

# Efecto de las hormonas vegetales y el fotoperiodo en la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.)

## Effect of plant hormones and photoperiod on the production of potato microtubers (*Solanum tuberosum* L.)

Mayelí Moreno\*, Maira Oropeza\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.69499

### RESUMEN

Existen numerosos factores que afectan la micropropagación y la microtuberización en papa; entre ellos, las hormonas vegetales y el fotoperiodo. Para estudiar el efecto de estos dos factores en las variedades 'Arbolona negra' (AN) y 'Granola' (G), se cultivaron microesquejes de cada variedad en medio MS líquido con o sin giberelinas (GA) y con 25 g/L de sacarosa e incubados bajo condiciones de luz blanca continua. Para inducir la microtuberización, las vitroplántulas obtenidas fueron sub-cultivadas en medio MS suplementado con 50 g/L sacarosa, tres concentraciones de BA (0, 1 y 5 mg/L) e incubadas bajo diferentes regímenes lumínicos. El pre-tratamiento con GA favoreció el alargamiento del vástago en AN pero no en G. Ambas variedades produjeron el mayor número de microtubérculos en medio MS suplementado con 5 mg/L de BA, bajo condiciones fotoperiódicas, sin la adición previa de GA. El cultivo *in vitro* de microesquejes de papa en medios de cultivo suplementados con BA y sacarosa, y la incubación bajo condiciones de días cortos permite obtener microtubérculos de papa en condiciones *in vitro*, en un tiempo más corto que el que podría esperarse en condiciones tradicionales de cultivo.

**Palabras clave:** microtuberización, benciladenina, giberelinas, fotoperiodo.

### ABSTRACT

Micropropagation and microtuberization in potato plants are both affected by plant hormones and photoperiod. To study the effect of these factors on potato cultivars 'Arbolona negra' (AN) and 'Granola' (G), microcuttings of each cultivar were cultured on MS liquid medium supplemented with sucrose 25 g/L, with or without gibberellins (GA). These microcuttings were incubated under continuous light. In order to induce microtuberization, the obtained vitro-

\* Licenciada en Biología. Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, Centro de Botánica Tropical. Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV). Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Apartado 47114, Los Chaguaramos, Caracas 1041A, Venezuela. mayemorenoucv@gmail.com

\*\* Doctora en Ciencias. Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, Centro de Botánica Tropical. Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV). Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Apartado 47114, Los Chaguaramos, Caracas 1041A, Venezuela. maira.oropeza@ciens.ucv.ve

plantlets were subcultured on MS medium supplemented with sucrose 50 g/L, three concentrations of BA (0, 1 and 5 mg/L) and incubated under different light patterns. GA pre-treatment induced shoots elongation on AN but not on G cultivar. The highest microtubers production for both cultivars was achieved on MS medium supplemented with BA 5 mg/L under short day light condition without GA pretreatment. The *in vitro* culture of microcuttings on culture media supplemented with BA and sucrose, incubated under short day conditions, allowed microtubers production in a shorter time lapse.

**Key words:** microtuberization; bencil-adenine; gibberellins; photoperiod.

**Recibido:** noviembre 15 de 2016

**Aprobado:** noviembre 24 de 2017

## INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el cuarto cultivo más importante después del maíz, el arroz y el trigo (Castro *et al.*, 2012). Entre las variedades de papa comúnmente sembradas en los Andes venezolanos figura una variedad comercial de origen alemán conocida como Granola (G) (subespecie *tuberosum*), muy atractiva por su sabor, fácil cocción y tuberización temprana; y una variedad silvestre conocida como 'Arbolona negra (AN) (subespecie *andigena*), la cual se destaca por su resistencia a los patógenos que atacan este cultivo, aunque presenta tuberización tardía (Romero & Monasterios, 2008).

La papa se propaga de manera convencional mediante la siembra de los tubérculos; sin embargo, este tipo de propagación perpetúa la presencia de patógenos causantes de enfermedades que reducen la productividad de los cultivos (Poehlman & Allen, 2003). Por ello, la producción sostenible de papa depende de la renovación constante del material de siembra libre de enfermedades. Para lograr esto, desde hace algunas décadas se han implementado técnicas de cultivo *in vitro*, entre ellas la micropropagación, como una alternativa que permite la producción masiva de plantas libres de enfermedades, en poco tiempo, en espacios reducidos, y que puedan ser usadas por los agricultores para producir tubérculos semilla. Las técnicas de cultivo *in vitro* también permiten inducir la formación de microtubérculos, en un proceso conocido como microtuberización (Xu *et al.*, 1998). Estos órganos pueden ser utilizados como semillas certificadas y constituyen una fuente de almacenamiento e intercambio seguro de germoplasma (Donnelly *et al.*, 2003; Kämäräinen-Karppinen *et al.*, 2010; Mamun *et al.*, 2015).

La micropropagación y la microtuberización proporcionan un modelo experimental uniforme y conveniente para el mejoramiento del cultivo de la papa; sin embargo, el éxito de estas técnicas depende de factores tales como: la temperatura, la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de sacarosa, el balance hormonal y el fotoperiodo (Khuri & Moorby, 1995; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; Sakar, 2010; Aksenova *et al.*, 2011; Dhital & Lim, 2012; Alva & Oropeza, 2013).

Las hormonas vegetales juegan un rol importante en el control de la tuberización en papa. La aplicación de giberelinas (GA) promueve la elongación del vástago (estolón) e inhibe la formación de los tubérculos (Smith & Rappaport, 1969; Kumar & Wareing, 1972; Aksenova *et al.*, 2011; Dhital & Lim, 2012), mientras que la disminución del contenido de GA promueve la tuberización (Okazawa, 1959, 1960; Smith & Rappaport, 1969; Railton & Wareing, 1973; Krauss & Marschner, 1982; Aksenova *et al.*, 2011). La interacción entre GA y otras hormonas vegetales, como por ejemplo la benciladenina (BA), es un tema de debate (Xu *et al.*, 1998). A diferencia de GA, las citoquininas estimulan la formación de los tubérculos en muchas especies tuberosas (Aksenova *et al.*, 2011). En numerosos estudios se considera a la BA como una hormona promotora de la tuberización en papa, debido a que reduce algunos de los procesos promovidos por GA durante el desarrollo de las plantas (Okazawa & Chapman, 1962; Marschner *et al.*, 1984); sin embargo, el éxito de la combinación de BA y GA con respecto a la elongación del vástago, la iniciación de la tuberización y el crecimiento de los tubérculos todavía no está claro.

Otro factor determinante en el proceso de tuberización es el fotoperiodo. Seabrook (2005) lo considera como el principal factor ambiental que controla la

tuberización en papa. Está reportado que las condiciones fotoperiódicas de días cortos inducen la tuberización. La formación de microtubérculos en las vitroplantas de papa puede lograrse únicamente con la incubación bajo estas condiciones lumínicas, sin la adición de altas concentraciones de sacarosa u hormonas vegetales en el medio de cultivo. La respuesta fotoperiódica a la tuberización tiene mucho en común con la respuesta a la floración, las hojas de las especies tuberosas son órganos que reconocen la longitud del día y para la inducción fotoperiódica es requerida la noche continua durante el ciclo de día corto, siendo el fitocromo B el fotoreceptor que media esta respuesta.

Recientemente, se demostró que un micro RNA (miR172) está involucrado en la inducción fotoperiódica de la formación de tubérculos en la subespecie *andigena*; miR172 está presente en todos los órganos de la papa: hojas, tallos y estolones, siendo su contenido mucho mayor en días cortos que bajo días largos. Por otra parte, en la regulación fotoperiódica de la tuberización no solo interviene el estímulo de días cortos sino también los inhibidores de la tuberización en días largos (Aksenova *et al.*, 2011), siendo el GA uno de estos inhibidores. Bajo condiciones de días largos, la actividad y el contenido de GA en las hojas de papa es más alto que en las condiciones favorables para la tuberización (días cortos).

Teniendo en cuenta lo anterior, esta investigación plantea como objetivo estudiar el efecto de las gibberelinas, benciladenina y del fotoperiodo en la producción de microtubérculos de dos variedades de papa, 'Granola' y 'Arbolona negra'.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Se utilizaron microesquejes extraídos de vitroplantas de la variedad Arbolona negra (AN) y de la variedad Granola (G) de dos meses de edad, previamente obtenidas por micropropagación y mantenidas en medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) (MS) semisólido, en el Banco de Germoplasma del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela.

**Micropropagación del material vegetal que se usó como fuente de explantes.** Para inducir el desarrollo de las vitroplántulas que sirvieron como fuente de explantes, 120 microesquejes de cada variedad se cultivaron en medio MS semisólido suplementado con 25 g/L de sacarosa, bajo luz blanca continua ( $95 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a 18 °C y durante dos meses (Alva & Oropeza, 2013). De estas vitroplantas se extrajeron los microesquejes que se usaron como explantes para los siguientes experimentos.

**Efecto de la GA sobre el alargamiento del vástago.** A partir de las plantas obtenidas por micropropagación se extrajeron 120 microesquejes de cada variedad y se inocularon en 24 matraces volumétricos estériles con 20 mL de medio de cultivo MS líquido suplementado con 25 g/L de sacarosa y 0.25 mg/L de GA. Simultáneamente, otros 120 microesquejes de cada variedad fueron colocados en matraces volumétricos estériles con 20 mL medio de cultivo MS líquido suplementado con 25 g/L de sacarosa, sin GA. Todo el material vegetal fue colocado bajo condiciones de luz blanca continua ( $95 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) e incubado a una temperatura de 18 °C, con agitación orbital a 120 rpm, durante tres semanas.

**Efecto de la BA y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos.** Luego de tres semanas bajo el pre-tratamiento con y sin GA, las 120 vitroplántulas de cada variedad se subcultivaron en medios de cultivo MS líquido suplementado con tres concentraciones de BA (0, 1 y 5 mg/L) y 50 g/L sacarosa (Alva & Oropeza, 2013). En cada uno de los tratamientos, la mitad del material vegetal (20 vitroplantas) fue colocado bajo condiciones de luz blanca continua y la otra mitad (20 vitroplantas) bajo condiciones de días cortos equivalentes a 8 horas de luz. Todo el material fue incubado a una temperatura de 18 °C, con agitación orbital continua a 120 rpm, durante tres meses. Una vez finalizado el experimento se registró la longitud de los vástagos, número de microtubérculos por planta ( $N^{\circ}$ ), diámetro (D), peso fresco (PF) y peso seco (PS) de los microtubérculos.

**Análisis estadístico.** Se realizó un análisis de varianza con un nivel de confianza del 95%, para establecer si existen diferencias significativas entre las medias de

los tratamientos. Para conocer cuál tratamiento produce el mayor efecto o cuáles son los tratamientos diferentes entre sí, se realizó una prueba de rangos múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95%. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA®.

## RESULTADOS

### Efecto de la GA sobre el alargamiento del vástago.

Las plantas de la variedad AN mostraron la mayor longitud de los vástagos cuando fueron cultivadas en MS líquido suplementado con GA, sin BA y bajo condiciones fotoperiódicas (tabla 1, figura 1); por otra parte las plantas de la variedad G mostraron la mayor longitud de los vástagos cuando fueron cultivadas en MS líquido suplementado con 5 mg/L de BA y sin GA, bajo condiciones de fotoperiodo (tabla 2, figura 1), luego de tres meses de cultivo.

### Efecto de la BA y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos.

Se evaluó la interacción entre el tratamiento previo con GA y el subcultivo de estas plantas en medios de cultivo líquidos suplementados con tres concentraciones de BA (0, 1 y 5 mg/L) e incubadas bajo diferentes regímenes lumínicos (tabla 3). La variedad AN produjo el mayor número de microtubérculos (1.80) y de mayor diámetro, en medio MS líquido sin BA, bajo condiciones fotoperiódicas. No hubo diferencias estadísticamente significativas para el peso fresco y peso seco de los microtubérculos. La incubación bajo luz blanca continua no produjo la formación de microtubérculos en las vitroplantas de esta variedad.

Para la variedad G, el mayor número de microtubérculos (2.30) se obtuvo en medio de cultivo MS líquido sin BA bajo condiciones fotoperiódicas, mientras que el mayor diámetro se obtuvo en medio MS líquido sin BA bajo luz blanca continua. No hubo diferencias estadísticamente significativas para el peso fresco y peso seco de los microtubérculos de G.

Los microtubérculos de las dos variedades estudiadas obtenidos bajo condiciones de fotoperiodo en vitroplantas pre-tratadas con GA, mostraban una coloración verde, con forma ovalada y muchas yemas (figura 2), mientras que los microtubérculos formados en plantas

cultivadas bajo luz blanca continua eran de color marrón claro con la superficie agrietada y pocas yemas.

Posteriormente, se evaluó el efecto de BA y el fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos en vitroplántulas cultivadas sin la adición de GA (tabla 4). Para la variedad AN se obtuvo el mayor número de microtubérculos (1.90) con el tratamiento de 5 mg/L de BA y condiciones fotoperiódicas. Los microtubérculos de mayor diámetro y peso seco se obtuvieron con 1 mg/L de BA y bajo luz blanca continua. No hubo diferencias estadísticamente significativas para el peso fresco de los microtubérculos de AN. Para la variedad G, el mayor número de microtubérculos (3.80) y mayor peso seco de los mismos, se obtuvo en MS líquido suplementado con 5 mg/L de BA, bajo condiciones fotoperiódicas; mientras que el mayor diámetro de los microtubérculos se obtuvo con el tratamiento 1 mg/L BA bajo luz blanca continua. No hubo diferencias estadísticamente significativas para el peso fresco de los microtubérculos de G.

Los microtubérculos producidos por las vitroplantas de las dos variedades, bajo condiciones de fotoperiodo y sin la adición de GA, mostraron una coloración verdosa amarillenta con pocas yemas (figura 3), mientras que los microtubérculos obtenidos bajo luz blanca continua mostraron una coloración amarillenta y sin yemas en su superficie.

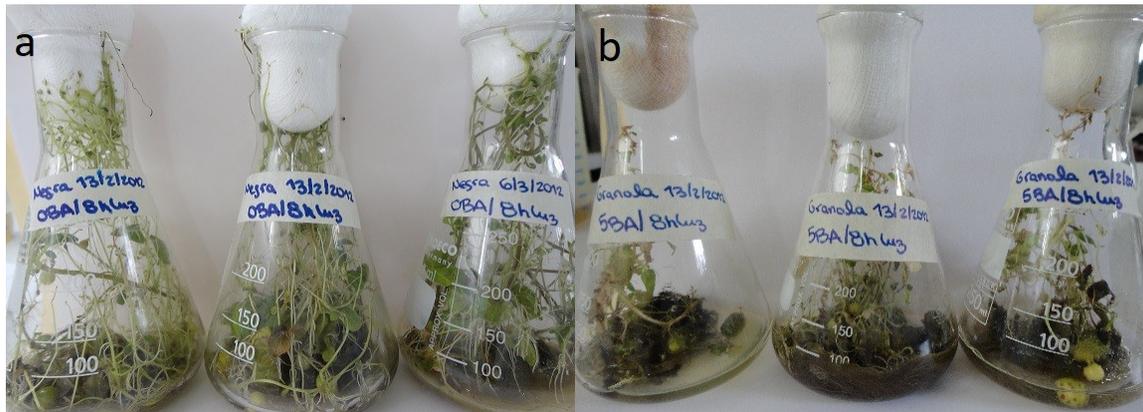
## DISCUSIÓN

En Venezuela, la semilla certificada de la mayoría de los cultivos de importancia económica es importada y muy costosa. Como alternativa a la importación, los productores escogen las mejores semillas de la cosecha anterior para replantar. Sin embargo, esta actividad se realiza sin ningún tipo de control fitosanitario, lo cual trae como consecuencia el deterioro de los cultivos y la contaminación de los suelos con los patógenos de las semillas que no fueron sometidas a un proceso de certificación. La producción de vitroplantas y microtubérculos de las especies de interés económico ha surgido como una alternativa para el suministro de semillas libres de enfermedades. Los microtubérculos son semillas de fácil distribución y con la garantía de que están libres de enfermedades ya que provienen de vitroplantas mantenidas en condiciones de asepsia; sin embargo, lograr la tuberización en condiciones *in vitro* ha resultado ser una difícil

**Tabla 1.** Efecto del pre-tratamiento con GA sobre la longitud de los vástagos de AN y G.

Longitud de los vástagos (cm)						
8 horas luz			24 horas luz			
Var	0BA	1BA	5BA	0BA	1BA	5BA
AN	18,03±1,56 <sup>a</sup>	16,28 ±0,64 <sup>a,b</sup>	17,76±0,49 <sup>a</sup>	8,27±0,53 <sup>d,e</sup>	9,00±0,74 <sup>d,e</sup>	7,03±0,36 <sup>e</sup>
G	14,94±1,16 <sup>a,b,c</sup>	13,13±0,99 <sup>b,c,d</sup>	10,63±0,57 <sup>c,d,e</sup>	13,00±0,95 <sup>a,b,c,d</sup>	14,48±0,94 <sup>a,b,c</sup>	9,93±1,24 <sup>d,e</sup>

La tabla indica el promedio y la desviación estándar de la longitud de los vástagos de cada variedad en cada tratamiento. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA ( $\alpha=0,5$ ) y las letras señalan las diferencias entre los grupos determinadas mediante una prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).



**Figura 1.** (a) Vitroplantas de AN cultivadas en MS suplementado con GA, sin BA y bajo condiciones fotoperiódicas; (b) Vitroplantas de G cultivadas en MS suplementado con 5 mg/L de BA, sin GA, bajo condiciones fotoperiódicas.

**Tabla 2.** Efecto del pre-tratamiento sin GA sobre la longitud de los vástagos de AN y G.

Longitud de los vástagos (cm)						
8 horas luz			24 horas luz			
Var	0BA	1BA	5BA	0BA	1BA	5BA
AN	12,96±1,08 <sup>a,b,c</sup>	14,55±0,75 <sup>a,b,c</sup>	15,57±0,54 <sup>a,b</sup>	12,78±0,81 <sup>a,b,c</sup>	12,86±0,79 <sup>a,b,c</sup>	11,86±0,72 <sup>c</sup>
G	13,03±0,69 <sup>a,b,c</sup>	14,18±0,78 <sup>a,b,c</sup>	16,07±0,55 <sup>a</sup>	11,78±1,01 <sup>b,c</sup>	13,62±0,56 <sup>a,b,c</sup>	12,28±0,92 <sup>b,c</sup>

La tabla indica el promedio y la desviación estándar de la longitud de los vástagos de cada variedad en cada tratamiento. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA ( $\alpha=0,5$ ) y las letras señalan las diferencias entre los grupos determinadas mediante una prueba *a posteriori* de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).



**Figura 2.** Microtubérculos de G (arriba) y AN (abajo), incubados bajo condiciones fotoperiódicas, cosechados de vitroplantas pre-tratadas con GA y subcultivadas en MS suplementado con BA: **a)** 0 mg/L **b)** 1mg/L **c)** 5mg/L.

tarea debido a múltiples factores. Entre ellos destacan el efecto de hormonas vegetales tales como BA y GA (Zhang *et al.*, 2005; Aksenova *et al.*, 2011). Las GAs promueven la elongación de los vástagos permitiendo de esta manera la formación de un mayor número de microtubérculos desde la base hasta el ápice de las plantas, mientras que las citoquininas inducen posteriormente la división celular y la formación de los microtubérculos. El fotoperiodo es otro de los factores que promueve la microtuberización en papa, promoviendo la morfogénesis de dichos órganos de almacenamiento cuando las plantas son cultivadas bajo días cortos (Igarza *et al.*, 2012).

Para optimizar la producción de microtubérculos, es requisito indispensable obtener vitroplántulas vigorosas con tallos alargados. La estrategia más frecuentemente usada para lograr esto es la micropropagación a partir de microesquejes, a los cuales se les realiza un pre-tratamiento con GAs y un tratamiento posterior con citoquininas (Taiz & Zeiger 2006).

**Efecto de la GA sobre el alargamiento del vástago.**

Las vitroplantas de la variedad AN presentaron la mayor longitud de los vástagos con el pre-tratamiento con GA y en medio líquido sin BA bajo días cortos. Las vitroplantas de la variedad G presentaron la mayor longitud de los vástagos sin el pre-tratamiento con GA, luego de ser sub-cultivadas con 5 mg/L de BA, también bajo condiciones fotoperiódicas. Este resultado puede deberse a que la concentración endógena de estas hormonas en la variedad G es óptima para la inducción del alargamiento; lo que demuestra que el éxito de la combinación de las hormonas vegetales y el fotoperiodo de días cortos sobre la elongación de

vástagos, es genotipo dependiente (Gopal *et al.*, 2004), tal como ha sido documentado en papa (Vreugdenhil & Sergeeva 1999) y ñame (Borges *et al.*, 2011). El proceso de tuberización en papa consiste de varios pasos caracterizados por diferentes cambios a nivel morfológico, histológico y bioquímico. La misma secuencia de eventos ocurre durante la tuberización en cultivo *in vitro*. La principal diferencia entre cultivo *in vitro* y *ex vitro* es que los tubérculos *in vitro* pueden desarrollarse también a lo largo de los tallos aéreos y no sólo en la punta de los estolones (Raspor *et al.*, 2012).

**Efecto de la BA y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos.**

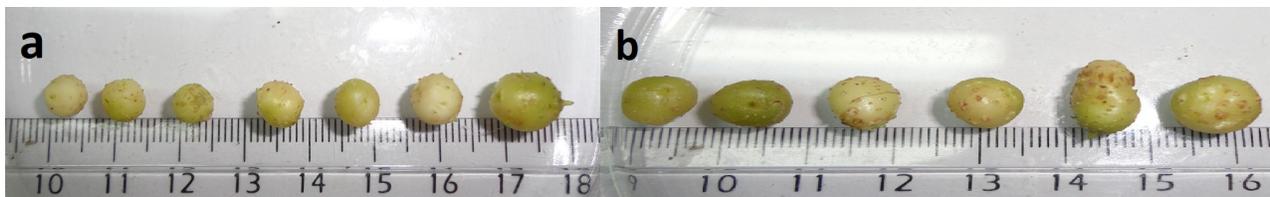
En las vitroplantas de las dos variedades de papa (‘Granola’ y ‘Arbolona Negra’) pre-tratadas con GA, se obtuvo la mayor cantidad de microtubérculos en medios sin BA y bajo condiciones de días cortos; aunque estos valores fueron menores que los reportados para plantas que no fueron pre-tratadas con GA. Con relación a esto, Vreugdenhil & Sergeeva (1999) reportaron que la adición de GA al medio de cultivo inhibe o retarda la formación de los microtubérculos, por lo que la función del pre-tratamiento con esta hormona vegetal es inducir un mayor alargamiento de los vástagos para luego en medio sin GA lograr la formación y desarrollo de los microtubérculos.

En el presente estudio, el fotoperiodo fue el factor determinante en la producción de microtubérculos para ambas variedades. Sakar (2010) reportó que las condiciones de días cortos inducen la formación de los microtubérculos debido a que esta condición lumínica anula los efectos inhibitorios de las GAs sobre la

**Tabla 3.** Efecto del pre-tratamiento con GA, BA y fotoperiodo sobre el número de microtubérculos/planta (N°), diámetro (D), peso fresco (PF) y peso seco (PS) de los microtubérculos de las variedades AN y G.

		Tratamientos					
		8 horas luz			24 horas luz		
Var	Variable	0BA	1BA	5BA	0BA	1BA	5BA
AN	N°	1,80±0,27 <sup>a,b</sup>	1,40±0,18 <sup>b</sup>	0,35±0,13 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>c</sup>
	D (cm)	0,48±0,03 <sup>a</sup>	0,57±0,04 <sup>a,b</sup>	0,57±0,04 <sup>a,b</sup>	0,00±0,00 <sup>a,b</sup>	0,00±0,00 <sup>a,b</sup>	0,00±0,00 <sup>a,b</sup>
	PF (g)	0,18±0,05 <sup>-</sup>	0,27±0,06 <sup>-</sup>	0,16±0,03 <sup>-</sup>	0,00±0,00 <sup>-</sup>	0,00±0,00 <sup>-</sup>	0,00±0,00 <sup>-</sup>
	PS (g)	0,02±0,01 <sup>-</sup>	0,05±0,01 <sup>-</sup>	0,02±0,00 <sup>-</sup>	0,00±0,00 <sup>-</sup>	0,00±0,00 <sup>-</sup>	0,00±0,00 <sup>-</sup>
G	N°	2,30±0,22 <sup>a</sup>	1,65±0,21 <sup>a,b</sup>	1,85±0,23 <sup>a,b</sup>	0,05±0,05 <sup>c</sup>	0,15±0,08 <sup>c</sup>	0,30±0,13 <sup>c</sup>
	D (cm)	0,60±0,03 <sup>a,b</sup>	0,68±0,04 <sup>b</sup>	0,69±0,04 <sup>b</sup>	0,80±0,03 <sup>a,b</sup>	0,50±0,17 <sup>a,b</sup>	0,72±0,05 <sup>a,b</sup>
	PF (g)	0,23±0,03 <sup>-</sup>	0,39±0,10 <sup>-</sup>	0,42±0,07 <sup>-</sup>	0,47±0,04 <sup>-</sup>	0,20±0,13 <sup>-</sup>	0,29±0,04 <sup>-</sup>
	PS (g)	0,03±0,00 <sup>-</sup>	0,06±0,02 <sup>-</sup>	0,06±0,01 <sup>-</sup>	0,06±0,02 <sup>-</sup>	0,06±0,00 <sup>-</sup>	0,04±0,01 <sup>-</sup>

La tabla indica el promedio y la desviación estándar de 20 explantes por tratamiento, para cada variedad. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA ( $\alpha=0,5$ ) y las letras señalan las diferencias entre los grupos determinadas mediante una prueba a posteriori de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).



**Figura 3.** Microtubérculos de AN (a) y de G (b) cultivados bajo condiciones fotoperiódicas en MS suplementado con 5 mg/L de BA, sin pre-tratamiento con GA.

tuberización en papa. Según Prat (2010), este efecto se ha observado también durante la formación de tubérculos en el campo, sobre todo en las variedades nativas. La duración de los días controla muchos procesos morfológicos en plantas; y es a través del fitocromo que estas condiciones lumínicas son traducidas a señales inductivas de alargamiento y división celular (Seabrook, 2005). Al respecto, Aksenova *et al.* (2011), afirman que la respuesta fotoperiódica de tuberización depende de la subespecie y variedad considerada (genotipo-dependiente), siendo más notable en la subespecie *andigena* que en la *tuberosum*. Kittipadukal *et al.* (2012), explican que la subespecie *tubero-*

*sum* requiere de un fotoperiodo de días largos para desarrollar su área foliar, en tanto que el proceso de tuberización es indiferente del fotoperiodo. Por el contrario, la subespecie *andigena* tuberiza estrictamente bajo condiciones de días cortos y al ser llevada a condiciones de días largos o luz continua, la etapa de crecimiento se alarga, la floración es más abundante, pero no tuberiza o lo hace escasamente, produciendo tubérculos muy pequeños.

En las vitroplantas de papa sin la adición previa de GA, el mayor número de microtubérculos reportado para ambas variedades se obtuvo con el tratamiento

**Tabla 4.** Efecto del pre-tratamiento sin GA, BA y fotoperiodo sobre el número de microtubérculos/planta (N°), diámetro (D), peso fresco (PF) y peso seco (PS) de los microtubérculos de las variedades AN y G.

		Tratamientos					
		8 horas luz			24 horas luz		
Var	Variable	0BA	1BA	5BA	0BA	1BA	5BA
AN	N°	1,00±0,15 <sup>c</sup>	1,10±0,18 <sup>b,c</sup>	1,90±0,25 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,05±0,05 <sup>d</sup>	0,25±0,10 <sup>c,d</sup>
	D (cm)	0,28±0,02 <sup>c</sup>	0,38±0,04 <sup>a,b,c</sup>	0,34±0,02 <sup>b,c</sup>	0,00±0,00 <sup>a,b,c</sup>	0,70±0,03 <sup>a,b,c</sup>	0,22±0,02 <sup>a,b,c</sup>
	PF (g)	0,03±0,01 <sup>-</sup>	0,09±0,03 <sup>-</sup>	0,06±0,01 <sup>-</sup>	0,00±0,00 <sup>-</sup>	0,22±0,02 <sup>-</sup>	0,01±0,00 <sup>-</sup>
	PS (g)	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,01±0,00 <sup>c,d</sup>	0,01±0,00 <sup>c,d</sup>	0,00±0,00 <sup>b,c,d</sup>	0,03±0,00 <sup>b,c,d</sup>	0,00±0,00 <sup>b,c,d</sup>
G	N°	1,85±0,25 <sup>b</sup>	2,10±0,23 <sup>b</sup>	3,80±0,22 <sup>a</sup>	0,25±0,12 <sup>c,d</sup>	0,70±0,19 <sup>c,d</sup>	0,25±0,12 <sup>c,d</sup>
	D (cm)	0,47±0,05 <sup>a,b</sup>	0,47±0,03 <sup>a,b</sup>	0,50±0,03 <sup>a</sup>	0,22±0,02 <sup>a,b,c</sup>	0,56±0,07 <sup>a</sup>	0,40±0,13 <sup>a,b,c</sup>
	PF (g)	0,18±0,04 <sup>-</sup>	0,16±0,03 <sup>-</sup>	0,17±0,02 <sup>-</sup>	0,01±0,00 <sup>-</sup>	0,23±0,07 <sup>-</sup>	0,11±0,09 <sup>-</sup>
	PS (g)	0,03±0,00 <sup>b,c</sup>	0,04±0,00 <sup>b</sup>	0,11±0,01 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>b,c,d</sup>	0,01±0,00 <sup>b,c,d</sup>	0,02±0,00 <sup>b,c,d</sup>

La tabla indica el promedio y la desviación estándar de 20 explantes por tratamiento, para cada variedad. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA ( $\alpha = 0,5$ ) y las letras señalan las diferencias entre los grupos determinadas mediante una prueba a posteriori de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

con 5 mg/L de BA debido probablemente al incremento en la tasa de división celular en los microtubérculos ya formados. Zhang *et al.* (2005), determinaron el papel del ácido indol acético (AIA), GA y BA en el crecimiento de vástagos y tuberización de *Solanum tuberosum*, reportando que la presencia de BA fue indispensable para inducir la formación de microtubérculos. Como se mencionó antes, el papel de la citoquinina en la formación de los tubérculos no está del todo claro. Las citoquininas promueven la iniciación del tubérculo en estolones aislados cultivados *in vitro* y son utilizadas comercialmente para estimular la formación de microtubérculos en la oscuridad. Akse-nova *et al.* (2011), y Raspor *et al.* (2012), señalan que la citoquinina no sólo está involucrada en la inducción de los tubérculos, sino que también favorece la división celular promoviendo la proliferación celular que ocurre en los estados tempranos del crecimiento de los tubérculos. Algunas veces los altos niveles de citoquininas

pueden actuar antagónicamente e inducir la conversión de estolones a vástagos con hojas (Raspor *et al.*, 2012).

La morfología de los microtubérculos también se vio influenciada por las condiciones lumínicas de cultivo. El pre-tratamiento con GA y el fotoperiodo favorecieron la formación de yemas en los microtubérculos, lo cual representa una gran ventaja para ser usados como semilla en el invernadero o campo.

Morfológicamente los tubérculos de papa son tallos modificados, con entrenudos muy cortos e hinchados y yemas axilares latentes conocidas como ojos. La diferenciación de los tubérculos ocurre desde la región subapical de los vástagos vegetativos subterráneos o estolones que crecen como tallos horizontales; los cuales si son expuestos a suficiente luz, crecen y emergen desde el suelo para formar un nuevo vástago. Durante este proceso, el meristema adquiere todas las características de un meristema apical del vástago, desarrollando nuevas hojas, yemas laterales y

eventualmente las flores. Sin embargo, bajo condiciones inductivas de días cortos, la elongación del estolón cesa y el ápice comienza a ensancharse para formar un tubérculo (Prat, 2010). Las células comienzan a acumular grandes cantidades de almidón y a expresar un nuevo conjunto de proteínas destinadas a servir como reserva para la nueva planta en desarrollo. En su ambiente natural, la aparición del tubérculo depende de la estación del año y del genotipo de la papa. Luego viene el período de latencia que se caracteriza por la ausencia de crecimiento de los brotes y finalmente, después del invierno, la yema de crecimiento es reactivada y las yemas laterales del tubérculo comienzan a brotar (Milinkovic *et al.*, 2012).

La similitud entre los procesos de tuberización *ex vitro* e *in vitro* y el efecto que las hormonas vegetales y el fotoperiodo tienen sobre este proceso, se destaca si consideramos que las condiciones *in vitro* son independientes de las estaciones del año. Sin embargo, gracias a la posibilidad de manipular y alterar las condiciones ambientales del cultivo *in vitro*, la microtuberización puede usarse como un sistema ideal para el estudio de las bases fisiológicas y moleculares del proceso de tuberización en campo.

Finalmente, es importante resaltar que bajo condiciones de campo la variedad AN es de tuberización tardía, demorándose hasta nueve meses para producir tubérculos, mientras que la variedad comercial G ha sido mejorada para tuberizar luego de tres a cuatro meses de cultivo. Bajo nuestras condiciones de experimentación, ambas variedades formaron microtubérculos a los tres meses de cultivo, lo cual implica una ventaja importante del protocolo establecido, especialmente para la variedad nativa.

## CONCLUSIÓN

En este trabajo se demostró que el cultivo *in vitro* de microesquejes en medios suplementados con hormonas vegetales y la incubación bajo condiciones fotoperiódicas de días cortos permite obtener microtubérculos de papa en un corto periodo de tiempo y que pueden ser utilizados en campo como semillas.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV) Proyecto PG-03-7984-2011/2 por el financiamiento del presente trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aksenova, N. P., Konstantinova, T. N., Golyanovskaya, S. A., Sergeeva, L. I., & Romanov, G. A. (2011). Hormonal regulation of tuber formation in potato plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59: 451–466.
- Alva, S., & Oropeza, M. (2013). Effect of culture medium consistence and silver nitrate on micropropagation of two potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15: 55–62.
- Borges, M., Destrade, R., Rodríguez, S., Gómez, R., Malaurie, B., Hamon, P., & Demenorval, L. (2011). Optimización de un medio de cultivo para plantas micropropagadas de *Dioscorea alata* L. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13: 221–228.
- Castro, J., Agramonte, D., Alvarado-Capo, Y., & de Feria, M. (2012). Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. *Biotecnología Vegetal*, 12: 3–24.
- Dhital, S. P., & Lim, H. T. (2012). Microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) as influenced by supplementary nutrients, plant growth regulators. *Potato Research*, 55:97–108.
- Donnelly, D., Coleman, W., & Coleman, S. (2003). Potato microtuber production and performance: a review. *American Journal of Potato Research*, 80: 103–115.
- Gopal, J., Chamail, A., & Sarkar, D. (2004). *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germplasm: Effect of genotype, abscisic acid, and sucrose. *In Vitro Cellular y Developmental Biology Plant*, 40, 485–490.
- Igarza, J., Agramonte, D., Capo-Alvarado, Y., de Feria, M., & Pugh, T. (2012). Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semillas de papa. *Biotecnología Vegetal*, 12, 3–24.

- Kittipadukul, P., Bethke, P., & Jansky, S. (2012). The effect of photoperiod on tuberisation in cultivated x wild potato species hybrids. *Potato Research*, 55, 27-40.
- Krauss, A., & Marschner, H. (1982). Influence of nitrogen nutrition, day length, and temperature on contents of gibberellic and abscisic acid and on tuberization in potato plants. *Potato Research*, 25, 13-21.
- Kumar, D., & Wareing, P.F. (1972). Factors controlling stolon development in the potato plant. *New Phytologist*, 71, 639-648.
- Khuri, S., & Moorby, J. (1995). Investigations into the role of sucrose in potato cv. Estima microtuber production *in vitro*. *Annals of Botany*, 75, 295-303.
- Marschner, H., Sattelmacher, B., & Bangerth, F. (1984). Growth rate of potato tubers and endogenous contents of indolylacetic acid and abscisic acid. *Plant Physiology*, 60, 16-20.
- Milinkovic, M., Horstra, C., Rodoni, B., & Nicolas, M. (2012). Effects of age and pretreatment of tissue-cultured potato plants on subsequent minituber production. *Potato Research*, 55, 15-25.
- Motallebi-Azar, A., Samaneh, K., & Fahimeh, Y. (2013). Effect of sugar/osmotic levels on *in vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Russian Agricultural Sciences*, 39, 112-116.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 475-597.
- Okazawa, Y. (1959). Studies on the occurrence of natural gibberellin and its effect on the tuber formation of potato plants. *Proceedings of the Crop Science Society of Japan*, 28, 129-133.
- Okazawa, Y. (1960). Studies on the relation between the tuber formation of potato and its natural gibberellin content. *Proceedings of the Crop Science Society of Japan*, 29, 121-124.
- Okazawa, Y., & Chapman, H.W. (1962). Regulation of tuber formation in the potato plant. *Plant Physiology*, 15, 413-419.
- Poehlman, J., & Allen, D. (2003). *Mejoramiento genético de las cosechas*. Limusa, México. p 511.
- Prat, S. (2010). *Hormonal and daylength control of potato tuberization*. *Plant Hormones*. First edition. Springer. Dordrecht, The Netherlands. p. 574-596
- Railton, I.D., & Wareing, P.F. (1973). Effects of day-length on endogenous gibberellins in leaves of *Solanum andigena*. *Physiology Plant*, 28, 88-94.
- Raspor, M., Václav, M., Zizková, E., Dobrev, P., Trávníčková, A., Zdravkovic-Korac, S., Simonovic, A., Ninkovic, S., & Dragicevic, I. (2012). Cytokinin profiles of AtCKX2-overexpressing potato plants and the impact of altered cytokinin homeostasis on tuberization *in vitro*. *The Journal of Plant Growth Regulation*, 31, 460-470.
- Rodríguez-Falcón, M., Bou, J., & Prat, S. (2006). Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with the flowering response. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 151-180.
- Romero, L., & Monasterio, M. (2008). Papas Negras, papas del páramo. Un pasivo socioambiental de la modernización agrícola en los Andes de Venezuela. *Boletín Antropológico*, 64, 107-138.
- Sakar, D. (2010). Photoperiodic inhibition of potato tuberization: an update. *Plant Growth Regulation*, 62, 117-125.
- Seabrook, J. (2005). Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro*: A review. *American Journal of Potato Research*, 82, 353-367.
- Smith, O.E., & Rappaport, L. (1969). Gibberellins, inhibitors, and tuber formation in the potato (*Solanum tuberosum*). *American Journal of Potato Research*, 46, 185-191.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology*. Fourth edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. p 764.
- Vreugdenhil, D., & Sergeeva, L. (1999). Gibberellins and tuberization in potato. *Potato Research*, 42, 471-481.
- Xu, X., Van Lammeren, A., 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, 575-584.
- Zhang, Z., Zhou, W., & Li, H. (2005). The role of GA, IAA and BAP in the regulation of *in vitro* shoot growth and microtuberization in potato. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 363-369.