

Microtuberización *in vitro* de siete accesiones de papa de la colección central colombiana

In vitro microtuberization of seven accessions of potato from colombian central collection

Ángela Liliana Rivera Calderón,¹ Raúl Iván Valbuena Benavides,² Rigoberto Hidalgo Hidalgo,³ José Dilmer Moreno Mendoza⁴

¹ y ³ Universidad Nacional de Colombia, A.A. 237. Palmira, Valle;² y ⁴ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), C.I. Tibaitatá, km 14 vía Mosquera-Bogotá. Autor para correspondencia: rhidalgo@palmira.unal.edu.co

REC.: 09-04-07

ACEPT.: 08-07-08

RESUMEN

Se evaluó la producción *in vitro* de microtubérculos de papa (cuatro accesiones de *S. tuberosum* ssp *andigena* y tres de *S. phureja* de la Colección Central Colombiana). Se emplearon dos protocolos (líquido-líquido y sólido-líquido) en un diseño completamente al azar con arreglo factorial. Las variables evaluadas al momento de la cosecha fueron número de microtubérculos con tamaño inferior a 0.5cm, superior a 0.5cm y número total. La producción de microtubérculos estuvo determinada por el genotipo, el protocolo y las diferentes concentraciones de las hormonas Benzilaminopurina (BAP) y Cloruro de Cloro Colina (CCC). La producción fue mayor en el protocolo sólido – líquido, y entre concentraciones la de mejor producción de microtubérculos fue C1 (Sales MS 100%, sacarosa 8%, 10mg BAP/ 500mg CCC y oscuridad). Los mejores productores de microtubérculos fueron las accesiones C.C.C. 4318 (Carriza), C.C.C. 4981 (Guata negra) y *Solanum phureja* 50 (sin nombre).

Palabras clave: *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*; *S. phureja*; microtuberización, Benzilaminopurina; Cloruro de Cloro Colina.

ABSTRACT

The *in vitro* microtuberization of potato, four accessions of *S. tuberosum* ssp. *andigena* and three accessions of *S. phureja* of the Colombian Central Collection was evaluated. Two protocols were used (liquid-liquid and solid-liquid) in a complete random analysis design with a factorial arrangement. The traits evaluated at the time crop were: number of microtubers with size under 0.5cm, microtubers with size over 0.5cm and total number of microtubers. The microtubers production was higher in the solid-liquid protocol. On the other hand, when comparing the microtuber production among the hormones BAP and CCC, the C1 (MS salts at 100%, sucrose 8%, 10mg BAP / 500mg CCC and darkness) showed the higher microtubers production. The most efficient microtubers producer were the accessions C.C.C. 4318 (Carriza), C.C.C. 4981 (Guata negra) and *Solanum phureja* 50 (without common name).

Key words: *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*, *S. phureja*, microtuberization, benzylaminopurine, chlorocholine chloride.

INTRODUCCIÓN

La Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) está encargada de la conservación de la Colección Central Colombiana de Papa (C.C.C.), conformada por 2.985 accesiones de variedades cultivadas y silvestres conservadas en condiciones de campo (1.607), en cuartos fríos (2.062) e *in vitro* (818). Las especies incluidas son *Solanum tuberosum* subespecie *andígena*; *S. tuberosum* subespecie *tuberosum* (papa de año); *S. phureja* (papa criolla o chauchas); *S. chaucha* (papa amarilla) y especies silvestres como

S. colombianum y *S. estradae* (Cerón *et al.*, 2005). Geográficamente representan regiones del país (Nariño, Cauca, Boyacá, Cundinamarca, Santander, Norte de Santander, Caldas, Quindío y Sierra Nevada de Santa Marta) e introducciones de Perú, Bolivia, Ecuador, México, Argentina, Inglaterra, Escocia, Alemania, Holanda y Bélgica.

La microtuberización *in vitro* de papa ha despertado interés en la producción de semilla asexual y en los bancos de germoplasma debido al tamaño, buena condición sanitaria e intercambio de germoplasma

(Jara, 1996; Borda *et al.*, 2001; Donnelly *et al.*, 2003; Gopal *et al.*, 2004).

El objetivo principal de la investigación fue estudiar la producción de microtubérculos en cultivo *in vitro* de siete accesiones de papa de la Colección Central empleando dos protocolos (líquido – líquido y sólido-líquido) en diferentes concentraciones de BAP (6 Benzil Amino Purina) y CCC (Cloruro de Cloro Colina) como parte de los proyectos de investigación para encontrar estrategias alternas para la conservación eficiente del germoplasma de papa.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se adelantó en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), en el Centro de Investigación Tibaitatá situado en el municipio de Mosquera, Cundinamarca (4° 71' 28.2" N, 74° 18' 30.5" W, 2516 m.s.n.m.), en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Programa Nacional de Recursos Genéticos y Mejoramiento Vegetal. Se emplearon cuatro accesiones de *S. tuberosum* ssp. *Andigena*, y tres de *S. phureja*, seleccionadas por la habilidad para producir microtubérculos (mínimo cuatro por planta) en condiciones de conservación (Tabla 1). Con el fin de aumentar la población se realizó la multiplicación de ápices y entrenudos en medio convencional de propagación de papa, compuesto por sales Murashigue & Skoog (1962), tiamina (1ml L⁻¹), mioinositol (0.1g L⁻¹), sacarosa (3%) y phytigel (3g L⁻¹).

Debido a que en la literatura relacionada con este tema los resultados han sido diversos y a que el factor genético es determinante en el proceso se optó por utilizar dos protocolos (líquido – líquido y sólido

– líquido) y niveles de hormonas para la producción de microtubérculos.

El medio de cultivo estuvo compuesto por 80% sales MS, 0.4 mg L⁻¹ de ácido giberélico y 20 mg L⁻¹ de ácido pantoténico, donde la variante entre protocolos fue la ausencia o presencia del gelificante (phytagel). Los esquejes de un entrenudo se distribuyeron en grupos de nueve explantes en 21 contenedores (30 ml de medio de cultivo). Las plantas propagadas en medio de cultivo líquido se llevaron a un agitador orbital a 45 r.p.m. para garantizar la permanente oxigenación de los explantes y facilitar la difusión de fenoles en el medio. Las condiciones de crecimiento fueron 16 horas-luz/día y 20°C durante un mes (Jara, 1996; Gómez y Reyes, 1998).

Para la fase de inducción de tuberización se utilizaron 6 – Benzil Amino Purina (BAP) y Cloruro de Cloro Colina (CCC) (Tabla 2). Se adicionaron 20 ml del medio de inducción, conservándolas en total oscuridad a 20°C durante un mes (Gómez y Reyes, 1998; Borda *et al.*, 2001) y posteriormente 15 días con fotoperiodo 16h-luz/día con el fin de permitir que los microtubérculos terminaran de madurar en forma más uniforme antes de la cosecha.

El diseño experimental empleado fue completamente al azar con arreglo factorial (siete accesiones x dos protocolos x siete concentraciones y tres repeticiones). El análisis de la información se efectuó mediante el programa estadístico SAS Versión 9.0, empleando el análisis de varianza y la prueba de comparación de promedios de Tukey para matriz desbalanceada entre accesiones, protocolos y concentraciones para las variables número de microtubérculos con tamaño inferior a 0.5 cm, superior a 0.5cm y total de microtubérculos.

Tabla 1. Datos de pasaporte de las accesiones seleccionadas para la producción de microtubérculos.

| No. de colección | Especie/subespecie | Nombre vulgar | Municipio | Vereda | Altitud (m. s. n. m.) |
|---------------------------|--|------------------|--------------------|---|-----------------------|
| C.C.C. 4318 | <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> | Carriza | Belén (Boyacá) | El Bosque | 2.900 |
| C.C.C. 4981 | <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> | Guata negra | Guachucal (Nariño) | Corregimiento Muellamuez | 3.140 |
| C.C.C. 310 | <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> | Careta blanca | Manizales (Caldas) | Mercado local, posible páramo de Letras o nevado del Ruiz | Sin dato |
| C.C.C. 4067 | <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> | Sin nombre | Sin dato | Mercado de Junín (Perú) | 4.800 |
| <i>Solanum phureja</i> 26 | <i>S. phureja</i> | Uva | Nariño | Sin dato | Sin dato |
| <i>Solanum phureja</i> 27 | <i>S. phureja</i> | Ratona Chincheña | Nariño | Sin dato | Sin dato |
| <i>Solanum phureja</i> 50 | <i>S. phureja</i> | Sin nombre | Sin dato | (Bolivia) | Sin dato |

Tabla 2. Concentraciones para la inducción de microtuberización *in vitro* utilizando diferentes niveles de BAP/CCC.

| Concentraciones | MS (%) | Sacarosa (%) | BAP/CCC (mg L ⁻¹) | Referencia |
|-----------------|--------|--------------|-------------------------------|--------------------------------|
| C0 o testigo | 100 | 8 | Sin BAP, sin CCC | Jaramillo <i>et al.</i> , 2003 |
| C1 | 100 | 8 | 10 de BAP, 500 de CCC. | Borda <i>et al.</i> , 2001 |
| C2 | 100 | 8 | 5 de BAP, 500 de CCC. | Jaramillo <i>et al.</i> , 2003 |
| C3 | 100 | 8 | Sin BAP, 250 de CCC | Salas, 2005 |
| C4 | 100 | 8 | Sin BAP, 500 de CCC | |
| C5 | 60 | 8 | 8 de BAP, 800 de CCC | Gómez y Reyes,1998 |
| C6 | 60 | 8 | Sin BAP, 800 de CCC | |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción promedio de microtubérculos por accesión

En el análisis de varianza para microtubérculos con tamaño inferior o superior a 0.5cm y al número total de microtubérculos se encontraron diferencias significativas al 5%, ya que la producción de microtubérculos está determinada por el genotipo y el tamaño por la edad del estolón. Microtubérculos formados en los primeros estolones tuvieron mayor tiempo para desarrollarse y realizar el llenado. Además, también influye la posición, pues los desarrollados en los estolones de la parte basal del tallo fueron de mayor tamaño.

Según la prueba de comparación de promedios de Tukey, las accesiones andígenas fueron las de mayor producción de microtubérculos inferiores a 0.5 cm, sin diferenciarse significativamente; el orden fue el siguiente: C.C.C. 4981 (Guata negra), C.C.C. 4318 (Carriza), *Solanum phureja* 50 – SN y andígena C.C.C. 4067 – SN. Las de menor producción fueron la andígena C.C.C. 310 (Caretá blanca) y las *Solanum phureja* 27 (Ratona chincheña) y 26 (Uva) (Tabla 3).

Para la variable tamaño superior a 0.5cm la accesión C.C.C. 4318 (Carriza) presentó los promedios más altos y diferencias significativas con las demás accesiones, seguida por C.C.C. 4067 – SN, *Solanum phureja* 50 - SN, C.C.C. 4981 (Guata negra). Las más bajas producciones de microtubérculos en esta variable se encontraron en C.C.C. 310 (Caretá blanca), *Solanum phureja* 26 (Uva), *Solanum phureja* 27 (Ratona chincheña) (Tabla 3).

La variación en la respuesta de cada una de las accesiones en cuanto a la producción de microtubérculos en ambas categorías de tamaño esta determinada principalmente por el genotipo. En general las accesiones C.C.C. 310 (Caretá blanca), *Solanum phureja* 26 (Uva) y *Solanum phureja* 27 (Ratona chincheña) producen muy baja cantidad de microtubérculos a diferencia de la buena producción en las accesiones C.C.C. 4318 (Carriza) y C.C.C. 4981 (Guata negra), seguidas por

Solanum phureja 50 – SN y C.C.C. 4067 - SN. En segundo lugar el proceso de inducción para tuberización puede ser más lento en estas accesiones de aparente baja producción, por tanto, la producción puede también haber sido afectada por esto.

Para el número total de microtubérculos cosechados por accesión, según la prueba de comparación de promedios de Tukey, la accesión de mayor producción de microtubérculos fue la C.C.C. 4318 (Carriza), seguida por C.C.C. 4067 -SN, C.C.C. 4981 (Guata negra), *Solanum phureja* 50 – SN y en último lugar se situaron C.C.C. 310 (Caretá blanca), *Solanum phureja* 27 (Ratona chincheña) y *Solanum phureja* 26 (Uva), respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Producción promedio de microtubérculos por accesiones.

| Accesión | Número de microtubérculos | | |
|---------------------------|---------------------------|----------|--------|
| | < 0.5 cm | > 0.5 cm | Total |
| C.C.C. 4981 | 4.27 a | 5.04 b | 9.32 b |
| C.C.C. 4067 | 3.25 a | 6.3 b | 9.55 b |
| C.C.C. 310 | 1.32 b | 2.00 c | 3.32 c |
| <i>Solanum phureja</i> 50 | 3.26 a | 5.13 b | 8.30 b |
| <i>Solanum phureja</i> 26 | 0.40 b | 0.83 c | 1.20 c |
| <i>Solanum phureja</i> 27 | 0.58 b | 0.71 c | 1.24 c |

Medias seguidas por la misma letra no fueron significativamente diferentes.

Algunas accesiones que presentaron buena producción de microtubérculos (*Solanum phureja* 50 - SN y C.C.C. 4067 – SN) mostraron hiperhidratación en los medios de propagación e inducción líquidos. Además se observó reducción en el número de yemas, aumento en el tamaño de las lenticelas y formación de “callosidad” sobre el periderma de los microtubérculos; al parecer estuvieron relacionados con concentraciones de los inductores de tuberización BAP/CCC, principalmente en la dosis alta (C5) o cuando se empleó solamente CCC (C3, C4 y C6). También se observó en estos tratamientos mayor tendencia a hiperhidratarse cuando los microtubérculos se formaron dentro del medio, que en aquellos formados a partir de las raíces de las yemas superiores



Figura 1. Hiperhidratación de plántulas inducidas para tuberización con BAP/CCC.



Figura 2. Hiperhidratación de microtubérculos y formación de callosidad sobre el periderma.



Figura 3. Plantas producidas en el protocolo líquido-líquido.



Figura 4. Plantas producidas en el protocolo sólido-líquido.

de los tallos (Figura. 1 y 2). Donnelly *et al.* (2003) mencionan que la presencia de BAP y CCC en los medios de cultivo causó anomalías en el cultivar Desiree, incluyendo elongación de los tubérculos, reducción del número de ojos (yemas), aumento del tamaño de lenticelas y desorganización del periderma.

Producción de microtubérculos por protocolo

La producción de microtubérculos para las variables estudiadas fue mayor en el protocolo sólido-líquido (Tabla 4).

La producción de microtubérculos presentó diferencias significativas debido a que el desarrollo de las plantas fue mayor en el protocolo sólido – líquido (Tabla 4). Las plántulas producidas en medio líquido – líquido tuvieron mayor estrés, el vigor no fue muy bueno y en muchos casos se observó hiperhidratación (Fig. 3 y 4).

En el protocolo líquido – líquido se requirieron 3 meses aproximadamente para la producción de los microtubérculos, mientras en el sólido – líquido se necesitaron 2 meses.

Producción de microtubérculos por concentración de BAP/CCC

Para la variable concentración, el análisis de varianza y la prueba de comparación de promedios de Tukey mostraron diferencias significativas. En la producción de microtubérculos inferiores a 0.5cm no se presentaron diferencias significativas entre las concentraciones C1, C2 y C5 (Tabla 5), lo cual demuestra el sinergismo de los dos inductores (Hussey y Stacey, 1984). A nivel biológico los microtubérculos en C1 y C2 presentaron buena esfericidad y coloración y ausencia de hiperhidratación y callosidad sobre el periderma. En C5 se presentaron problemas de hiperhidratación y callosidad sobre el epiderma, principalmente con *phurejas*.

Las concentraciones con más baja producción de microtubérculos con tamaño inferior a 0.5 cm fueron C3, C6 y C4, debido a que la ausencia de BAP no incrementó el efecto del CCC. El testigo (C0) se situó en un punto intermedio, debido en parte a que el medio de cultivo tuvo 8% de sacarosa, indispensable para la tuberización *in vitro*, sumado a la capacidad de cada genotipo de producir microtubérculos en mayor o menor cantidad. Para la variable microtubérculos superiores a 0.5 cm C1 mostró diferencias significativas con las demás concentraciones (Tabla 5).

Para la variable número total de microtubérculos la mejor concentración fue C1 y presentó diferencias significativas con C2, C5, C6, C0, C3 y C4. (Tabla 5).

Tabla 4. Producción promedio de microtubérculos por protocolo.

| Protocolos | Número de microtubérculos | | |
|------------------|---------------------------|----------|---------|
| | < 0.5 cm | > 0.5 cm | Total |
| líquido- líquido | 1.30 b | 3.62 b | 4.88 b |
| sólido – líquido | 4.69 a | 5.71 a | 10.24 a |

Tabla 5. Producción promedio de microtubérculos por concentraciones.

| Concentración | Número de microtubérculos | | |
|---------------|---------------------------|----------|---------|
| | < 0.5 cm | > 0.5 cm | Total |
| Testigo o C0 | 2.25 abcd | 3.86 ab | 5.53 bc |
| C1 | 3.33 a | 5.75 a | 9.08 a |
| C2 | 3.21 ab | 4.75 ab | 7.96 ab |
| C3 | 1.86 bcd | 3.63 ab | 5.5 bc |
| C4 | 1.22 d | 3.13 b | 4.26 c |
| C5 | 2.80 abc | 4.2 ab | 7.0 abc |
| C6 | 1.66 dc | 4.25 ab | 5.92 bc |

Las concentraciones C1, C2, C5 tuvieron las más altas producciones de microtubérculos en total, confirmando el sinergismo entre los dos inductores de tuberización. La menor producción en C6 se atribuye a la menor respuesta a esta concentración de las accesiones de *S. phureja*, especialmente *S phureja* 50 – SN, agravado por la hiperhidratación en plántulas y microtubérculos.

CONCLUSIONES

La producción promedio de número total de microtubérculos de papa fue mayor en el protocolo sólido- líquido (10.24 vs. 4.88).

El protocolo sólido – líquido requirió menor tiempo para la producción de microtubérculos (2 meses vs 3 meses).

Las accesiones de *S. phureja* fueron más susceptibles a la hiperhidratación, la cual se observó en 8mgBAP/800mgCCC. y en las concentraciones que contuvieron solamente CCC.

Los microtubérculos de las accesiones que presentaron problemas de hiperhidratación formaron sobre el periderma una especie de “callosidad”, bajo número de brotes, lenticelas de mayor tamaño.

La producción de microtubérculos estuvo determinada por el genotipo. Las accesiones C.C.C. 4318 (Carriza), C.C.C. 4981 (Guata negra), C.C.C. 4067 (SN) y *Solanum phureja* 50 (SN) presentaron las más altas producciones en ambos protocolos. Las accesiones C.C.C. 310 (Caretta blanca), *Solanum phureja* 26 (Uva) y *Solanum phureja* 27 (Ratona chincheña) presentaron las más bajas producciones.

Entre las concentraciones utilizadas para la inducción de microtubérculos se encontraron diferencias

significativas, principalmente para C1 (MS 100%, 8% Sacarosa, 10mg BAP/500mgCCC), el cual obtuvo un promedio 9.083 microtubérculos.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Recursos Genéticos y Mejoramiento Vegetal de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) C.I. Tibaitatá; a Alba Lucía Villa, Ligia Suescún y Pablo Edgar Jiménez del Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Corpoica C.I. Tibaitatá; a los profesores Edgar Iván Estrada, Mario García, Carlos Iván Cardozo y Manuel Sánchez, de la Escuela de Posgrados de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, y a Juan Diego Palacio, del Instituto Alexander von Humboldt.

BIBLIOGRAFÍA

1. Borda, C.C.; Toledo, J.; Golmirzaie, A.; Roca., W. 2001. Efecto de inductores de tuberización y fotoperiodo sobre la microtuberización de *Solanum tuberosum* L. *in vitro*. http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-100.pdf. Descargado: Noviembre 20 de 2005.
2. Cerón, M. S.; Valbuena, I.; Moreno, J. D. 2005. Informe técnico de bancos de germoplasma del C. I. Tibaitatá. Bogotá: Corpoica. 22p.
3. Donnelly, D.; Coleman, W.; Coleman, S. 2003. Potato microtuber production and performance: A review. *Am Potato J* 80:103-115.
4. Gómez, M.M.; Reyes, P.L. 1998. Propagación y tuberización *in vitro* de tres variedades de papa criolla (*Solanum phureja*) de la Colección Central Colombiana. Trabajo de Grado Biología. Bogotá: Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 71 p.
5. Gopal, J.; Chamil, A.; Sarkar, D. 2004. *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germplasm: effect of genotype, abscisic acid and sucrose. *In vitro Cell*. 40: 485 – 490.
6. Hussey, G.; Stacey, J. 1984. Factors Affecting the Formation of *In vitro* Tubers of Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann Bot* 53: 565-578.
7. Jara, G.C., 1996. Propagación *in vitro* y microtuberización de cultivares de *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum* Hawkes en medios líquidos. Tesis de Grado Magíster en Ciencias Mención Botánica. Universidad Austral de Chile. 81 p.
8. Jaramillo, A.; Rivera, A. M.; Montañó, H.; Lozano, J.J. 2003. Microtuberización *in vitro* de cuatro variedades de papa. (*Solanum tuberosum* L.). <http://www.uaaan.mx/DirInv/Rdos2003/ecologia/microtuber.pdf> Descargado: Noviembre 20 de 2005.
9. Murashigie, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:473-497.
10. SalaS, J.E. 2005. Producción y almacenamiento de tubérculos *in vitro* de papa *Solanum tuberosum* L. cv Granola. http://bi-bagr.ucla.edu.ve/ALEXANDR/CATALOGOS/bvetucla/Cat.Tit_12.HTM Descargado: Noviembre 11 de 2005.