. 1(5). REDEPAPA.
- Garner, N. y J. Blake. 1989. The induction and development of potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. Ann. Bot. 63: 663-674.
- Gopal, J.; J.L. Minocha; H.S. Dhaliwal. 1998. Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Cell Reports. 17: 794-798.
- Harris, R. y E. Mason. 1983. Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid media. Can. J. Plant Sci. 63: 311-316.
- Harvey B.M.; S.H. Crothers; N.E. Evans y C. Selby. 1991. The use of growth retardants to improve microtubers formation by potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 27: 59-64.
- Haverkort, A.J.; M. Van de Waart; J. Marinus. 1991. Field performance of potato microtubers as propagation material. Potato Res. 34: 353-364.
- Hawkes, J. 1990. The Potato: Evolution, Biodiversity, and Genetic Resources. Belhaven Press. London and Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. p. 259.

- Heo, J. y T. Kozai. 1999. Forced ventilation micropropagation system for enhancing photosynthesis, growth and development of sweetpotato plantlets. *Environment Control in Biology*. 37 (1): 83-92.
- Herrera, J. L. 1992. Importancia y potencial económico de la papa en América Latina. La papa. El descubrimiento que conquistó el mundo. Curso Internacional de la papa. pp. 3-13.
- Hu, C. y J. Wang. 1983. Meristem, shoot tip and bud culture. En: Evans, D.; P. Ammirato y Y. Yameda (Eds). *Handbook of Plant Cell*. pp. 256-290.
- Jiménez, E. 2001. Embriogénesis somática y su aplicación en la propagación de plantas. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. 96 p.
- Jiménez, E. y M. de Fera. 1998. Empleo de biorreactores para la propagación masiva. En: Pérez, J. (Ed). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. pp. 207-222.
- Jiménez, F. 2000. Aclimatización de plantas *in vitro* y producción de minitubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en casas de cultivo. Tesis para optar al grado científico de Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Jiménez, E.; N. Pérez; M. de Fera; R. Barbón; A. Capote; M. Chávez; E. Quiala y J.C. Pérez. 1999. Improved production of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 59: 19-23.
- Jones, H.; A. Karp; M. Jones. 1989. Isolation, culture and regeneration of plants from potato protoplasts. *Plant Cell Rep*. 8: 307-311.
- Kitto, S. L. 1997. Commercial Propagation. *HortScience*. Vol. 32 (6): 1-3.
- Kozai, T.; B. Jeong; Ch. Kubota y Y. Murai. 1995. Effects of volume and initial strength of medium on the growth, photosynthesis and ion uptake of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlet *in vitro*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci*. 64(1): 63-71.
- Kozai, T.; Ch. Kubota y B. Jeong. 1997. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 51: 49-56.
- Krikorian, A. 1991. Medios de cultivos: generalización, composición y preparación. En: Roca, W. y L. Mroginski (Eds). *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. pp. 41-79.

- Krueger, S.; C. Robacker y W. Simonton. 1991. Culture of *Amelanchier x grandiflora* in a programmable micropropagation apparatus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 27: 219-226.
- Lago, L. 1991. Cultivo de tejido para producción de semilla básica de papa. En: Roca, W. y M. Mroginski (Eds). *Cultivo de tejidos en la agricultura*. pp. 447 - 469.
- Leathers, R.; M. Smith y J. Aitken-Christie. 1995. Automation of the bioreactor process for mass propagation and secondary metabolism. En: Aitken Christie, J; T. Kozai y M.A. Smith (Eds). *Automation and environment control in plant tissue culture*. pp. 187-214.
- Leclerc Y.; D.J. Donnelly y J.E. Seabrook. 1994. Microtuberization of layered shoots and nodal cuttings of potato: the influence of growth regulators and incubation periods. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 37: 113-120.
- Levin, R.; V. Gava; B. Tal; S. Hirsch; D. de Nola y I.K. Vasil. 1988. Automated plant tissue culture for mass propagation. *Biotechnology*. 6: 1035-1040.
- Levy, D.; J.E. Seabrook y S. Colman. 1993. Environment of tuberization of axillary buds of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars cultured *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 44: 381-386.
- Lommen, W.J. y P.C. Struik. 1994. Field performance of potato minitubers with different fresh weights and conventional seed tubers: crop establishment and yield formation. *Potato Res.* 37: 301-313.
- López, M.; E. Vázquez y R. Fleites. 1995. Papa. En: Ojeda, R. y L. Mora (Eds.). *Raíces y tubérculos*. Editorial Pueblo y Educación. pp. 225-312.
- López-Delgado, H. y I.M. Scott. 1997. Induction of *in vitro* tuberization of potato microplants by Acetilsalicylic Acid. *Journal Plant Physiol.* 151: 74-78.
- Lorence, A. 1997. Importancia y potencial de la biotecnología para el cultivo de la papa. Instituto de Biotecnología UNAM. Cuernavaca Morelos, México.
- Lorenzo J.; B. González; M. Escalona; C. Teisson; P. Espinosa y C. Borroto. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 54: 197-200.
- Mackay, W.A. y S.L. Kitto. 1988. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation of *French terragon*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113(2): 282-287.
- McCown, B.H. y P.J. Joyce. 1991. Automated propagation of microtubers of potato. En: Vasil, I.K. (Ed). *Scale-up and automation in plant propagation*. Academic Press, New York. pp. 95-109.

- Menzel, 1995. Tuberization in potato at high temperatures. Response to exogenous gibberellins, cytokinin and ethylene. Potato Research. pp. 263-266.
- Miyashita, Y.; Y. Kitaya; C. Kubota y T. Kozai. 1996. Photoautotrophic growth of potato plantlets as affected by explant leaf area, fresh weight and stem length. Scientia Horticulturae. 65: 199-202.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-479.
- Normas técnicas para el cultivo de la papa. 1982.
- Oka, I. y C. Sluis. 1996. Method for producing potato microtubers. U.S. Patent no. 5,498,541.
- Orellana, P. 1998. Propagación vía organogénesis. En: Pérez, J. (Ed). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. p. 151-176.
- Pérez, J. 1991. Resultados obtenidos en la plantación de vitroplantas de papa en Santa Martina. En: Informe IBP-Empresa de semillas, Cuba.
- Pérez, J. 1998. Propagación y mejora de plantas por biotecnología. En: Informe IBP, UCLV. Santa Clara. Cuba.
- Pérez, J. y C. Rodríguez. 1989. Producción de semillas y propágulos. Editorial Pueblo y Educación. 220 p.
- Pérez, J. y M. Suárez. 1998. Propuesta de ficha de costo para la producción de semilla original de papa por métodos biotecnológicos. Informe técnico. IBP-UCLV. Santa Clara, Cuba.
- Pérez, J.; E. Jiménez y D. Agramonte. 1998. Aumento de la eficiencia en la micropropagación. En: Pérez, J. (Ed). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. p. 179-190.
- Pérez, J.; M. Suárez y P. Orellana. 2000. Posibilidades y potencial de la micropropagación masiva de plantas en Cuba. Biotecnología Vegetal. 1: 3-12.
- Pierik, R.L. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi-Prensa. Madrid. pp. 49-84.
- Piqueras, A.; B. Han; J. Van Huylbroeck y P. Debergh. 1998. Effect of different environmental conditions *in vitro* on sucrose metabolism and antioxidant enzymatic activities in cultured shoots of *Nicotiana tabacum* L. Plant Growth Regulation. 25: 5-10.

- Preil, W. 1991. Application of bioreactors in plant propagation. En: Debergh, P. y R. Zimmerman (Eds.). Micropropagation: technology and application. Kluwer Academic Publishers. pp. 425-455.
- Quantum Tubers Corporation in association with American Ag-Tec International. 2000. <<http://www.ag-tec.com/potato.html>>. [Consulta: 2 Abril 2001].
- Ranalli, P.M.; F. Bassi; G. Ruaro; P. del Re y M. Di Candilo. 1994. Microtuber and minituber production and field performance compared with normal tubers. Potato Research. 4: 383-391.
- Rosell, G.; F. De Bertholdi; R. Tizio. 1987. *In vitro* mass tuberization as a contribution to potato micropropagation. Potato Research. 30: 111-116.
- Sarkar, D.; R. Chandra y P. Naik. 1997. Effect of inoculation density on potato micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 48: 63-66.
- Schaupmeyer, C. Potato Quality [en línea]: Growing Quality Potatoes in Alberta. 2 Julio 1997. <<http://www.agric.gov.ab.ca/agdex/potato/growing7.html>>. [Consulta: 2 Abril 2001].
- Seabrook, J.E.; S. Coleman y D. Levy. 1993. Effect of photoperiod on *in vitro* tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 34: 43-51.
- Shigeoka, T.; Y. Koizumi y M. Kawamura. 1994. mass propagation of shorts of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor. Plant Cell Reports. 13: 180-183.
- Simonton, W.; C. Robacker y S. Krueger. 1991. A programmable micropropagation apparatus using cycled liquid medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 27: 211-218.
- Struik P. y W. Lommen. 1990. Production, storage and use of micro- and minitubers. En: Proceedings of the 11<sup>th</sup> Triennial Conference of the European association for Potato Research. Edinburgh, UK. pp. 122-123.
- Takayama, S. y M. Misawa. 1981. Mass propagation of *Begonia hiemalis* plantlets by shake culture. Plant Cell Physiol. 22: 462-467.
- Teisson, C. y D. Alvard. 1994. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary immersion. VII Int. Congress IAPTC, Firenze. Book of Abstracts. p. 25.
- Teisson, C. y D. Alvard. 1999. *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. Potato research. 42: 499-504.



- Teisson, C.; D. Alvard; M. Berthouly; F. Cote; J. Escalant; H. Etienne y M. Lartand. 1996. Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. *Acta Hort.* 440: 521-526.
- Tisserat, B. y C.E. Vandercook. 1985. Development of an automated plant culture system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 5: 107-117.
- Tovar, P.; R. Estrada; L. Slide-Rentschler y J. Dodds. 1985. Inducción y utilización de tubérculos *in vitro* de papa. CIP Circular. 13 (4): 1-4.
- Ventura, J.; V. Medero; J. López; M. García; S. Rodríguez; J. García y D. Reinaldo. 1998. Manejo de los explantes en inmersión temporal, clon de banano FHIA-18. III Encuentro latinoamericano de Biotecnología Vegetal. FAO. Cuba. p. 64.
- Villafranca, M.J.; J. Veramendi, V. Sota, A.M. Mingo-Castel. 1998. Effect of physiological age of mother tuber and number of subcultures on *in vitro* tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Report.* 17: 787-790.
- Wang, P. y C. Hu. 1980. Regeneration of virus free plants through *in vitro* culture. *Adv. Biochwm. Engeneering.* 18: 61-99.
- Wang, Z.; P. Heinemann; P. Walker y C. Heuser. 1999. Automated micropropagated sugarcane shoot separation by machine vision. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers.* 42 (1): 247-254.
- Weathers, P.J.; R.D. Cheetham y K.L. Giles. 1988. Dramatic increases in shoot number and lengths for Musa, Cordyline and Nephrylepis [sic] using nutrient mists. *Acta Hort.* 230: 39-44.
- Yamamoto, T. y K. Nakata. 1997. Effect of CCC and BA on the formation of potato tuber *in vitro*. *Jpn. J. Crop Sci.* 66 (4): 663-668.
- Yu, W.; P. Joyce; D. Cameron y B. McCown. 2000. Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. *Plant Cell Reports.* 19: 407-413.
- Zarrabeitia, A.; X. Lejarcegui, J. Veramendi y A. Mingo-Castel. 1997. Influence of nitrogen supply on micropropagation and subsequent microtuberization of four potato cultivars. *American Potato Journal.* 74: 369-378.
- Ziv, M. 1991. Morphogenic patterns of plants micropropagation in liquid medium in shaken flasks or large-scale bioreactor cultures. *Isr. J. Bot.* 40: 145-153.
- Ziv, M. 1995. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Acta Horticulturae.* 393: 25-38.
- Ziv, M. y D. Shemesh. 1996. Propagation and tuberization of potato bud clusters from bioreactors culture. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 32: 31-36.

- Ziv, M.; G. Ronen y M. Raviv. 1998. Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for the large-scale micropropagation of plants. *In vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant. 34: 152-158.