

Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa

J. Igarza Castro^{1*}, D. Agramonte², Y. Alvarado-Capó², M. de Feria², T. Pugh^{3*} *Autor para correspondencia.

¹Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos (CISAT). Laboratorio de Biotecnología Vegetal. CITMA. Calle 18 esquina Maceo. Holguín, Cuba. e-mail: janetigarza@holguín.inf.cu

²Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830

³Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT). Instituto de Investigaciones Agrícolas (INIA). Maracay. Aragua. Venezuela.

RESUMEN

La papa es un cultivo de gran importancia económica. A nivel mundial, la propagación de papa mediante el cultivo *in vitro* de yemas axilares se utiliza comúnmente para la producción de plantas *in vitro* y microtubérculos. Ambos constituyen el material vegetal núcleo de un programa de producción de semilla de papa. El presente trabajo se realizó con el objetivo de presentar una revisión de la literatura científica sobre la propagación de papa por métodos biotecnológicos. Además, se describen las principales características del cultivo así como de los procesos de tuberización en condiciones naturales e *in vitro*.

Palabras clave: microtubérculos, minitubérculos, plantas *in vitro*, Sistemas de Inmersión Temporal

ABSTRACT

Potato crop has a large economic importance. Worldwide, propagation of potato by *in vitro* culture of axillary buds is commonly used in the production of *in vitro* plants and microtubers. These constitute the core plant material of a production program of potatoes seeds. This study aimed to present a review of scientific literature on the potato propagation by biotechnological methods. This also describes the main characteristics of this crop and the tuberization processes under natural and *in vitro* conditions.

Key words: *in vitro* plants, microtubers, minitubers, Temporary Immersion System

CONTENIDO

EL CULTIVO DE LA PAPA

Origen, descripción botánica y taxonómica

El proceso de tuberización

Factores que intervienen en la tuberización

MÉTODOS DE PROPAGACIÓN DE PAPA

Propagación por métodos biotecnológicos

Producción de microtubérculos de papa

Sistemas de Inmersión Temporal

Aplicaciones de la inmersión temporal en el cultivo de papa

Producción de minitubérculos en casa de cultivo y campo

REFERENCIAS

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.), es uno de los cultivos alimenticios más importantes tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. En cuanto al valor de la producción mundial que supera los 300 millones de toneladas (FAOSTAT, 2010), ocupa el cuarto

lugar, después del trigo (*Triticum vulgare* Willd.), el arroz (*Oryza sativa* L.) y el maíz (*Zea mays* L.).

Hasta el año 2005, los países en desarrollo producían poco más del 20.0%. Sin embargo, en ese año se elevó hasta el 52.0% de la producción, con lo que superó a la del mundo

desarrollado. Aun así, hoy en día la producción y el consumo mundial de papa crece a tasas inferiores que la población (FAO, 2008).

La importancia económica de la papa se fundamenta en que, por su elevada capacidad de producción de sustancias alimenticias por unidad de superficie, es tres veces mayor que en los cereales, lo que permite suplir de alimento a un elevado número de personas (Coleman *et al.*, 2001).

Por su valor nutritivo, este cultivo aporta en 100 gramos de papa fresca: 78.0% de humedad, 2.1% de proteína, 18.5% de almidón, 1.0% de cenizas y 0.1% de grasas. Además, contiene minerales (560.0 mg de potasio, 50.0 mg de fósforo, 9.0 mg de calcio, 7.0 mg de sodio y 0.8 mg de hierro) y vitaminas (0.1 mg de Tiamina, 0.04 mg de Riboflavina, 20.0 mg de vitamina C y 1.5 mg de Niacina), lo cual coloca a la papa como uno de los cultivos estratégicos más importantes para contribuir a solucionar los problemas del hambre en el mundo (FAO, 2008).

Este cultivo se propaga asexualmente mediante tubérculos o a través de semilla botánica. Por ello, es propenso a la infección acumulativa por microorganismos. Esto provoca afectaciones en los rendimientos, la calidad comercial de los tubérculos y el intercambio de germoplasma. En los programas de producción de semilla, la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro*, combinadas con el diagnóstico y saneamiento de los principales patógenos del cultivo, ha contribuido a incrementar su eficiencia (Tovar *et al.*, 1985; Struik y Lomme, 1990; Agramonte, 1999).

Desde hace años, a nivel mundial, la propagación de papa mediante el cultivo *in vitro* de yemas axilares se utiliza comúnmente para la producción de plantas *in vitro* y microtubérculos. Ambos constituyen el material vegetal núcleo de un programa de producción de semilla de papa, libre de microorganismos patógenos. Se obtienen en condiciones asépticas y controladas, en un medio de cultivo artificial y pueden ser transferidos a casas de cultivo o campo, donde dan lugar a minitubérculos que posteriormente pueden ser usados en otros esquemas de multiplicación para lograr tubérculos semilla. También pueden emplearse para el intercambio y la

conservación de germoplasma (Estrada *et al.*, 1986; Struik y Lomme, 1990; Ahloowalia, 1994; Ranalli *et al.*, 1994; Gopal *et al.*, 2004). Tienen como ventajas la rápida multiplicación en elevado número, en un corto periodo de tiempo y en un espacio reducido, durante todo el año. Los microtubérculos, además, pueden ser almacenados y se facilita su transportación lo que disminuye los costos (Tovar *et al.*, 1985; Struik y Lomme, 1990; Donnelly *et al.*, 2003).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de presentar una revisión de la literatura científica sobre la propagación de papa por métodos biotecnológicos. Además, se describen las principales características del cultivo así como de los procesos de tuberización en condiciones naturales e *in vitro*.

EL CULTIVO DE LA PAPA

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es un cultivo que ha ganado considerable importancia en las últimas décadas. Aunque se originó en América se cultiva en Europa, Asia y África. China es el mayor productor de este tubérculo (FAOSTAT, 2010). Es hoy uno de los cultivos más importantes para la producción de alimentos. Tal vez ningún otro cultivo en la historia contemporánea ha jugado un papel más importante en la seguridad alimentaria y la nutrición con un impacto en el bienestar social de la personas (Sarkar, 2008).

En el cultivo de la papa la producción comercial de tubérculos para consumo fresco, procesamiento industrial o semilla, es el interés principal, por lo tanto, las condiciones que estimulan la formación y el almacenamiento de almidón (tuberización) deben ser las más favorables para el desarrollo de los tubérculos y el consecuente éxito del cultivo (García y Salas, 2005; Aslam *et al.*, 2011).

Origen, descripción botánica y taxonómica

La papa es originaria de los altos Andes en América del Sur. Su cultivo se inició en el área del Lago Titicaca cerca de la frontera actual entre Perú y Bolivia. En estos países se encuentra la mayor variabilidad genética de especies silvestres y variedades cultivadas, lo que se confirma con la existencia 42 especies de *Solanum* existentes en Bolivia (Huamán, 1997; Ochoa, 2001).

S. tuberosum L. (Figura 1) es una planta herbácea, anual, tuberosa, perenne en entornos seleccionados a través de sus tubérculos, caducifolia, de tallo erecto o semi-decumbente, que puede medir hasta 1.0 m de altura (Huamán, 1986). La planta de papa puede llegar a producir frutos con semillas viables, pero la forma de propagación utilizada a nivel de la producción comercial es la vegetativa a través de tubérculos (Naik y Karihaloo, 2007).

Existe un gran número de especies de papa, pero en la producción comercial se emplean principalmente las dos subespecies de *S. tuberosum* (Huamán, 2007).

La taxonomía del cultivo es la siguiente:

- Tipo: *Spermatophyta*
- Clase: *Angiospermas*
- Subclase: *Dicotiledonea*
- Orden: *Tubiflorae*
- Familia: *Solanaceae*

- Género: *Solanum*
- Especie: *S. tuberosum*
- Subespecies: *andigenum*, *tuberosum* (Hawkes, 1990)

S. tuberosum subsp. *andigenum* es nativa de los Andes del Perú y se distribuye desde Venezuela hasta el norte de Argentina (Hawkes, 1990).

Las diferencias morfológicas entre las dos subespecies de *S. tuberosum* son muy pequeñas. La principal de ellas es que *S. tuberosum* subsp. *andigenum* depende de un fotoperiodo corto para tuberizar. *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*, tiene plantas, hojas y tubérculos más grandes, por esta razón se cultiva más (Hawkes, 1990; 1994). Además de estas diferencias morfológicas, ambas subespecies se hallan netamente diferenciadas a nivel genético, tanto a nivel del genoma cloroplástico como nuclear (Hosaka y Hanneman, 1988).

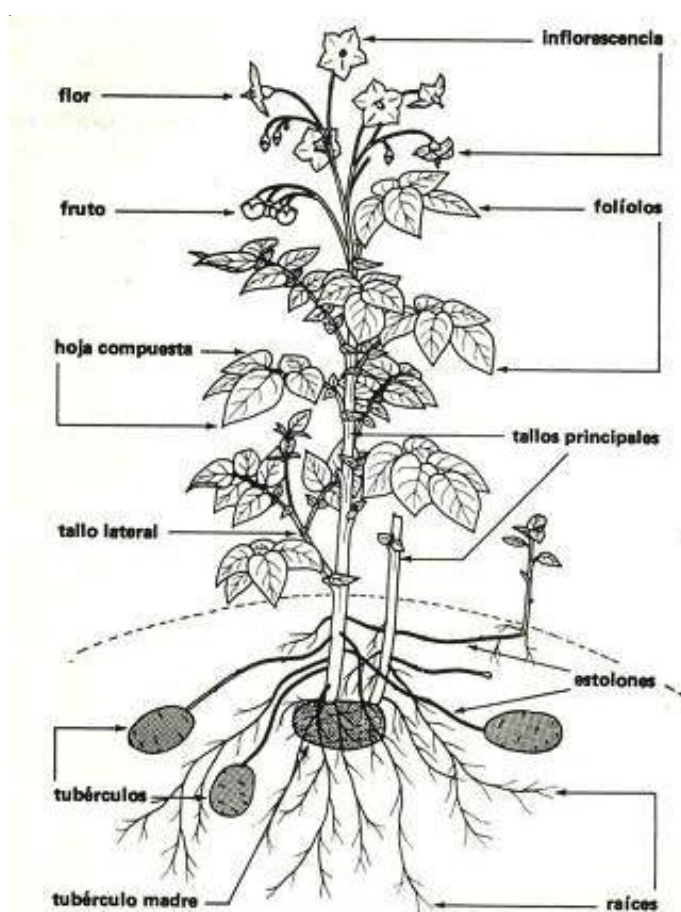


Figura 1. Esquema de una planta de papa. Tomado de: Huamán (1986).

El proceso de tuberización

La planta de papa tuberiza en días cortos y noches frías. En ella, cada brote tiene el potencial de tuberizar, y esta plasticidad inherente es definitivamente un obstáculo biológico hacia la comprensión de los mecanismos exactos del control del proceso de tuberización (Struik y Lomme, 1999; Sarkar, 2008). Además de los estolones, prácticamente todas las yemas axilares en tallos o esquejes pueden formar un tubérculo, siempre que la planta haya sido inducida a tuberizar.

La tuberización es un proceso morfofisiológico altamente coordinado que está influenciado por variables genéticas, fisiológicas y medioambientales (Villafranca *et al.*, 1998) y tiene lugar en los estolones subterráneos bajo la influencia de factores extrínsecos e intrínsecos (Sarkar, 2008). Sin embargo, después de décadas de investigación aún no se dispone de un modelo único que integre todos los eventos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que tienen lugar en la planta de papa ante la presencia de diferentes factores inductores de la tuberización.

Dada la importancia de la papa en la alimentación humana el estudio y comprensión del proceso de tuberización es de gran relevancia.

Las fluctuaciones en la duración del día son fundamentales para promover la diferenciación de los estolones en tubérculos. La duración del día se percibe en las hojas por el fitocromo B y en condiciones inductivas éstas sintetizan una señal sistémica que se transporta a los estolones subterráneos para inducir el desarrollo del tubérculo. Los estolones subterráneos inducidos detienen su alargamiento, comienzan a ensancharse y posteriormente se forman los tubérculos (Vreugdenhil *et al.*, 1999). Si el estolón no forma un tubérculo entonces emerge del suelo y forma un tallo aéreo (Jackson, 1999).

El tubérculo de la papa funciona como una reserva de almacenamiento masivo de una serie de macromoléculas, principalmente almidón y proteína. Durante el crecimiento del tallo principal de la papa, brotes laterales subterráneos (estolones), caracterizados por entrenudos alargados, extremo apical curvado, y el crecimiento diageotrópico (Cutter, 1978) se

desarrollan. Siguiendo las señales ambientales específicas, que incluyen fotoperiodo corto, alta intensidad de luz y bajos niveles de nitrógeno, los estolones son inducidos a formar tubérculos (Ewing y Struik, 1992). La transformación de los estolones en tubérculos repercute en gran medida en la fisiología de la planta completa, porque los tubérculos en desarrollo posteriormente se convierten en los mayores sumideros presentes en la planta (Oparka, 1985). Durante las primeras etapas de formación de los tubérculos los estolones modifican su hábito de crecimiento, cesa la elongación y se inicia un crecimiento radial en la zona subapical (Jackson, 1999; García-Flórez *et al.*, 2009). El aumento de la división celular y la expansión es seguida rápidamente por un enorme depósito de almidón y proteínas de almacenamiento, como la patatina, como resultado de la expresión coordinada de los genes implicados en la biosíntesis de almidón y proteína (Prat *et al.*, 1990; Visser *et al.*, 1994; Viola *et al.*, 2001).

La floración y la tuberización requieren la transmisión de señales desde las hojas a otras partes de la planta (Abdala *et al.*, 1996). El almacenamiento activo de hidratos de carbono en los tubérculos conduce a la reducción del crecimiento vegetativo, la floración, y la fructificación (Ewing, 1995; Sarkar, 2008). Estudios recientes han indicado que las señales que inducen la floración y la tuberización podrían estar relacionadas y se han identificado mecanismos moleculares donde se activan genes específicos de la tuberización (Navarro *et al.*, 2011).

Los azúcares no sólo son importantes fuentes de energía y componentes estructurales, también son moléculas reguladoras del metabolismo, el ciclo celular, el desarrollo y la expresión génica (Sheen *et al.*, 1999; Raíces *et al.*, 2003). El proceso de tuberización involucra una descarga de asimilatos en el floema hacia la región subapical del estolón en desarrollo. La sacarosa es la fuente carbonada más abundante en el ensanchamiento de los estolones, mientras que la concentración de glucosa y fructosa es más baja y muestra un patrón similar en todas las etapas de desarrollo (Viola *et al.*, 2001).

Los requerimientos ambientales para que ocurra la tuberización varían entre subespecies

y cultivares de papa. *S. tuberosum* subsp. *andigenum* requiere estrictamente fotoperiodo de día corto para la formación del tubérculo. Sin embargo, plantas de esta subespecie con inactivación del gen del fitocromo B (que participan en la detección del fotoperiodo) tuberizan, incluso en presencia de luz continua. Las plantas pertenecientes a *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* son menos dependientes de la duración del día (Jackson, 1999).

Factores que intervienen en la tuberización

Entre los factores que intervienen en la tuberización se han mencionado las características propias de la variedad, la edad fisiológica de la semilla, la temperatura del suelo, la humedad, la nutrición de la planta, la intensidad y duración de la luz (favorecido en días cortos), la acción de reguladores del crecimiento y la incidencia de plagas y enfermedades. Todos estos factores, además de afectar el cultivo, influyen directamente en su rentabilidad (Ewing y Shuik, 1992; Jackson, 1999; Coleman *et al.*, 2001; Jiménez-Terry *et al.*, 2010).

Dada la complejidad de las interacciones entre reguladores del crecimiento y carbohidratos en la tuberización (ambas clases involucran múltiples especies moleculares activas que son inductoras de expresión génica diferencial) parece difícil separar sus efectos. En este sentido, es probable que un enfoque fisiológico dirigido hacia el estudio de las señales energéticas primarias (como el potencial redox en organelos, células y tejidos así como el índice de fosforilación o metilación de proteínas clave en cierta vía metabólica), más que a las señales bioquímicas dependientes al parecer de la señalización energética, y por ello ubicadas en un nivel más alto en la jerarquía de la señalización, pueda resultar en mayores beneficios para la comprensión de los eventos que ocurren en la tuberización (Pfannschmidt *et al.*, 1999).

Se ha demostrado que la iniciación de la tuberización, ya sea en plantas intactas o en segmentos nodales, se encuentra bajo el control coordinado de muchos de los reguladores del crecimiento como las giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, ácido jasmónico y otros (Abdala *et al.*, 1996; García-Flórez *et al.*, 2009). A pesar de que la función

de algunas hormonas en la tuberización sigue siendo controvertida existen evidencias que han establecido el papel inhibitorio de las giberelinas (Jackson, 1999; Sarkar, 2008).

De esta manera, se conoce que la aplicación exógena de giberelinas, promueve la elongación del estolón e inhibe la formación de los tubérculos mientras que ante una caída en el nivel de giberelina, se observan los primeros signos visibles del ensanchamiento en la zona subapical del estolón. Además de actuar como los reguladores dominantes de la transición de estolón a tubérculo, las giberelinas también juegan un papel en la respuesta al fotoperiodo en la tuberización. La reducción de los niveles de giberelinas, se acompañan de cambios en la morfología, metabolismo y la expresión de genes en las hojas de plantas inducidas a tuberizar (Jackson, 1999; Sarkar, 2008; Bou-Torrent *et al.*, 2011).

En general, la señal del fotoperiodo se integra con otros factores del medioambiente tales como la disponibilidad de nitrógeno, temperatura, intensidad de la luz, así como con el estado metabólico general de la planta, de modo que las plantas pueden tuberizar incluso bajo días de fotoperiodos largos (Jackson, 1999).

MÉTODOS DE PROPAGACIÓN DE PAPA

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 papa se propaga vegetativamente por tubérculos-semillas lo que asegura la conservación de características varietales durante generaciones sucesivas. Sin embargo, debido a su forma de propagación asexual está sometida a un alto riesgo de contaminación por virus, hongos, bacterias e insectos, durante el período de cultivo y almacenamiento. También al emplear el material vegetativo por ciclos repetidos puede ocasionar degeneración del cultivo por la acumulación de enfermedades, especialmente virales (Scherwinski y Luces, 2004). También puede ser propagada por

semilla botánica pero esta vía se emplea fundamentalmente con fines de mejoramiento genético.

El valor potencial del cultivo de tejidos en la producción de papa ha sido ampliamente reconocido a nivel mundial. Esta tecnología se emplea en muchos países para obtener semilla libre de patógenos y por el consecuente beneficio para los productores (Pereira y Fortes, 2003; Rafique *et al.*, 2004; Naik y Karihaloo, 2007; Hoque, 2010).

Propagación por métodos biotecnológicos

La propagación *in vitro* de papa es mediante el subcultivo de yemas axilares. Se pueden obtener tanto plantas *in vitro* como microtubérculos (Salas, 1995; Agramonte, 1999; Borda *et al.*, 2001; Donnelly *et al.*, 2003; Gopal *et al.*, 2004; Calderón *et al.*, 2008).

En el cultivo *in vitro* convencional las plantas se cultivan en recipientes cerrados en un entorno aséptico y con la presencia de un medio de cultivo sólido, semisólido o líquido. El medio de cultivo contiene, además, altas concentraciones de sacarosa como fuente de carbono, sales inorgánicas, vitaminas y otros aditivos en dependencia de la especie y de la técnica de cultivo (Aragón *et al.*, 2009).

En la propagación de papa han sido empleados medios de cultivos en estado líquido y en estado semisólido, este último ha sido el más empleado. Los primeros incluyen la facilidad de preparación, esterilización y manipulación, pero en condiciones estáticas provocan 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).

Las plantas de papa propagadas *in vitro* pueden producir microtubérculos cuando se colocan en condiciones adecuadas (Wang y Hu, 1982; Estrada *et al.*, 1986). Estos generalmente se originan en estructuras aéreas de la planta aunque algunos pueden formarse en el medio de cultivo (Hussey y Stacey, 1984). Estos

ofrecen ventajas para el almacenamiento, traslado y plantación en casas de cultivo, así como permiten el intercambio de germoplasma (Estrada *et al.*, 1986; Gopal *et al.*, 1998; Pruski *et al.*, 2003; Kanwal *et al.*, 2006).

La producción de tubérculos *in vitro* fue descrita por primera vez como una herramienta experimental para el examen de la tuberización de la papa y los problemas fitopatológicos (Barker, 1953; Mes y Menge, 1954). Desde esa fecha se han utilizado diferentes términos para nombrarlos, por ejemplo: mini-tubérculos producidos *in vitro* (Lewis *et al.*, 1998), vitrotubérculos (Mandolino *et al.*, 1996), pero se ha aceptado internacionalmente el uso del término microtubérculos (Wattimena, 1983).

El empleo de plantas *in vitro* y microtubérculos en la producción de semilla de papa tiene ventajas con respecto a la semilla convencional ya que están libres de patógenos, se obtiene un gran número en cortos periodos de tiempo, se reducen los costos de labores agronómicas en el mantenimiento de germoplasma en campo, etc. Además, pueden ser propagados en cualquier época del año, se facilita el intercambio de material genético y se reduce el riesgo de pérdidas genéticas al evitar la mezcla del material vegetal por cruzamiento. Sin embargo, se requiere personal especializado, infraestructura y equipamiento, con productos químicos de elevado costo (Pérez *et al.*, 1998). Por otra parte, en la producción de semilla de papa por métodos biotecnológicos en la siembra directa de plantas *in vitro* en campo se producen pérdidas en el traslado. En consecuencia, se elevan los requerimientos de atenciones culturales por personal altamente calificado, se han incrementado las pérdidas de tubérculos en las cosechas por daños o enfermedades así como la conservación, debido principalmente a la alta presencia de microorganismos patógenos del suelo (Jiménez-Terry *et al.*, 2000).

Producción de microtubérculos de papa

El primer informe sobre tuberización *in vitro* fue publicado por Baker (1953), quien utilizó brotes etiolados para inducir tuberización en un medio de cultivo con 8.0 g l⁻¹ (m/v) de sacarosa. A partir de ahí comenzó la utilización de reguladores del crecimiento a favor de la tuberización, lo que ha sido objeto de intensas investigaciones

(Wang y Hu, 1982; Estrada *et al.*, 1986; Leclere *et al.*, 1994; Gopal *et al.*, 1998; Ebadi e Iranbakhsh, 2011).

En condiciones *in vitro* la formación de los tubérculos es sincrónica (Coleman *et al.*, 2001). Se han obtenido en varios sistemas de crecimiento con medioambiente variado, diferentes constituyentes de los medios de cultivo e intervalos de almacenamiento. Muchas de las interacciones entre los parámetros de crecimiento *in vitro* y la subsiguiente productividad parece ser específica para el genotipo. A pesar de las diferencias, existen evidencias de analogías en la respuesta de crecimiento entre los tubérculos obtenidos en el campo y los microtubérculos (Donnelly *et al.*, 2003).

Los sistemas de producción *in vitro* de microtubérculos consisten esencialmente en colocar segmentos nodales de plantas *in vitro* o plantas completas en un medio de cultivo para la inducción de la tuberización (caracterizado por un alto contenido de sacarosa y en algunos casos complementado con sustancias reguladoras del crecimiento). Los explantes nodales tuberizan sincrónicamente cuando se cultivan *in vitro*, en la oscuridad en un medio con contenido de nitrógeno reducido y concentración de sacarosa óptima (Jackson y Prat, 1992).

Generalmente, el proceso se desarrolla en dos etapas, una primera de crecimiento y desarrollo de los segmentos nodales y otra de tuberización. En los protocolos para la obtención de microtubérculos propuestos por diferentes autores las plantas *in vitro* en la etapa de tuberización se colocan en la oscuridad ya que se ha comprobado que en presencia de la luz, este proceso se puede retrasar (Estrada *et al.*, 1986; Dobranski y Mandi, 1993; Gopal *et al.*, 1998). En dichas condiciones las yemas axilares se diferenciarán en un tubérculo en lugar de en una hoja (Veramendi *et al.*, 1999).

No obstante, los microtubérculos pueden ser obtenidos *in vitro* en variadas condiciones (Gopal *et al.*, 1998). Por ejemplo, muchos científicos han tratado de alterar el balance hormonal de la planta para favorecer la tuberización, a través de modificar las concentraciones en el medio de cultivo de citoquininas, como 6-Bencilaminopurina (6-BAP), Kinetina y Zeatina o retardantes del

crecimiento como Paclobutazol (Wang y Hu, 1982; Agramonte, 1999; Rafique *et al.*, 2004; Aslam *et al.*, 2011). Además, se ha inducido la tuberización con elevadas concentraciones de sacarosa (6.0 – 8.0%)(m/v), variando el fotoperiodo o la atmósfera interna de los recipientes de cultivo, respectivamente (Wang y Hu, 1982; Akita y Takayama, 1994; Yu *et al.*, 2000; Ebadi e Iranbakhsh, 2011). Los resultados de estas investigaciones han permitido afirmar que la tuberización *in vitro* o microtuberización en la papa es un proceso muy complejo, influenciado por factores genéticos, ambientales y fisiológicos (Villafranca *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2005).

En general, hay consenso en la comunidad científica acerca de que entre las condiciones que inducen la tuberización *in vitro* se encuentran: concentración de sacarosa en el medio de cultivo de 8.0% (m/v) (Garner y Blake, 1989; Khuri y Moorby, 1995; Vreugdenhil *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998; Ebadi e Iranbakhsh, 2011), temperatura de 18-22 °C y oscuridad o a bajas intensidades de luz (Struik y Lomme, 1990; Seabrook *et al.*, 1993; Jackson, 1999).

Entre los factores principales que influyen en este proceso se encuentran el genotipo (Gopal *et al.*, 1998), los componentes del medio de cultivo, reguladores del crecimiento y el suministro de carbohidratos como fuentes de energía (Xu *et al.*, 1998; Vespaciano y Campos, 2003; Aslam *et al.*, 2011). Otros factores a considerar son el fotoperiodo (Seabrook *et al.*, 1993; Fujiwara *et al.*, 1995; Gopal *et al.*, 1998), la temperatura (Harvey *et al.*, 1992; Akita y Takayama, 1994; Otroshy *et al.*, 2009), la luz (Simmons *et al.*, 1989; Percival, 1999; Hoque, 2010) y el control efectivo del medioambiente en el cultivo *in vitro* (Zimmerman, 1995; Desjardins, 1995; Ashraf *et al.*, 2011).

En la literatura científica se ha informado de la tuberización *in vitro* de numerosos cultivares de papa, tanto en la subespecie *tuberosum* como en la *andigenum*, aunque predominan los estudios sobre la primera.

Evidencias experimentales apuntan a que la formación de tubérculos *in vitro* depende de la concentración de sacarosa, ya que estos se pueden obtener sin ningún tipo de adición de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo (Garner y Blake, 1989).

Algunos autores han referido un doble papel de la sacarosa en el desarrollo de los microtubérculos. Añadida al medio de cultivo, puede actuar como fuente de carbohidratos, como sustancia osmótica o como ambas. Además de ser una fuente de carbono adecuada y fácilmente asimilable por las plantas *in vitro* y que se convierte en almidón en el desarrollo del microtubérculo, la sacarosa, a una concentración de 80.0 g l⁻¹, también proporciona una osmolaridad favorable para el desarrollo del microtubérculo (Khuri y Moorby, 1995).

Por otra parte, la sacarosa parece ser una señal específica ya que ni la glucosa ni la fructosa son tan efectivas como la sacarosa para suplir los requerimientos de azúcares para el desarrollo de los tubérculos (Ewing, 1987). Las altas concentraciones de sacarosa inducen la transcripción de varios genes implicados en el proceso de almacenamiento en los tubérculos (Visser *et al.*, 1994; Raíces *et al.*, 2003).

Otros factores que influyen en la tuberización *in vitro* se relacionan con la atmósfera gaseosa en el recipiente de cultivo. Se plantea que cuando se cultivan plantas en recipientes con bajo intercambio gaseoso; la masa fresca de las plantas *in vitro* disminuye y se evidencia un efecto negativo sobre el crecimiento y la tuberización (Lugo *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que la tuberización de la papa puede ser modificada por la ventilación forzada (Zobayed, 2005). Con este tipo de sistema de cultivo estos autores lograron remover la acumulación de etileno del interior de la atmósfera interna del frasco de cultivo y mantener una concentración de dióxido de carbono y oxígeno cercana a la atmosférica, condiciones que permitieron incrementar la tuberización. Los microtubérculos obtenidos presentaron el doble de la masa fresca y seca que los microtubérculos formados en sistemas de cultivo donde no se logró una adecuada renovación de la atmósfera interna del frasco de cultivo.

Los microtubérculos se pueden obtener en medio de cultivo semisólido, líquido o una combinación de estos. Sin embargo, el empleo de medios de cultivo líquido puede provocar hipoxia de los tejidos que quedan sumergidos y se ha observado hiperhidricidad.

La hiperhidricidad, ha sido descrita como un severo desorden fisiológico, causado por la presencia de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de los tejidos y afecta tanto a las plantas herbáceas como a las leñosas durante su propagación vegetativa *in vitro* (Ziv, 1995).

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). Este fenómeno ha sido observado en varios cultivares de papa e informado por diferentes autores como Krueger *et al.* (1991), Simonton *et al.* (1991), Berthouly *et al.* (1995) y Calderón *et al.* (2008).

Para los problemas de hiperhidratación en los protocolos de propagación de plantas donde se han empleado los medios de cultivo líquido se han hecho diferentes propuestas basadas en la inmersión parcial y temporal de los explantes en el medio de cultivo, empleo de soportes de papel, bloques de celulosa o esponjas, adición de medio de cultivo líquido a cultivos establecidos en medios de cultivo con agar (Simonton *et al.*, 1991; Ziv y Shemesh, 1996; Akita y Takayama, 1994; Teisson *et al.*, 1996; Jiménez *et al.*, 1999; Pérez-Alonso *et al.*, 2001), etc.

La formación de microtubérculos ha presentado como principal limitante para su empleo en la propagación comercial, el bajo número de tubérculos que se obtiene por planta (máximo 1.0- 1.5), así como su pequeño tamaño, lo que dificulta la conservación a largo plazo y la supervivencia en el trasplante. No obstante, presentan una serie de ventajas como la posibilidad de realizar producciones durante todo el año, almacenar tubérculos y realizar la siembra en fecha óptima de plantación, lo cual evita los picos productivos que se presentan con la producción de plantas *in vitro*, además se elimina la fase de aclimatización y las facilidades en la plantación en campo, lo que reduce los costos por este concepto (Pérez *et al.*, 1998).

Los microtubérculos se obtienen de forma aséptica en medios de cultivo definidos y en un ambiente controlado. Por ello, son un modelo atractivo para estudios bioquímicos y

fisiológicos sobre la tuberización (Veramendi *et al.*, 1999). Adicionalmente, el uso de microtubérculos como herramientas de investigación experimental tiene potencial en las áreas del metabolismo de plantas, evaluación y selección de germoplasma, transformación genética, hibridación somática y biología molecular (Coleman *et al.*, 2001).

Más de medio siglo ha transcurrido desde que los microtubérculos fueran descritos en papa por primera vez, pero su adopción como propágulos semilla ha sido irregular a nivel mundial. Falta consenso con respecto a las prácticas óptimas de producción de microtubérculos y su relativa productividad en relación con otros propágulos para la producción de minitubérculos (Donnelly *et al.*, 2003). En la mayoría de los casos referidos anteriormente los microtubérculos se obtienen en recipientes de cultivo pequeños (de 250 a 300 ml de volumen total) a los cuales se adicionan entre 30 y 50 ml de medio de cultivo. Por consiguiente, la altura de las plantas *in vitro* está limitada por las dimensiones de los recipientes y para obtener un elevado número de microtubérculos se requiere manipular también un elevado número de estos, lo cual incrementa los costos. Además, se obtienen entre uno y dos microtubérculos por explante inicial (segmento nodal de aproximadamente 1.0 cm), generalmente son pequeños y con masa fresca inferior a 0.5 g. Por otra parte, no en todas las yemas axilares se induce la formación de microtubérculos y en algunas plantas que quedan sumergidas cuando se añade medio de cultivo líquido en la etapa de tuberización se produce hiperhidricidad. Todo ello ha atentado contra el uso de microtubérculos a escala comercial para la obtención de semilla. Sin embargo, su empleo para la conservación de germoplasma está ampliamente aceptado (Gopal *et al.*, 2004). Entre las alternativas para solucionar estas problemáticas se encuentran modificaciones en la composición del medio de cultivo, uso de reguladores del crecimiento (Estrada *et al.*, 1986; Leclerc *et al.*, 1994), manipulación de las condiciones de cultivo como la temperatura, la luz, el fotoperíodo (Seabrook *et al.*, 1993) y el uso de medios de cultivo líquidos que permiten la automatización del proceso y reducir los costos (Etienne y Berthouly, 2002), pero pueden causar hiperhidricidad (Ziv *et al.*, 1983).

Con respecto a este último aspecto, desde finales de los años 80 y principios de los 90 del siglo XX, Akita y Takayama (1988; 1993, 1994 a,b), informaron sobre investigaciones donde se evaluaba el uso de sistemas de cultivo con recipientes de mayor tamaño (vaso de un biorreactor) y con suministro semicontinuo del medio de cultivo líquido para obtener microtubérculos de papa.

Más adelante, otros autores han empleado sistemas de más bajo costo que los biorreactores con inmersión continua o parcial de los explantes en el medio de cultivo y con renovación o no del medio de cultivo para obtener microtubérculos en diferentes cultivares de papa (Ziv y Shemesh, 1996; Teisson y Alvard, 1999; Jiménez *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2000; Pérez-Alonso *et al.*, 2001; Chun *et al.*, 2003; Montoya *et al.*, 2008; Kamarainen-Karppinen *et al.*, 2010).

El incremento de la aereación en los recipientes del cultivo (Hussey, 1986) y el contacto intermitente entre el material vegetal y el medio de cultivo (con una frecuencia y tiempo determinado), pueden reducir la hiperhidricidad (Aitken-Christie y Jones, 1987). Estas dos características se combinan en los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT).

Sistemas de Inmersión Temporal

En la micropropagación de plantas, el ambiente *in vitro* donde éstas se desarrollan se caracteriza por alta humedad relativa, temperatura constante, baja densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD), gran fluctuación diurna en la concentración de CO₂, alta concentración de sacarosa, sales y sustancias reguladores del crecimiento en el medio de cultivo; además de la inclusión de agentes gelificantes, la acumulación de sustancias tóxicas y la ausencia de microorganismos (Aitken-Christie *et al.*, 1995). Estas condiciones nutricionales y ambientales son responsables de la morfología anormal, anatomía y fisiología de las plantas cultivadas *in vitro* (Desjardins, 1995). Se ha comprobado que causan bajas tasas de transpiración, fotosíntesis y absorción de agua, nutrientes y CO₂, así como altas tasas de respiración en la oscuridad, todo lo cual resulta en un crecimiento pobre del material vegetal (Aragón *et al.*, 2004; Aragón *et al.*, 2010; Ashraf *et al.*, 2011).

Varios estudios han revelado la capacidad de las plantas cultivadas *in vitro* de realizar fotosíntesis, sin embargo, esta se restringe por las condiciones del ambiente *in vitro* (Kubota, 2001), la composición del medio de cultivo y los reguladores del crecimiento (Király *et al.*, 2001).

En general, la fotosíntesis en las plantas bajo condiciones *in vitro* es menor que en condiciones *ex vitro* (Desjardins, 1995). La causa fundamental es la presencia de un medio heterotrófico con altos niveles de sacarosa (Arigita *et al.*, 2002), lo cual disminuye la actividad de la enzima RubisCO (Hdider y Desjardins, 1994). Además, altera considerablemente los procesos bioquímicos, fisiológicos y la morfología de las plantas cultivadas *in vitro* y es una fuente de estrés abiótico (Khuri y Moorby, 1995). Ashraf *et al.* (2011) confirmaron estas observaciones, utilizando un perfil de metabolitos y herramientas bioinformáticas. Estos autores estudiaron los cambios intracelulares del metabolismo causados por la adición exógena de sacarosa en el cultivo fotomixotrófico de plantas de papa y observaron su efecto en la aclimatización.

Las plantas *in vitro* bajo condiciones heterotróficas no requieren de la síntesis de sacarosa, pues la obtienen del medio de cultivo con gran facilidad. Aragón *et al.* (2004) describieron la asimilación de sacarosa del medio de cultivo a través de la actividad de la enzima invertasa ácida.

Para solucionar algunas de las problemáticas mencionadas anteriormente se han desarrollado sistemas de cultivo que permiten mejorar el ambiente *in vitro* y la nutrición. Estos incluyen el uso de medios de cultivo líquido y modificaciones en los recipientes y condiciones de cultivo.

Pérez *et al.* (1998) destacaron entre las ventajas del uso de medios de cultivo líquido:

- la mayor facilidad en la preparación, esterilización y manipulación,
- los nutrientes se absorben con mayor rapidez,
- hay mayor difusión de sustancias tóxicas producidas por el propio metabolismo de las plantas,
- se incrementa el número de plantas que se obtiene, dado por la disminución en el tiempo

de subcultivo, lo que disminuye los plazos de propagación,

- se produce un aumento en la productividad de los operarios de la cabina de flujo laminar, debido a que los explantes solo deben ser colocados en el medio de cultivo, sin la necesidad de manipularlos de forma individual,
- el cambio en la composición del medio de cultivo puede efectuarse por simple transferencia y esto facilita la automatización.

Sin embargo, tienen las siguientes limitantes:

- no todas las especies responden igual al crecimiento, ni todos los genotipos dentro de una misma especie se comportan igual,
- se observa una tendencia a la reducción del coeficiente de multiplicación a medida que se dan subcultivos continuos en medio de cultivo líquido,
- disminuye la oxigenación de los tejidos, lo cual reduce o elimina la formación de yemas axilares en los explantes,
- pueden ocasionar hiperhidricidad; un desorden fisiológico causado parcialmente por la presencia de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de los tejidos celulares.

Atendiendo a estos nuevos retos para el cultivo de plantas con medio de cultivo líquido, se han diseñado equipos y sistemas de cultivo que posibilitan su utilización en la propagación masiva, en los cuales la intervención de la mano de obra se minimiza. Estos se basan en la inmersión temporal de los explantes en el medio de cultivo (Aitken-Christie, 1991; Alvard *et al.*, 1994; Teisson *et al.*, 1994), solo durante unos minutos con determinada frecuencia diaria o mediante burbujeo.

Todos estos sistemas respetan las condiciones mencionadas por Teisson *et al.* (1999) entre las que se encuentran: evitan la inmersión continua del material vegetal en el medio de cultivo, proveen una adecuada transferencia de oxígeno, facilitan los cambios secuenciales y automatizados del medio de cultivo, reducen la contaminación microbiana y tienen bajo costo.

Entre las ventajas de los SIT sobre la micropropagación convencional en medios de cultivo semisólidos, se incluyen (Aitken-Christie, 1991; Pérez *et al.*, 1998):

- se pueden utilizar recipientes de cultivo de mayores dimensiones, y los tiempos de subcultivos pueden ser reducidos,

- contacto directo de los explantes con el medio de cultivo durante cada inmersión, lo que significa un aporte más eficiente de elementos nutritivos,
- tiempos de inmersión muy cortos, con lo cual se logra que los tejidos estén cubiertos por una película de medio de cultivo lo cual impide la desecación,
- hay baja resistencia a la difusión de gases y por lo tanto una mínima interrupción del intercambio de gases entre la planta o embrión y la atmósfera,
- renovación completa de la atmósfera dentro del recipiente de cultivo a intervalos regulares, lo que significa que no hay acumulación de gases nocivos como etileno,
- agitación por flujo de aire durante la fase de inmersión, lo que causa la dispersión de los tejidos vegetales.

Se ha señalado que la Inmersión Temporal reduce algunos de los problemas que se presentan en los cultivos permanentes en medio de cultivo líquido estático, como son la pobre calidad del propágulo y la necesidad de tener que subcultivarlos a medio de cultivo semisólido para el posterior crecimiento y enraizamiento. También permite el intercambio bi-direccional de las plantas con el medioambiente. En este sistema la renovación de gases dentro del frasco de cultivo favorece el crecimiento y desarrollo de los brotes (Etienne y Berthouly, 2002; Escalona *et al.*, 2003).

Se plantea, además, que en este tipo de sistema de cultivo las condiciones de renovación periódica de la atmósfera interna del frasco de cultivo logran en las plantas cultivadas una mejor relación entre la fotosíntesis y la transpiración, lo cual permite una mayor asimilación de nutrientes del medio de cultivo para su crecimiento (Escalona, 2006).

La estrategia de adaptación de las plantas a las condiciones de los Sistemas de Inmersión Temporal es una combinación de características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas que permiten un uso más eficaz de los recursos del medio interno en el recipiente de cultivo (Aragón *et al.*, 2004; Escalona, 2006).

Por ejemplo, Aragón *et al.* (2006) encontraron cambios en el metabolismo del carbono en

plantas *in vitro* de plátano (*Musa spp.*, AAA) cv. 'CEMSA ¾' cultivadas en condiciones de inmersión temporal. Estos se evidenciaron a través de altos niveles de actividades enzimáticas de invertasas ácidas (IA) y piruvato quinasa (PQ) acompañados de bajos niveles de actividad sacarosa fosfato sintasa (SFS) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (FEPC). Estos autores indicaron, además, que los cambios inducidos por el ambiente *in vitro* sobre los indicadores de fotosíntesis neta y transpiración demostraron la tendencia de las plantas *in vitro* a un comportamiento fotomixotrófico. Resultados similares en cuanto a la no dependencia total de los brotes de la fotosíntesis han sido obtenidos por otros autores (Escalona *et al.*, 2003; Aragón *et al.*, 2010).

Se ha descrito que los biorreactores para el cultivo de plantas permiten regular condiciones óptimas; entre ellas el pH (Lazzeri *et al.*, 1987; Smith y Krikorian, 1990) y la concentración de oxígeno disuelto (DO_2) en el medio de cultivo (Preil, 1991; Jay *et al.*, 1992; Jiménez *et al.*, 1995; De Fera *et al.*, 2003). En consecuencia, los sistemas donde se emplea la inmersión temporal de los explantes en el medio de cultivo, pero que permiten controlar alguno de los parámetros anteriores u otros se han nombrado como Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) (Escalona *et al.*, 2003).

Las condiciones de cultivo en SIT pueden afectar el crecimiento de las plantas *in vitro* y su estado fisiológico, a través de cambios en el medio ambiente *in vitro* durante todo el período de cultivo debido a las interacciones entre cada componente de las condiciones de cultivo y el crecimiento de las plantas (Kozai y Smith, 1995). Para lograr el crecimiento o multiplicación eficiente de los tejidos o embriones en SIT es necesario determinar la duración y frecuencia de las inmersiones, con lo cual se variarían las condiciones de cultivo dentro del recipiente de cultivo: suministro de nutrientes y atmósfera gaseosa. Por lo tanto estos son los factores más importantes que deben ser estudiados y que varían considerablemente de una especie a otra y de un tejido o fase de la propagación a otra (Pérez *et al.*, 1998).

Para mejorar la ventilación de los recipientes de cultivo se han utilizado filtros de gases con

membranas permeables. Al parecer, la concentración de CO₂ dentro de un recipiente de cultivo depende de una serie de factores: el recipiente (volumen, presión de aire, la cantidad de gas permeable, tipo de filtros, etc.), las plantas *in vitro* (biomasa o número de explantes, características fotosintéticas), el medioambiente (la concentración de CO₂ en la cámara de crecimiento, la velocidad de la corriente de aire, etc.). Al utilizar los filtros, la difusión de aire o la ventilación natural del recipiente de cultivo puede ser mejorada y la concentración de CO₂ en el interior del recipiente de cultivo se eleva durante el fotoperiodo, lo que resulta en una mayor fotosíntesis, e índices de crecimiento. Mientras tanto, la humedad relativa dentro del recipiente se reduce, lo que lleva al aumento de la transpiración, la absorción de nutrientes y el agua por las plantas (Xiao *et al.*, 2011).

A nivel mundial existen muchas investigaciones sobre el uso de sistemas semiautomatizados para el cultivo *in vitro* de células y tejidos de plantas de diferentes especies.

El efecto positivo de la inmersión temporal se ha descrito para la micropropagación, microtuberización y la embriogénesis somática de varias especies de plantas. Entre ellas, se destacan: embriogénesis somática en café (*Coffea arabica* L.) (Jiménez *et al.*, 1995; Berthouly *et al.*, 1995; Etienne *et al.*, 1997), cultivo de meristemos de caña de azúcar (*Sacharum* spp. híbrido) (Lorenzo *et al.*, 1998), micropropagación de piña (*Ananas comosus* L. Merr) (Escalona *et al.*, 1999), diferentes ornamentales (Daquinta *et al.*, 2001), Eucaliptos (*Eucalyptus grandis* Hill) (Castro *et al.*, 2001), *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. (Martre *et al.*, 2001), *Musa* spp. (Aragón *et al.*, 2009).

Tanto en el cultivo del ñame (*Dioscorea alata* L.) (Cabrerá *et al.*, 2008) como en papa (Jiménez *et al.*, 1999; Chun *et al.*, 2003; Montoya *et al.*, 2008) se ha empleado con resultados alentadores la inmersión temporal para la obtención de microtubérculos.

Estos SIT también han servido de base para estudios fisiológicos sobre los efectos de las concentraciones de CO₂, la intensidad de la luz y la concentración de sacarosa y su relación con cambios en el metabolismo en las plantas (Van Huylbroeck y De Riek, 1995; Aragón *et al.*, 2009).

Aplicaciones de la inmersión temporal en el cultivo de la papa

Se ha demostrado que los Sistemas de Inmersión Temporal estimulan tanto el crecimiento de las plantas *in vitro* como el proceso de tuberización en papa. Autores como Akita y Takayama (1994) lograron incrementar el número de tubérculos formados en un sistema con dos frascos de cultivo con respecto a resultados previos. Además, refirieron que los microtubérculos no se formaron en condiciones de inmersión completa o continua. Estas evidencias han sido corroboradas por otros investigadores (Tabla 1).

Aunque desde la década del 80, del siglo XX, se tienen referencias sobre el uso de medios de cultivo líquido y el intento de obtener microtubérculos de papa en sistemas con suministro semicontinuo del medio de cultivo, hasta el presente no se ha logrado consenso acerca de cuáles son las condiciones óptimas en SIT para cumplir con este propósito (Tabla 1). Se han empleado diferentes sistemas de cultivo, densidades de explantes, frecuencias de inmersión, tiempos de inmersión y medios de cultivo. No obstante, en todos ha sido un requisito fundamental la concentración elevada de sacarosa en el medio de cultivo (8.0 – 9.0%) (m/v), incluso en muchos casos se plantea que es el factor más importante dentro del conjunto que influye en este suceso (Yu *et al.*, 2000; Pérez-Alonso *et al.*, 2001).

Jiménez *et al.* (1999) demostraron ventajas comparativas de los SIT para obtener microtubérculos de papa en dos cultivares con respecto al empleo de medios de cultivo semisólido. Estas se manifestaron en incremento en la longitud de los brotes, mayor número de entrenudos por planta, mayor vigor, diámetro y masa fresca de microtubérculos.

El tiempo y la frecuencia de inmersión, el volumen de medio de cultivo por explante y la densidad de explantes por recipientes de cultivo están entre los principales parámetros que hay que tener presente en la producción de microtubérculos de papa en SIT. Además, en la composición del medio de cultivo se han variado las concentraciones de sacarosa y de reguladores del crecimiento.

Tabla 1. Compendio de trabajos científicos sobre la aplicación de Sistemas de Inmersión Temporal para la obtención de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.).

Autores	Tipo de SIT	Cultivar	No. explantes/vol. medio cultivo	Frecuencia/tiempo de inmersión	Medio de cultivo (por etapas)	Resultados
Akita y Takayama (1994a)	Vaso de biorreactor		?	?/Inmersión continua con aireación	MS, tiamina (4 mg), mio-inositol (100 mg l ⁻¹), 3% sacarosa para EC y 9% sacarosa para ET	220 microtub. en la parte aérea sin contacto con el medio de cultivo en 4 semanas
Akita y Takayama (1994b)	Sistema de control semicontinuo Frasco fermentador de 8 000 ml	'Atlantic'	?	6h/1h	MS, tiamina (4 mg), mio-inositol (100 mg l ⁻¹) y 3% sacarosa para EC y 9% sacarosa para ET	500 - 960 microtub. de 0.2 g en 12 semanas
Ziv y Shemest (1996)	Biorreactor con agitación y sistema de aire "airlift"	'Desirée'	20 segmentos nodales/50 ml	?	MS, mio-inositol (100 mg l ⁻¹), Sulfato de adenina (100 mg l ⁻¹), kinetina (KIN) (9.3 mg l ⁻¹), 3% sacarosa	36 microtub masa fresca que osciló entre 392 - 672 mg de 8 - 10 semanas,
Akita y Ohta (1998)	Biorreactor sin aireación forzada		10 segmentos nodales/frasco	?	MS, 9% de sacarosa para ET	27 microtub. por frasco con 15.8% de materia seca durante 3 semanas
Teisson y Alvard (1999)	RITA®	'Bintje', 'Ostara' y 'Desirée'	30 segmentos nodales	?/1h	?	1.5, 2.3 y 1.4 microtub./ plantas; 50% con masa fresca de 0.5 g a las 10 semanas de cultivo
Jiménez et al. (1999)	Dos frascos Nalgene® de 10 l	'Desirée' y 'Atlantic'	EC: 50 segmentos nodales/3 l ET: 50 segmentos nodales/3.5 l	EC: cada 3h x día /5 min ET: cada 4h x día/5 min	MS, mio-inositol (100 mg l ⁻¹), tiamina (0.5 mg l ⁻¹) y 2.0% de sacarosa para EC y 8% sacarosa para ET	3.1 y 2.8 microtub./plantas, 6.2% 'Desirée' y 7.2% 'Atlantic' mayores de 6 mm en 12 semanas

Ec: etapa de crecimiento microtub.: microtubérculos ET: etapa de tuberización t.: tiempo
MS: Medio de cultivo propuesto por Murshige y Skoog (1962)

Tabla 1: Compendio de trabajos científicos sobre la aplicación de Sistemas de Inmersión Temporal para la obtención de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.). continuación

Autores	Tipo de SIT	Cultivar	No. explantes/vol. medio cultivo	Frecuencia/tiempo de inmersión	Medio de cultivo (por etapas)	Resultados
Yu <i>et al.</i> (2000)	Biorreactores rotatorios de 1l de capacidad		EC: 50 segmentos nodales/ 100ml ET: 50 segmentos nodales/ 200ml	ET: cada dos semanas	MS, 3% de sacarosa	microtub. de 1.0 g de masa fresca
Pérez-Alonso <i>et al.</i> (2001)	Dos frascos de 10 l Nalgene®	'Atlantic'	EC: 60 segmentos nodales/4 l ET: 60 segmentos nodales/ 9 l	EC: cada 3 h/2 min ET: cada 6 h/2 min	MS, mio-inositol (100 mg l ⁻¹), tiamina (0.5 mg l ⁻¹) y 2.0% de sacarosa para EC y 8% sacarosa para ET	2.93 microtub. por planta en 12 semanas
Chun <i>et al.</i> (2003)	Biorreactores	'Atlantic'	50 segmentos nodales	cada 2 h/1h	MS, 3% de sacarosa para EC y 8% de sacarosa con 2.0 mg l ⁻¹ (BAP) para ET	microtub. con masa fresca entre 1.1 y 3.0 g
Montoya <i>et al.</i> (2008)	Biorreactores con frascos de 5 l	'Diacol capiro'	80 plantas	?/3h 3 min	MS, mio-inositol (100 mg l ⁻¹), tiamina HCl (0.4 mg l ⁻¹), pantotenato de calcio (1.0 g l ⁻¹), 6-BAP (1.0 mg l ⁻¹) 3% de sacarosa para EC y 8% de sacarosa para ET	229 microtub./frasco, 89,6% de los microtub., estuvieron entre 0.8 – 1.2 g con diámetro de 8 mm a las 6 semanas
Kamarainen <i>et al.</i> (2010)	Biorreactor con ventilación forzada	'Asterix', 'Timo', 'Van Gogh', 'Velox'	EC y ET: 50 segmentos nodales/125 ml	EC: cada 1 h/1 min ET: cada 1h/2 min	MS, 2% sacarosa para EC y 8% de sacarosa para ET	microtub./planta 0.67 g de masa fresca. (12–16 semanas en dependencia del cultivo

Ec: etapa de crecimiento microtub.; microtubérculos ET: etapa de tuberización t.: tiempo
MS: Medio de cultivo propuesto por Murshige y Skoog (1962)

Por ejemplo, Ziv y Shemenst (1996), evaluaron para la microtuberización de la papa en biorreactores, el efecto de la renovación del medio de cultivo. Estos autores reemplazaron cada dos semanas el medio de cultivo y lograron un rápido crecimiento de los microtubérculos, debido, según sus resultados a los altos niveles de sacarosa que son necesarios en el medio de cultivo para el desarrollo de la microtuberización.

Igualmente, autores como Teisson y Alvarad (1999), evaluaron varios tiempos de inmersión cada seis horas para la formación de microtubérculos en el sistema RITA® y obtuvieron los mejores resultados con un tiempo de inmersión de 60 minutos cada seis horas. Además, demostraron que el volumen de medio de cultivo por segmento nodal influyó en la producción de microtubérculos de papa. Estos autores variaron el volumen de medio de cultivo según el volumen del frasco.

Por su parte, Yu *et al.* (2000), evaluaron la utilización de sacarosa durante el crecimiento de microtubérculos de papa en biorreactores rotatorios. Estos investigadores reemplazaron el 75.0% del medio de cultivo cada dos semanas de cultivo y lograron cuadruplicar el número de microtubérculos con una masa fresca superior a 1.0 g en comparación con el tratamiento donde no hubo reemplazo del medio de cultivo. Además, señalaron que el principal factor para la producción de microtubérculos de mayor masa fresca en biorreactores era mantener un adecuado suministro de sacarosa durante toda la fase de desarrollo de los microtubérculos debido a la rápida hidrólisis que esta sufre.

Chun *et al.* (2003), estudiaron varias densidades de inóculo y los mejores resultados con microtubérculos de masa fresca, fueron al inocular 50 segmentos nodales del cu. 'Atlantic', Estos autores describieron un protocolo simple para la producción de microtubérculos de papa en biorreactor y revelaron que el crecimiento de los segmentos nodales y la formación de los microtubérculos fueron mucho más eficientes con la inmersión temporal que con la inmersión constante en medio de cultivo líquido sin ventilación, en el cual los explantes crecieron pobremente debido posiblemente a la carencia de oxígeno y a la acumulación de etileno.

En el cultivar 'Diacol Capiro', Montoya *et al.* (2008), lograron la tuberización *in vitro* como resultado de enriquecer el medio de cultivo en la etapa de tuberización con vitaminas, antioxidantes y reguladores del crecimiento.

Los SIT ofrecen la posibilidad de producir microtubérculos con diámetros y masa fresca adecuados para que puedan ser plantados en campo (Jiménez *et al.*, 1999; Pérez-Alonso *et al.*, 2001). Además, se elimina la problemática de trasladar plantas *in vitro* y se puede prescindir de la fase de producción de minitubérculos en casas de cultivo (Jiménez-Terry *et al.*, 1999).

El Sistema de Inmersión Temporal también puede ser utilizado para la multiplicación de brotes fuera de la época de siembra, cuando las plantas *in vitro* no pueden ser inmediatamente aclimatizadas y trasplantadas. Por lo tanto, varias estrategias son accesibles mediante la combinación de la inducción y el almacenamiento de microtubérculos, de acuerdo con los patrones estacionales de la agricultura en el cultivo de la papa (Jiménez *et al.*, 1999).

Estos resultados han evidenciado la factibilidad del uso de SIT para obtener microtubérculos de papa.

Producción de minitubérculos en casa de cultivo y campo

Las desventajas principales de un programa de semilla de papa basado en métodos de propagación convencional están relacionadas con la baja tasa de multiplicación de las plantas crecidas en campo lo que resulta en un sistema lento e inflexible, con riesgo creciente de enfermedades virales, fúngicas o bacterianas a medida que se incrementa el número de multiplicaciones. Por ello, una de las alternativas para disminuir el número de multiplicaciones necesarias en campo para obtener suficiente cantidad de semilla, es producir minitubérculos en ambientes protegidos (Lommen, 1995).

Con el cultivo *in vitro* de plantas a partir de segmentos nodales se pueden producir plantas enraizadas que posteriormente se aclimatizan y pueden plantarse en casas de cultivo o campo para producir minitubérculos (Struik y Lommen 1990b; 1999).

Los minitubérculos son pequeños tubérculos de papa obtenidos después de la aclimatación de plantas cultivadas *in vitro* y plantadas a alta densidad en casas de cultivo, canteros o contenedores donde se usan diferentes mezclas de sustratos. Los minitubérculos pueden producirse durante todo el año siempre que las casas de cultivo cuenten con condiciones para ello y son principalmente utilizados para la producción de semilla prebásica o básica por siembra directa en campo (Lommen, 1999, Ritter *et al.*, 2001). Con el uso de minitubérculos en un programa de semilla puede reducirse el número de multiplicaciones en campo y el tiempo necesario para obtener volúmenes adecuados de semilla de un cultivar (Lommen y Struik, 1992; 1994).

Algunos sistemas comerciales de producción de semilla de papa que emplean la micropropagación se basan en la plantación de los microtubérculos y las plantas *in vitro* en casas de cultivo, para multiplicar mediante cortes sucesivos a las plantas madre o para obtener minitubérculos. Ésta se realiza en ambientes protegidos por malla antiáfidos o directamente en campo (Salas, 1995; Agramonte, 1999; Bolandi *et al.*, 2011).

Al igual que en otras especies, la calidad de las plantas *in vitro* es uno de los factores más importantes que garantiza el éxito durante la transición a las condiciones *ex vitro* (Van Huylenbroeck y De Riek, 1995; Estrada-Luna *et al.*, 2001; Crafts-Brandner *et al.*, 2002).

Cuando se emplean plantas *in vitro* para obtener minitubérculos en campo se afrontan dificultades con el traslado y se incrementan las pérdidas por los daños que estas sufren (Jiménez-Terry *et al.*, 2011). En este sentido, los microtubérculos tienen ventajas ya que su manipulación y traslado es más fácil y se pueden almacenar (Lakhowa y Ellouze, 1993; Pruski *et al.*, 2003; Kanwal *et al.*, 2006). No obstante, los microtubérculos obtenidos en medios de cultivo semisólido generalmente no tienen el diámetro y la masa fresca adecuada para su plantación directa en campo (Kanwal *et al.*, 2006; Ebadi e Iranbakhsh, 2011).

Kawakami *et al.* (2003) informaron sobre el crecimiento y rendimiento en campo de plantas de papa procedentes de microtubérculos. En

el cultivar 'Norin 1', estos autores emplearon microtubérculos con 0.5 – 1.0 g y de 1.0 – 3.0 g de masa fresca y tubérculos de semilla convencional de 50.0 g de masa fresca y demostraron el potencial de los microtubérculos para la producción de semilla. Aunque al inicio las plantas procedentes de microtubérculos tenían menor superficie foliar que las de semilla convencional, en los siguientes 40 días de cultivo los índices de esta variable fueron similares.

Gopal *et al.* (1998) evaluaron en campo microtubérculos de 22 genotipos de papa en comparación con tubérculos semillas. El trabajo se desarrolló durante dos años, en dos estaciones, primavera y otoño. Estos investigadores concluyeron que es posible establecer criterios de selección en las plantas a partir de los microtubérculos, debido a la estabilidad en cuanto a hábito de crecimiento de los tallos, características morfológicas de las hojas, pigmentación de los tallos, vigor de la planta, así como para la forma y el color de los tubérculos en comparación con las plantas que se obtuvieron de los tubérculos semilla utilizados tradicionalmente para la propagación de este cultivo.

Por su parte, Pérez-Alonso *et al.* (2001) emplearon los Sistemas de Inmersión Temporal y lograron comparar en campo microtubérculos del cultivar 'Desirée' con minitubérculos procedentes de plantas *in vitro*. Los microtubérculos mostraron un mayor rendimiento, diámetro y masa fresca.

Según Pruski *et al.* (2003), en los microtubérculos de papa producidos en los sistemas de cultivo automatizados, los de mayor tamaño y masa fresca, son los más deseados para la producción comercial, porque ellos pueden ser usados para obtener minitubérculos en condiciones de casa de cultivo o pueden ser plantados en campo sin previa fase de aclimatación, o almacenados durante un período determinado de tiempo, sin pérdida excesiva de masa fresca que puedan afectar su brotación.

También, Montoya *et al.* (2008) evaluaron en campo la respuesta de microtubérculos obtenidos en SIT. Estos produjeron mayor número de minitubérculos que las plantas *in vitro* y los minitubérculos lo que permitió

demostrar que estos materiales vegetales se pueden emplear en programas de producción de semilla.

El sustrato empleado en las casa de cultivo influye en el desarrollo de las plantas *in vitro* y microtubérculos. Por ejemplo, Kowalski *et al.* (1999) informaron diferencias significativas en la supervivencia y sanidad de poblaciones de las plantas *in vitro* de papa en la fase de aclimatización cuando utilizaron bolsas con sustrato zeolita 100.0%, de forma comparativa con poblaciones de plantas *in vitro* plantadas en un suelo ferralítico rojo típico. Por su parte, Jiménez- Terry *et al.* (2011) plantearon que la producción de minitubérculos de papa cv. 'Desirée' en casa de cultivo con sustrato zeolita a partir de plantas cultivadas *in vitro* puede incrementarse y que la supervivencia y el rendimiento neto eran mayores que en campo, al igual que las pérdidas desde el traslado para la conservación en frigorífico fueron menores.

CONCLUSIONES

Atendiendo al análisis de la literatura científica consultada se puede considerar que la obtención de semilla de papa es una de las actividades de mayor importancia para garantizar la producción sustentable de este tubérculo. En este contexto, la biotecnología agrícola puede contribuir a incrementar la eficiencia en la multiplicación de material vegetal libre de patógenos y con calidad genética, morfológica y fitosanitaria. Se ha comprobado que el uso de medios de cultivo líquidos y los Sistemas de Inmersión Temporal permiten obtener microtubérculos de mayor calidad que junto con las plantas *in vitro* pueden formar parte de un esquema de producción de semilla. Además, los microtubérculos tienen ventajas sobre las plantas *in vitro* ya que se facilita su manipulación, almacenamiento y conservación, entre otras. Considerando que la tuberización *in vitro* es un proceso complejo que es afectado por las condiciones de cultivo, además de otros factores genéticos y fisiológicos, se requieren estudiar las condiciones que permitan lograr dicho propósito en los cultivares de interés comercial.

AGRADECIMIENTOS

A las facilidades creadas por el Convenio de Colaboración Cuba-Venezuela para el

desarrollo de la tesis doctoral de la autora, de la cual forma parte este trabajo.

REFERENCIAS

- Abdala, G, G Castro, M M Guifiazi, R Tizio, O Miersch (1996) Occurrence of jasmonic acid in organs of *Solanum tuberosum* L. and its effect on tuberization. *Plant Growth Regulation* 19: 139-143
- Agramonte, D (1999) Métodos biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis para aspirar al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba
- Ahloowalia, BS (1994) Production and performance of potato mini-tubers. *Euphytica* 75:163-72
- Aitken-Christie, J (1991) Automation. En: Debergh PC, Zimmerman RJ (eds). *Micropropagation: Technology and Application*, pp. 363-388. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Aitken-Christie, J, Jones C (1987) Towards automation: radiate pine shoot hedges *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 8: 185-196
- Aitken-Christie, J, Kozai T, Smith MAL (1995) *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht
- Akita, M, Takayama S (1994a) Induction and development of potato tubers in jar fermentor. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 36: 177-182
- Akita, M, S Takayama (1994b) Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Report* 13: 184-187
- Akita, M, Takayama, S (1993) Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Rep* 13: 184-187
- Akita, M, S Takayama (1988) Mass propagation of potato tubers using jar fermentor
- Akita, M, Y Ohta (1998) A simple method for mass propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a bioreactor without forced aeration. *Plant Cell Reports* 18: 284-287
- Aragón, C E, Escalona M, Capote I, Pina D, Cejas I, González-Olmedo J (2004) Evaluación del efecto de las condiciones generadas por Biorreactores de inmersión temporal sobre enzimas y procesos clave del metabolismo del carbono en plantas *in vitro* de

- plátano cv. CEMSA ¾. Biotecnología Vegetal 4 (3): 147-152
- Aragón, C E, Escalona Maritza, Capote Iris, Cejas Inaudis, Rodríguez R, Sandoval J, Roels Sophie, Debergh P, González-Olmedo, J L (2006) Aspectos metabólicos del crecimiento y desarrollo de las plántulas de plátano (CEMSA ¾) micropropagadas en biorreactores de inmersión temporal (BIT). Cultivos Tropicales 27(1): 39-44
- Aragón, C, Carvalho, L, González, J, Escalona, M, Amancio, S (2009) Distinct patterns of responses in sugarcane plantlets (*Saccharum* spp. hybrid) micropropagated in Jell Medium (JM) and by Temporary Immersion Bioreactors (TIB). Acta Horticulturae 812: 441- 446
- Aragón, CE, Maritza Escalona, Rodríguez R, Cañal MJ, Capote I, Pina D, González-Olmedo J (2010) Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* 46: 89–94
- Arigita, L, González A, Tamés R. S. (2002). Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 115: 166–173
- Ashraf, Badr, Paul Angers, Yves Desjardins (2011) Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 107: 13–24
- Aslam, A, Ali A, Naveed NH, Saleem A, Iqba I J (2011) Effect of interaction of 6-benzyl aminopurine (BA) and sucrose for efficient microtuberization of two elite potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars, 'Desirée' and 'Cardinal'. *African Journal of Biotechnology* 10(59): 12738-12744
- Barker, WG (1953) A method for the *in vitro* culturing of potato tubers. *Science* 118: 384–385
- Bolandi, A R, Hamidi H, Ghavidel R A (2011) The effects of size and microtuber dormancy on production of potato minitubers american- Eurasian. *J. Agric. Environ. Sci.* 10 (2): 169-173
- Bou-Torrent, J, Martínez-García JF, García-Martínez JL, Prat S (2011) Gibberellin A1 metabolism contributes to the control of photoperiod-mediated tuberization in potato. *PLoS ONE* 6(9): e24458
- Cabrera, M, Gómez R, Rodríguez S, López J, Cabrera AR, Basail M, Santos A, Mederos V, Rodríguez G (2008) Multiplicación *in vitro* de segmentos nodales del clon de ñame Blanco de Guinea (*Dioscorea cayenensis*- *D.rotundata*) en sistemas de cultivo semiautomatizado. *Rev Colombiana Biotecnología* 8(2): 54-61
- Calderón, AL, Valvueda R, Hidalgo R, Moreno JD (2008) Microtuberización *in vitro* de siete accesiones de papa de la colección central colombiana. *Acta Agronómica (Palmira)* 57(3): 175-180
- Castro, D (2001) Propagación mixotrófica de *Eucalyptus 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 Bioplantas. Cuba
- Chun, X P, Chakrabarty D, Joo E H, Yoeup K P (2003) A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. *Current Science* 84 (8): 25
- Coleman, WK, Donnelly, DJ, Coleman, S E (2001) Potato microtubers as research tools: a review. *American Journal of Potato Research* 78: 47-55
- Cutter, EG (1978) Structure and development of the potato plant. En: JD Ivins, FL Milthorpe (Eds.). *The Growth of the Potato*, pp. 99–113. Butterworth. London
- Daquinta, M, Espinosa P, Escalona M, Rodríguez R, Guerra M (2001) Bromeliad micropropagation in temporary immersion system. *Journal of the Bromeliad Society* 51(2): 80-85
- De Fera, M, Jiménez E, Barbón R, Capote A, Chávez M, Quiala E (2003) Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 1–6
- Debergh P (1983) Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.* 59: 270-276
- Desjardins, Y (1995) Photosynthesis *in vitro*- on the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems. *Acta Hort.* 393: 45-59
- Dobranski, J, Mandi M (1993) Induction of *in vitro* tuberization by short day period and dark treatment of potato shoots grown on hormone-free medium. *Acta Biol Hung* 44: 411–420
- Donnelly, DJ, Coleman WK, Coleman SE (2003) Potato microtuber production and performance. *Am. J. Potato Res.* 80: 103-115
- Ebadi, M, Iranbakhsh A (2011) The induction and growth of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers (sante cultivar) in response to the different concentrations of 6-benzylaminopurine and sucrose. *African Journal of Biotechnology* 10(52): 10626-10635

- Escalona, M (2006) Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophyta Annual* 48-49
- Escalona, M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, González JL, Desjardins Y, Borroto CG (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.* 18: 743-748
- Escalona, M., Lorenzo J., Borroto C., Daquinta M. (2003). Procedimiento y equipo para la propagación de plantas por inmersión temporal. Patente 2744. La Habana
- Estrada, R, Tovar P, Dodds JH(1986) Induction of *in vitro* tubers in a broad range of potato genotypes. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 7: 3-10
- Estrada-Luna, AA, Davies FT, Egilla JN (2001) Physiological changes and growth of micropropagated chile ancho pepper plantlets during acclimatization and post-acclimatization. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 66: 17-24
- Etienne, E, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 69: 215-231
- Etienne, H, Lartaud M, Michaux-Ferriere N, Carron M P, Berthouly M, Teisson C (1997) Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brassiliensis* (Mull:Arg.) using the temporary immersion technique. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 33: 81-87
- Ewing, EE, Struik PC (1992) Tuber formation in potato: induction, initiation and growth. *Hort Rev* 14: 89-198
- FAO (2008) Año Internacional de la Papa. [En línea] En: <http://www.potato2008.org/es/index.html>. Consultado 23 noviembre 2010
- FAOSTAT (2010) Venezuela Producción de Papa. [En línea] En: <http://FAOSTAT.FAO.org/site/567/> Consultado 23 Nov 2010
- Fujiwara, K, Kiras S, Kozai T (1995) Contribution of photosynthesis to dry weight increase of *in vitro* potato culture under different CO₂ concentrations. *Acta Hort.* 393: 119-126
- García-Flórez, M, Portela-Ramírez A, Flórez-Roncancio VJ (2009) Sustancias con actividad citoquinínica estimulan la brotación de yemas en tubérculos de papa. *Bragantia, Campinas* 68 (3): 555-562
- Garner, N, Blake J (1989) The induction and development of potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. *Ann. Bot.* 63: 663-674
- Gopal, JL, Minocha HS, Dhaliwa I (1998) Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Reports* 17: 794-798
- Gopal, J, Chamail A, Sarkar D (2004) *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germoplasma: effect of genotype, abscisic acid and sucrose. *In vitro Cell Dev. Plant* 40: 485-490
- Harvey, BMR, Crothers SH, Watson S, Lee HC (1992) Heat inhibition of tuber development in potato (*Solanum tuberosum* L.): effect on microtuber formation *in vitro*. *Potato Research* 35: 183-190
- Hawkes, JG (1990) The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. Belhaven Press. London
- Hawkes, JG (1994) Origin of the cultivated potatoes and species relationships. En: Bradshaw JE, Mackay GR (eds.) *Potato Genetics*, pp. 3-42. CAB International. Wallingford
- Háider, C, Desjardins Y (1994) Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell Tissue Org Cult* 36: 27-33
- Hoque, ME (2010) *In vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Omics Journal* 3(1): 7-11
- Hosaka, K, Hanneman RE (1988) The origin of the cultivated tetraploid potato based on chloroplast DNA. *Theor Appl Genet* 76 (2): 172-176
- Huamán, ZA, Golmirzaie T, W Amoros (1997) The Potato. En: Dominic Fuccillo, Linda Sears Paul Stapleton (eds). *Biodiversity in trust: conservation and use of plant genetic resources in CGIAR Centres*. Chapter 2, pp. 21-28. Cambridge. University Press Cambridge
- Huamán, Z (1986) Botánica sistemática y morfología de la Papa. *Boletín de Información Técnica* 6. Centro Internacional de la Papa. Lima
- Huamán, Z (2007) Descriptores morfológicos de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Centro de la conservación de la biodiversidad agrícola de Tenerife. CCBAT. Tenerife
- Hussey, G (1986) Problems and prospects in the *in vitro* propagation of herbaceous plants. En: Withers LA y Alderson PG (eds) *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*, pp. 69-84. Butterworths, Boston
- Hussey, G, Stacey NJ (1984) Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann Bot* 53: 565-578
- Jackson, SD (1999) Multiple Signaling Pathways Control Tuber Induction in Potato. *Plant Physiol.* 119: 1-8

- Jackson, SD, Prat S (1996) Control of tuberisation in potato by gibberellins and phytochrome B. *Physiol Plant* 98: 407-412
- Jay, V, Genestier, S Courduroux, JC (1992) Bioreactor studies on the effect of dissolved oxygen concentrations on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota* L.) cell cultures. *Plant Cell Rep.* 11: 605-608
- Jiménez, E, Pérez J, Gil V, Herrera J, García L, Alonso E (1995) Sistema para la propagación de la caña de azúcar. En: Estrada M, Riego E, Limonta E, Tellez P, Fuente J (Eds). *Avances en Biotecnología Moderna*, pp.11-20. *Elfos Scientiae*. La Habana
- Jiménez, E, Pérez N, De Fera M, Barbón R, Capote A, Chávez M, Quiala E, Pérez J (1999) Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59: 19-23
- Jiménez-Terry, F, Agramonte D, Pérez M, León M, Alvarado- Capó Y (2011) Conservación de minitubérculos de papa con el uso de zeolita en polvo. *Biotecnología Vegetal* 11 (2): 89 – 98
- Jiménez-Terry, 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 Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara, Cuba
- Jiménez, E, Pérez N, De Fera M, Barbón R, Capote A, Chávez M, Quiala E, Pérez J (1999) Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59: 19-23
- Jiménez-Terry, F, Agramonte D, Pérez Ponce JN, Ramírez D, Gutiérrez O, Pérez M (2001) Aclimatización de plantas *in vitro* de *Solanum tuberosum* (L.) variedad 'Desirée'. *Biotecnología vegetal* 1 (2): 103-108
- Jiménez-Terry, F, Agramonte D, Pérez M, León M, Rodríguez M, De Fera M, Y Alvarado-Capó (2010) Producción de minitubérculos de papa var. 'Desirée' en casa de cultivo con sustrato zeolita a partir de plantas cultivadas *in vitro*. *Biotecnología vegetal* 10 (4): 219-228
- Kamarainen, Karppinen, T, E Virtanen, VM Rokka, A M Pirttila (2010) Novel bioreactor technology for mass propagation of potato microtubers. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 101: 245-249
- KanwaL A, Ali A, Shoaib K (2006) *In vitro* Microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivar Kuroda— a new variety in Pakistan. *Int. J. Agri. Biol.* 8 (3): 337-340
- Kawakami, J, Iwamak T, Hasegawa T, Jitsuyama Y (2003) Growth and yield of potato plants grown from microtubers in fields. *American J. Potato Res.* 80: 371-378
- Khuri, S, Moorby J (1995) Investigation into the role of sucrose in potato cv. 'Estima' microtuber production *in vitro*. *Ann Bot* 75: 295-303
- Király, I, Balla I, Jakab J, Tamás L, Sárvári E (2001) Responses of the photosynthetic system and peroxidase activity to the rooting conditions of osk micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 66: 155-158
- Kubota, C (2001) Concepts and background of photoautotrophic micropropagation. En: Morohoshi N, Komamine A (eds), *Molecular breeding of woody plants*, pp. 325-334. Elsevier. Amsterdam
- Lago, CL (1991) Cultivo de tejidos para la producción de semilla básica de papa. En: Roca W, LA Mrogrinski (Eds). *Cultivo de tejidos en la Agricultura, fundamentos y aplicaciones*. CIAT. Cali
- Lakhoua, L, O Ellouze (1993) Utilisation des microtubercules produits *in vitro* pour la production de semences de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). En: Aupelf-Uref (Ed.) *Le progres genetique et l'inventaire des genes*, pp. 233-236. John Libbey Eurotext. Paris
- Lazzeri, P, Hildebrand D, Collins G (1987) Soybean somatic embryogenesis: effects of nutritional, physical and chemical factors. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 10: 209-220
- Leclerc Y, Donnelly DJ, Seabrook JE (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
- Lewis, CE, JRL Walker, JE Lancaster, AJ Conner (1998) Upregulation of antocyanin, flavonoid and phenolic acid biosynthesis a potato minitubers *in vitro*. *Aust J Plant Physiol* 25: 915- 922
- Lommen, WJ (1999) Causes for low tuber yields of transplants from *in vitro* potato plantlets of early cultivars after field planting. *Journal of Agricultural Science* 133: 275-284
- Lommen, WJ, Struik PC (1992) Production of potato minitubers by repeated harvesting: effects of crop husbandry on yield parameters. *Potato Research* 35: 419-432

- Lommen, WJ, Struik PC (1994) Field performance of potato minitubers with different fresh weights and conventional seed tubers: crop establishment and yield formation. *Potato Res.* 37: 301-313
- Lommen, WJ, (1999) Causes for low tuber yields of transplants from *in vitro* potato plantlets of early cultivars after field planting. *Journal of Agricultural Science* 133: 275-284
- Montoya, N, Castro D, Díaz J, Ríos D (2008) Tubercización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.), variedad Diacol Capiro, en Biorreactores de Inmersión Temporal y evaluación de su comportamiento en campo. *CIENCIA* 16(3): 288 – 295
- Naik, PS, Karihaloo JL (2007) Micropropagation for production of quality potato seed in Asia-Pacific. Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology, New Delhi, India
- Navarro, C, Abelenda JA, Cruz-Oró E, Cuéllar CA, Tamaki S, Silva J, Shimamoto K, Prat S (2011) Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature* 478 (7367): 119-22
- Ochoa, C (2001) La Papa de Sudamérica: Bolivia. Primera Edición. Prural. La Paz
- Oparka, KJ (1985) Changes in partitioning of current assimilate during tuber bulking in potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Maris Piper. *Ann. Bot.* 55: 705–713
- Orellana, P (1998) Propagación vía organogénesis. En: Pérez, J (Ed). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología, pp. 151-176. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara
- Otroshy, M, Nazarian F, Struik PC (2009) Effects of temperature fluctuation during *in vitro* phase on *in vitro* microtuber production in different cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 98: 213–218
- Percival, GC (1999) The influence of light upon glycoalkaloid and chlorophyll accumulation in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Science* 145: 99–107
- Pereira, JES, de Franca RB, de M Dantas, AC, Fortes, GRL (2005) Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. *Horticultura Brasileira* 23(1): 86-89
- Pérez-Alonso, N, de Fera M, Jimenez E, Capote A, Chávez M, Quiala E (2001) Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para la producción a gran escala de tubérculos *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. var. Atlantic y estudio de su comportamiento en campo. *Biotecnología Vegetal* 1: 17-21
- Prat, S, Frommer WB, Höfgen R, Keil M, Kossmann J, Köster-Töpfer M, Liu XJ, Müller B, Peña-Cortés M, Rocha-Rosa M, Sánchez-Serrano JJ, Sonnewald U, Willmitzer L (1990) Gene expression during tuber development in potato plants. *FEBS Lett.* 286: 334–338
- Pruski, K, Astatkie T, Duplessis P, Stewart L, Nowak J, Struik PC (2003) Manipulation of microtubers for direct seed utilization in seed production. *Am. J. Potato Res.* 80: 173-181
- Rafique, T, Jafar M I, Hasnain J, Abbas M (2004) *In vitro* studies on microtuber Induction in potato. *Int. J. Agri. Biol.* 6 (2): 6
- Raíces, M, Ulloa RM, MacIntosh GC, Crespi M, Téllez-Iñón MT (2003) StCDPK1 is expressed in potato stolon tips and is induced by high sucrose concentration. *J Exp Bot* 54: 2589–2591
- Ranalli, P, F Bassi, G Ruaro, G Mandolino (1994) Microtuber and minituber production and field performance compared with normal tubers. *Potato Res.* 37: 383-391
- Ritter, E, Angulo B, Riga P, Herran C, Relluso J, San Jose, M (2001) Comparison of hydroponic and aeroponic cultivation systems for the production of potato minitubers. *Potato Research* 44: 127-135
- Salas, RJ (1995) Producción de semilla pre-básica de Papa. FONAIAP Divulga, 48
- Sarkar, D (2008) The signal transduction pathways controlling in planta tuberization in potato: an emerging synthesis. *Plant Cell Rep* 27: 1-8
- Scherwinski, P, Luces GR (2004) Organogênese de ápices meristemáticos de batata em meios de isolamento e multiplicação *in vitro*. *Horticultura Brasileira* 22(2): 197-201
- Seabrook, JE, Coleman, S, Levy, D (1993) Effect of photoperiod on *in vitro* tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34: 43-51
- Sheen, J, Zhou L, Jang JC (1999) Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 410-418
- Simmons, T, Machado, VS, Coffin, R (1989) The effect of light on *in vitro* tuberization of potato cultivars. *American Potato Journal* 66: 843-848
- Smith, DL, Krikorian AD (1990) Somatic embryogenesis of carrot in hormone-free medium:

- external pH control over morphogenesis. *American Journal Botany* 77: 1634-1647
- Struik, P, Lommen W (1990) Production, storage and use of micro- and minitubers. En: Proceedings of the 11th Triennial Conference of the European association for Potato Research, pp. 122-123) Edinburgh, UK
- Struik, PC, Lommen WJM (1990) Field performance of minitubers of different sizes. Abstracts 11th Triennial Conference of the European Association for Potato Research pp. 376-377 EAPR. Edinburgh
- Struik, PC, Lommen WJ (1999) Improving the field performance of micro-minitubers. *Potato Research* 42(3-4): 59-568
- Teisson, C, Alvard, D (1999) *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. *Potato Res.*42: 499-504
- Teisson, C. D. Alvard (1994). A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary immersion. VII Int. Congress IAPTC, Firenze. Book of Abstracts
- Tovar, P, Estrada R, Shildre-Rentschler L, Dodds J (1985) Inducción y utilización de tubérculos *in vitro* de papa. Centro Internacional de la papa 13(4): 5
- Van, Huylenbroeck J, de Riek J (1995) Sugar and starch metabolism during *ex vitro* rooting and acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* Petite plantlets. *Plant Sci.* 111: 19-25
- Veramendi, J, L Willmitzer, RN Trethewey (1999) *In vitro* grown potato microtubers are a suitable system for the study of primary carbohydrate metabolism. *Plant Phys Biochem* 37: 693-697
- Vespasiano, B, Campos O (2003) Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? *Scientia Horticulturae* 97: 193-202
- Villafranca, MJ, Varamendi J, Sota V, Mingo-Castel, AM (1998) Effect of physiological age of mother tuber and number of subcultura on *in vitro* tuberization of potato (*Solanum tuberosum*. L.). *Plant cell Report* 17: 787-790
- Viola, R, Roberts AG, Haupt S, Gazzani S, Hancock RD, Marmioli N, Machray GC, Oparka KJ (2001) Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *The Plant Cell* 13: 385-398
- Visser, RGF, Vreugdenhil D, Hendriks T, Jacobsen EJ (1994) Gene expression and carbohydrate content during stolon to tuber transition in potatoes (*Solanum tuberosum*). *Physiologia Plantarum* 90: 285-292
- Vreugdenhil, D, Boogaard Y, Visser R, de Bruijn SM (1998) Comparison of tuber and shoot formation from *in vitro* cultured potato explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 197-204
- Vreugdenhil, D, Xu X, Jung CS, van Lammeren AAM, Ewing EE (1999) Initial anatomical changes associated with tuber formation on single- node potato (*Solanum tuberosum* L.) cuttings: a re-evaluation. *Ann Bot* 84: 675-680
- Wang, P, Hu C (1982) *In vitro* mass tuberization and virus free seed potato production in Taiwan. *Am Potato J* 59: 33-37
- Wattimena, GA (1983) Micropropagation as an alternative technology for potato production in Indonesia. Ph.D. tesis. Univ Wisconsin-Madison. 202 pp.
- Xiao, Y, Niu G, Kozai T (2011) Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 105: 149-158
- Xu, X, M van Lammeren AA, Vermeer E, Vreugdenhil D (1998) The Role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation *in vitro*. *Plant Physiology* 117(2): 575-584
- Yu, W, Joyce P, Cameron D, McCown B (2000) Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. *Plant Cell Reports* 19: 407-413
- Zimmerman, RH, Desjardins Y (1995) Environmental effects and their control in plant tissue culture-overview. *Acta Horticulturae* 393: 11-14
- Ziv, M, Shemesh D (1996) Propagation and tuberization of potato bud clusters from bioreactors culture. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 32: 31-36