

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMIA



**“PRODUCCIÓN DE MICROTUBÉRCULOS “IN VITRO” DE
PAPA (*Solanum tuberosum* L.) EN SISTEMA DE INMERSIÓN
TEMPORAL Y SU RENDIMIENTO EN INVERNADERO”**

Presentado por:

ANDREA JOSEFA CARRIÓN ELGUERA

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE:

INGENIERO AGRONOMO

LIMA-PERU

2017

*A mis padres por su infinito amor,
apoyo y paciencia.*

A mi hermana Natalia.

A mi bebé, que desde ya lo/a amo.

AGRADECIMIENTO

- Al Instituto de Biotecnología - Área Cultivo de Tejidos, a mis compañeras de trabajo: Rossana, Milagritos, Raquel, Olga y Gabriela.
- A mi patrocinadora, mentora y guía, la Ing. Mg. Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa, por su constante apoyo y asesoramiento en la realización de esta tesis.
- A los miembros del jurado por su paciencia y gran apoyo en la revisión de la Tesis.

ÍNDICE

RESUMEN

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1.	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA PAPA:	3
2.2.	TUBERIZACIÓN DE LA PAPA.....	4
2.3.	FACTORES QUE AFECTAN LA TUBERIZACIÓN	4
2.4.	CATEGORÍA DE SEMILLAS (INIA, 2009).....	6
2.4.1.	Semilla Pre Básica	6
2.4.2.	Semilla certificada.....	6
2.4.2.1.	Categoría Básica o de Fundación	6
2.4.2.2.	Categoría Registrada	6
2.4.2.3.	Categoría Certificada.....	6
2.4.2.4.	Categoría Autorizada.....	7
2.5.	CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES “ <i>IN VITRO</i> ” DE PAPA	7
2.6.	DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.....	8
2.7.	SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL (TEMPORARY IMMERSION SYSTEMS)	8
2.8.	LA MICROTUBERIZACIÓN	11
2.9.	LA MICROTUBERIZACIÓN CON SISTEMAS DE INMERSION TEMPORAL ..	12
2.10.	TUBERIZACIÓN DE PAPA EN INVERNADERO A PARTIR DE PLANTAS <i>IN VITRO</i> Y MICROTUBÉRCULOS PROVENIENTES DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL	13
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1.	LUGAR DE SIEMBRA	18
3.2.	MATERIALES Y EQUIPOS.....	18
3.2.1.	Materiales de laboratorio.....	18
3.2.2.	Materiales de invernadero	21
3.3.	MÉTODOS Y PROCEDIMIENTO	22

3.3.1.	En laboratorio:.....	22
3.3.1.1.	Preparación del medio de cultivo:	22
3.3.1.2.	Preparación de los biorreactores:	22
3.3.1.3.	Instalación del Sistema de Inmersión Temporal	23
3.3.1.4.	Experimentos:.....	24
3.3.2.	Ensayo en invernadero	25
3.4.	SISTEMA DE EVALUACIÓN	29
3.4.1.	Laboratorio:.....	29
3.4.2.	Invernadero:	30
3.4.2.1.	Porcentaje de prendimiento	30
3.4.2.2.	Número de tubérculos por tratamiento	30
3.5.	FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS	31
3.5.1.	Experimento I: “Microtuberización <i>in vitro</i> ”	31
3.5.2.	Experimento II: “Tuberización en invernadero”	31
3.6.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	31
3.6.1.	Experimento I: “Pre adaptación al Sistema de inmersión temporal”	31
3.6.2.	Experimento II: “Comportamiento de 5 variedades de papa al Sistema de inmersión temporal”	32
3.6.3.	Experimento III: “Tuberización en invernadero” a partir de microtubérculo, plántula “ <i>in vitro</i> ” y minitubérculo	32
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1.	MICROTUBERIZACIÓN EN BIORREACTORES.	34
4.1.1.	Pre adaptación de los segmentos de tallo al Sistema de inmersión temporal.....	34
4.1.1.1.	Por peso promedio de microtubérculos.	34
4.1.1.2.	Masa fresca total de microtubérculos por biorreactor.	36
4.1.1.3.	Por número de microtubérculos por biorreactor.....	37
4.1.2.	Comportamiento de cinco variedades al Sistema de inmersión temporal.....	39
4.1.2.1.	Masa fresca promedio de microtubérculos.....	39
4.1.2.2.	Por peso total de microtubérculos por biorreactor.	40
4.1.2.3.	Por número de microtubérculos por biorreactor.....	42
4.2.	TUBERIZACIÓN EN INVERNADERO.	45
4.2.1.	Por peso promedio de tubérculos.	45
4.2.2.	Masa fresca total de tubérculos.	46
4.2.3.	Por número total de tubérculos.	48
V.	CONCLUSIONES	50
VI.	RECOMENDACIONES	51

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
VIII.ANEXOS.....	56
8.1. ANEXO 1:.....	56
8.2. ANEXO 2.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Análisis de variancia de los pesos promedio de microtubérculo producido en cada tratamiento de pre adaptación al sistema de inmersión temporal ($\alpha=0.05$).....	34
Tabla 2: Análisis de variancia del rendimiento de microtubérculos por peso producido por biorreactor en cada tratamiento de pre adaptación al sistema de inmersión temporal ($\alpha=0.05$) .	36
Tabla 3: Análisis de variancia del rendimiento de microtubérculos por número de microtubérculos producido por biorreactor en cada tratamiento de pre adaptación al sistema de inmersión temporal ($\alpha=0.05$).....	37
Tabla 4: Análisis de variancia de la masa fresca promedio de microtubérculos producido por cada variedad en el sistema de inmersión temporal ($\alpha=0.05$)	39
Tabla 5: Análisis de variancia del rendimiento de microtubérculos por peso producido por biorreactor en cada variedad en el sistema de inmersión temporal ($\alpha=0.05$)	40
Tabla 6: Análisis de variancia del rendimiento por número de microtubérculos producido por biorreactor en cada variedad en el sistema de inmersión temporal ($\alpha=0.05$)	42
Tabla 7: Análisis de variancia de la masa fresca promedio de minitubérculos producidos por los cuatro tipos de semilla ($\alpha=0.05$).....	45
Tabla 8: Análisis de variancia del rendimiento por peso de minitubérculos producidos por los cuatro tipos de semilla ($\alpha=0.05$).....	46
Tabla 9: Análisis de variancia del rendimiento por número de minitubérculos producidos por los cuatro tipos de semilla ($\alpha=0.05$)	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema del Sistema de Inmersión Temporal tipo RITA	9
Figura 2: Esquema del Sistema de Inmersión temporal tipo Twin Flask	10
Figura 3: Tubérculos de papa Var. Canchán	19
Figura 4: Tubérculos de papa Var. Yungay	19
Figura 5: Tubérculos de papa Var. Unica	20
Figura 6: Tubérculos de papa Var. Capiro	20
Figura 7: Tubérculos de papa Var. Peruanita	21
Figura 8: Plántulas de papa en la fase de proliferación en Biorreactores	23
Figura 9: Biorreactores en la fase de tuberización.	24
Figura 10: (a) Plántulas de papa in vitro listas para su aclimatación. (b) Plántulas de papa sembradas en bandeja para su aclimatación.....	26
Figura 11: (a) Plántulas listas para el tranplante a bolsa. (b)Plántulas aclimatadas, transplantadas a bolsas.....	26
Figura 12: (a) Aporque de plantas. (b) Fertilizante nitrogenado.	27
Figura 13: (a) Minitubérculos desarrollados en las bolsas. (b) Cosecha de papa.....	29
Figura 14: (a) Pesado de minituberculos. (b) Medición de minitubérculos.....	30
Figura 15: Prueba de comparación de medias de la masa fresca promedio de microtubérculo producido en cada tratamiento de pre adaptación al Sistema de inmersión temporal (Tukey $\alpha =0.05$).....	35
Figura 16: Prueba de comparación de medias del rendimiento de microtubérculos por peso producido por biorreactor en cada tratamiento de pre adaptación al Sistema de inmersión temporal (Tukey $\alpha =0.05$).....	36
Figura 17: Prueba de comparación de medias del rendimiento de microtubérculos por número de microtubérculos producido por biorreactor en cada tratamiento de pre adaptación al Sistema de inmersión temporal (Tukey $\alpha =0.05$)	38
Figura 18: Prueba de comparación de medias de la masa fresca promedio de microtubérculos producido por cada variedad en el Sistema de inmersión temporal (Tukey $\alpha =0.05$).....	39

Figura 19: Prueba de comparación de medias del rendimiento de microtubérculos por peso producido por biorreactor/variedad en el Sistema de inmersión temporal (Tukey $\alpha = 0.05$).....	41
Figura 20: Producción de microtubérculos de papa de la var. "Canchan"	42
Figura 21: Prueba de comparación de medias del rendimiento por número de microtuberculos producido por biorreactor en cada variedad en el Sistema de inmersión temporal (Tukey $\alpha = 0.05$).....	43
Figura 22: Microtubérculos de la var. "Peruanita"	44
Figura 23: Prueba de comparación de medias de la masa fresca promedio de minitubérculos producidos por los cuatro tipos de semilla (Tukey $\alpha = 0.05$)	45
Figura 24: Prueba de comparación de medias del rendimiento por peso de minitubérculos producidos por los cuatro tipos de semilla (Tukey $\alpha = 0.05$)	47
Figura 25: Prueba de comparación de medias del rendimiento por número de minitubérculos producidos por los tres tipos de semilla (Tukey $\alpha = 0.05$)	48

RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una de las especies vegetales con mejor respuesta al cultivo de tejidos, debido a que se puede regenerar desde tejidos organizados, agregados celulares y protoplastos. El microtubérculo producido “*in vitro*”, representa una fase transitoria entre la multiplicación “*in vitro*” de material sano y la multiplicación en campo, en tal sentido, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, con sistemas automatizados de inmersión temporal, son una opción eficiente para el crecimiento, multiplicación y microtuberización de plántulas de papa *in vitro*. El material vegetal que se utilizó como material madre fueron plántulas “*in vitro*” de papa proveniente del Centro Internacional de la Papa de las variedades Canchan, Yungay, Unica, Capiro y Peruanita. En los ensayos de laboratorio, el peso promedio de los microtubérculos producidos en biorreactores en el experimento de pre adaptación, el tratamiento de 0 días fue el que obtuvo la mayor masa fresca (0.977 gr) aunque no fue significativo con respecto a lo obtenido por los otros tratamientos. En cambio el tratamiento de 14 días fue el que se obtuvo mayor rendimiento de microtubérculos, siendo este significativo. La masa fresca de los microtubérculos producidos por biorreactores de las cinco variedades fueron significativamente diferentes, siendo la variedad “Canchan” la que mayor peso fresco se logró (8.67 gr), la variedad “Yungay” se logró el menor peso fresco (2.83 gr), en número de microtubérculos, la variedad “Peruanita” fue la que mayor número de microtubérculos desarrolló (20) y la variedad “Yungay” fue la de menor número de microtubérculos (4.6). En los ensayos en invernadero se observó que el rendimiento de los cuatro tipos de semilla, en la var. “Canchan” existieron diferencias significativas, siendo las plantas provenientes de microtubérculos grandes con mejor comportamiento, con un peso fresco por planta de 29.39 gramos y 5.08 minitubérculos, por el contrario las plantas provenientes de microtubérculos pequeños rindieron 10.85 gramos y 2.62 minitubérculos.

Palabras clave: *Biorreactores, tuberización, microtubérculos, aclimatación, invernadero*

I. INTRODUCCIÓN

El Perú presenta una gran diversidad de especies vegetales, con alto potencial de desarrollo agroindustrial y genético, siendo importante identificar, desarrollar y transferir las técnicas biotecnológicas, como el de cultivo de tejidos vegetales con sistemas automatizados, que mejoran los protocolos de producción y aclimatación de propágulos seleccionados de material libre de plagas y sin latencia infecciosa; y puedan ser usados como una herramienta para la investigación en futuros sistemas experimentales (Stead, 1999; Coleman et al., 2001; Ziv, 2005).

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los alimentos más nutritivos para el consumo humano. La producción de proteínas por unidad de área y tiempo en papa es superior a otras especies cultivadas, así como en la producción de energía. La proteína de la papa tiene un alto valor biológico solamente comparable con la caseína de la leche. Además presenta un buen balance de aminoácidos, siendo relativamente rica en lisina y triptófano, aunque pobre en metionina. Es también una fuente de ácido ascórbico, tiamina, niacina, piridoxina y sus derivados: vitaminas del grupo B6 y riboflavina. (Wisar y Ortiz, 1988)

La papa es una de las especies vegetales con mejor respuesta al cultivo de tejidos, debido a que se puede regenerar desde tejidos organizados, agregados celulares y protoplastos, siendo por esto considerada como una herramienta experimental para el establecimiento de diferentes técnicas en el cultivo de tejidos *in vitro* (Ross, 1986; Vasil and Thorpe, 1994; Vreugdenhil and Sergeeva, 1999).

El microtubérculo producido "*in vitro*", representa una fase transitoria entre la multiplicación "*in vitro*" de material sano y la multiplicación en campo (Rosu et al., 2004) o en invernadero. Los microtubérculos son de tamaño pequeño (3-10 mm de diámetro),

forma esférica, con 0.05 a 1.3 g de peso. Los microtubérculos menores a los 3 mm de diámetro no son utilizables. La producción de microtubérculos es un método eficiente para la obtención de material sano, lo cual reduce el proceso de producción de semillas por 3-4 años (Rosu et al., 2004). Por esta razón los microtubérculos de papa vienen ganando importancia como medio de propagación para reducir el número de multiplicaciones de tubérculos – semillas de alta calidad en varias partes del mundo (Ranalli, 1997; Jiménez et al., 1999; Yu et al., 2000).

La manera convencional de producir semillas de papa es a través de la multiplicación de plántulas libres de virus en invernaderos usando sustratos esterilizados. La semilla convencional se siembra en zonas altas (> 3000 m.s.n.m.), con bajas temperaturas, donde la tasa inicial del inóculo es igual a cero y no llegan los insectos transmisores de enfermedades virosicas. Por esta razón la producción de microtubérculos bajo el sistema de inmersión temporal y la producción bajo invernadero es una buena alternativa para producir semillas pre-básica de buena calidad.

En tal sentido, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, con sistemas automatizados de inmersión temporal o también llamados biorreactores, son una opción eficiente para el crecimiento, multiplicación y microtuberización de plántulas *in vitro* de papa. Al optimizar el uso de nutrientes y suministrar una mayor ventilación, se mejora la calidad de las plántulas, así mismo la mecanización reduce la manipulación, el espacio del laboratorio, los costos, así como el tiempo y pérdidas que se producen en el proceso de aclimatación, incrementando el volumen de producción y mejorando el acceso a semillas de alta calidad (Piao et al., 2003; Winarto et al., 2004; ZIv, 2005; Mehrotra, 2007).

El objetivo del presente trabajo es obtener microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) bajo el Sistema de Inmersión Temporal y evaluar su rendimiento en invernadero comparándolo con lo obtenido por las plantas “*in vitro*” y minitubérculos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA PAPA:

Reino:Plantae

División:Magoliophyta

Clase:Magnoliopsida

Subclase:Asteridae

Orden:Solanales

Familia: Solanáceas

Género: *Solanum*

Especie: *tuberosum*

Goniocalyx

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una planta herbácea anual que crece hasta los 100 cm de alto. Durante el crecimiento de la planta de papa, sus hojas compuestas sintetizan el almidón que es transferido posteriormente hacia los tallos subterráneos (o estolones). Estos tallos se engrosan para formar tubérculos cerca de la superficie del suelo. Se pueden llegar a formar de unos pocos hasta 20 tubérculos. El número de tubérculos que llegan a la madurez depende de la disponibilidad de humedad y nutrientes en el suelo (CIP, 2013).

Al final de la temporada de cultivo, las hojas de la planta y los tallos mueren y caen al suelo y los nuevos tubérculos se separan de sus tallos. En ese momento los tubérculos se convierten en lugares de almacenamiento de nutrientes, lo que le permite a la planta sobrevivir el frío para más adelante volver a crecer y multiplicarse. Cada tubérculo tiene de dos a 10 brotes (ojos), distribuidos en patrón espiral alrededor de la superficie. De los brotes se generan plantas que crecen cuando las condiciones son nuevamente favorables (CIP, 2013).

2.2. TUBERIZACIÓN DE LA PAPA

Los estolones son tallos subterráneos que crecen en posición más o menos horizontal formando pequeñas hojuelas, botones laterales y un botón terminal compuesto de cierto número de hojuelas. En un momento dado su extremo comienza a hincharse inmediatamente después de una curvatura del estolón (gancho), para formar el tubérculo (Pozo, 1997).

Según Egúsqüiza (2000), la tuberización se realiza en dos etapas consecutivas:

a. Inducción o inicio: Ocurre cuando los azúcares se depositan en la forma de almidón; las células se multiplican a lo largo del gancho y los estolones dejan de crecer. La inducción ocurre en 1 ó 2 semanas a nivel de la planta.

b. Tuberización o “llenado”: Es la etapa de crecimiento del tubérculo; las células se multiplican radialmente (hacia los costados del “gancho”) y el tubérculo se expande (crece) por acumulación de agua y de sólidos. Ocurre hasta la muerte del follaje.

2.3. FACTORES QUE AFECTAN LA TUBERIZACIÓN

De acuerdo a Kooman (1995) y Jackson (1999), la papa se cultiva en muchos climas del mundo a excepción de las zonas bajas de la franja tropical. En zonas tropicales y subtropicales los rendimientos son más bajos y menos estables que en la zona templada.

Para estos autores, la razón está principalmente en que en estos climas, la presión de plagas y enfermedades es alta y los cultivos se ven afectados por deficiencias nutricionales y disponibilidad de agua. Aunque estas condiciones fueran totalmente controladas, los rendimientos serían bajos, debido a que el potencial de producción de materia seca está gobernada por factores genéticos y clima (radiación electromagnética, temperatura y duración del día). Además Debabrata and Prakash (1998) indican que otro factor importante para la tuberización son los niveles de nitrógeno.

Egusquiza (2000) propone los siguientes factores:

- a. **Planta:** Debe haber desarrollado una cantidad de follaje suficiente para producir excedentes de azúcares.
- b. **Temperatura:** La planta debe recibir el estímulo de temperaturas bajas (frío). Las condiciones de temperaturas ideales son las comprendidas entre 10 a 20°C en las que la respiración es todavía baja.
- c. **Agua:** La planta no debe sufrir de limitaciones o déficit de agua.
- d. **Nitrógeno:** Debe haberse reducido el abastecimiento de nitrógeno proveniente del suelo. En caso de haber abastecimiento de nitrógeno, la planta continúa el crecimiento aéreo y se retrasa el inicio de tuberización.
- e. **Duración del día:** Los días de 10 ó 12 horas de duración son apropiadas para nuestras variedades.
- f. **Luminosidad:** Se refiere a la intensidad de la luz del día. En zonas con días nublados se reduce el contenido de sólidos del tubérculo (papa más "aguachenta"). En la sierra hay mejor calidad de luz (papa más "harinosa").

2.4. CATEGORÍA DE SEMILLAS (INIA, 2009)

2.4.1. Semilla Pre Básica

Reproduce fielmente la identidad de un cultivar y posee alta calidad sanitaria, equivale a la Semilla Genética

2.4.2. Semilla certificada

2.4.2.1. Categoría Básica o de Fundación

Es la obtenida de una o dos multiplicaciones de semilla Genética o Pre Básica, sometida al proceso de certificación y que cumple con los requisitos establecidos para la categoría. A la primera multiplicación se denominará Semilla Básica I y a la segunda, Básica II.

2.4.2.2. Categoría Registrada

Es la obtenida a partir de una o dos multiplicaciones de semilla Genética, Pre Básica o Básica, sometida al proceso de certificación y que cumple con los requisitos establecidos para la categoría. A la primera multiplicación se denominará Semilla Registrada I y a la segunda, Registrada II.

2.4.2.3. Categoría Certificada

Es la obtenida a partir de una o dos multiplicaciones de semilla Genética, Pre Básica, Básica o Registrada, sometida al proceso de certificación y que cumple con los requisitos establecidos para la categoría. A la primera multiplicación se denominará Semilla Certificada I y a la segunda, Certificada II.

2.4.2.4. Categoría Autorizada

Es aquella que cuenta con suficiente identidad y pureza varietal, sometida al proceso de certificación y que cumple con los requisitos establecidos para la semilla de categoría certificada excepto en lo que a su procedencia se refiere.

2.5. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES “*IN VITRO*” DE PAPA

Su reproducción es principalmente asexual o vegetativa (tubérculos), debido a que mantiene las características de la planta madre, obteniendo una población uniforme. La propagación sexual (semillas) está limitada por la alta variabilidad genética que se observa en la progenie, debido a que es altamente heterocigota, y por esterilidad parcial o completa de algunas variedades (Vasil and Thorpe, 1994; Stead, 1999; Fernie and Willnitzer, 2001). Además, es uno de los cultivos con mayor requerimiento tecnológico, por estar expuesto al ataque de organismos patogénicos causantes de pérdidas en el rendimiento y mantenidos en la planta por su propagación vegetativa (Cassells et al., 1999).

La técnica de cultivos de tejidos vegetales *in vitro* nos da la ventaja de obtener plántulas libre de virus y uniformes en cuanto a su genética, tamaño y vigor.

La papa ha demostrado una gran plasticidad en su desarrollo haciendo posible la regeneración de plantas enteras a partir de diferentes fuentes de explantes (Dodds, 1984), como: a partir de discos de tubérculo (Lam, 1975; Jarret et al., 1980), secciones nodales de tallo (de García and Martínez, 1995; Flick et al., 1983; Hoque et al., 1996), raíces (Dodds, 1984), y a partir de discos de hojas (Webb et al., 1983; Wenzler et al., 1989; Hulme et al., 1992; Park et al., 1995).

2.6. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL

La automatización en biorreactores ha sido ampliamente estudiada por varios autores como medio para reducir costos de producción. Los biorreactores son descritos como contenedores con medio estéril que poseen los nutrientes necesarios en medio líquido. Pueden disponer de entradas y salidas de líquido y/o aire y están básicamente diseñados para el cultivo intenso, brindando facilidades de monitoreo y control sobre las condiciones del microambiente: agitación, aireación, temperatura, oxígeno disuelto, pH, etc. (Paek *et al.* 2005).

La función básica de un biorreactor es proveer condiciones óptimas para el desarrollo de los tejidos, regulando varios factores físicos y químicos. El diseño y operación de los biorreactores está orientado al tipo de cultivo que se desea realizar, ya sea embriogénico u organogénico, cumpliendo este con las necesidades biológicas y requerimientos nutricionales que generalmente incluyen varios factores como eficiencia en la transferencia de masa y oxígeno desde la fase gaseosa a la fase líquida, por lo que se hace necesaria la difusión de gas a fases líquidas para cumplir con la demanda de los tejidos vegetales. Para lograr estos objetivos es necesaria la modificación de parámetros tales como la tasa de aireación, la velocidad de agitación, mezcla de gases, la optimización del diseño del biorreactor, etc. (Paek *et al.*, 2001). El desarrollo de un óptimo diseño debe brindar las máximas tasa de crecimiento y proliferación (Paek *et al.*, 2005).

2.7. SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL (TEMPORARY IMMERSION SYSTEMS)

Los Sistemas de Inmersión Temporal han sido descritos para la multiplicación de diferentes cultivos y se pueden aplicar a tallos, embriones somáticos y producción de microtubérculos. Diferentes diseños han sido creados y entre los más comerciales tenemos al RITA y al Twin Flasks.

a) Reactor de inmersión temporal automático (RITA)

Está compuesto por dos compartimentos, uno superior (contiene el material vegetal) y otro inferior (contiene el medio de cultivo), estos dos compartimientos están ligados de tal manera que cuando la presión de aire aumenta en el compartimiento inferior, el medio es impulsado hacia el superior, manteniendo los explantes sumergidos hasta que se continúe aplicando presión. Durante el periodo de inmersión, el medio se mantiene aireado, los explantes son agitados ligeramente y la atmosfera interna se reemplaza, dejando escapar la presión por una salida en la parte superior del sistema. Cuando la presión de aire cae, el medio lo hace también. La frecuencia y duración de las inmersiones son fácilmente controladas por una válvula solenoide y un timer. Para evitar contaminación, los flujos de aire pasan por filtros hidrofóbicos (Figura 1).

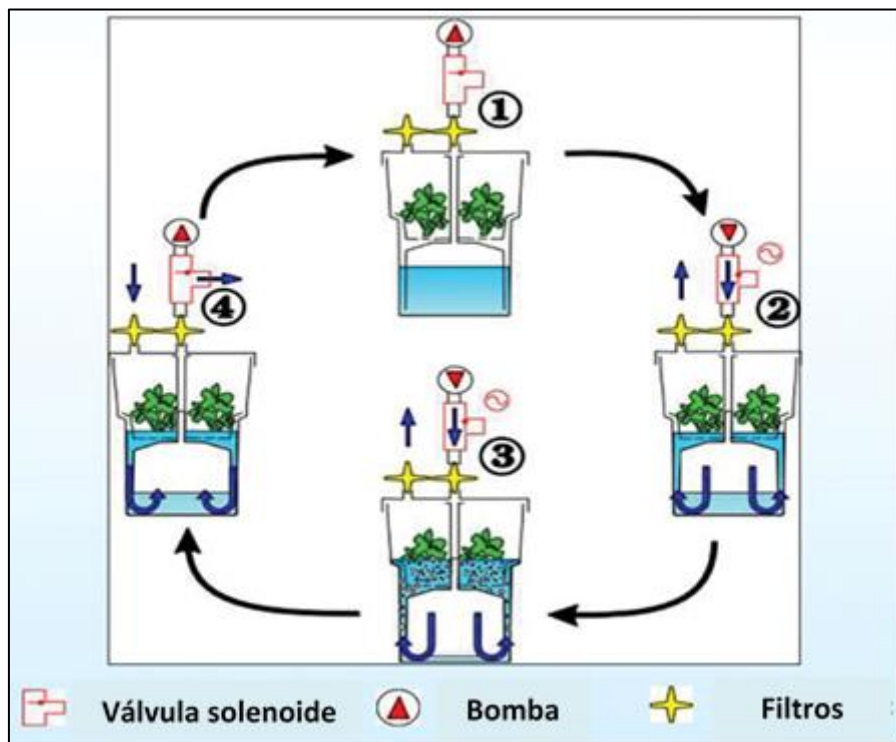


Figura 1: Esquema del Sistema de Inmersión Temporal tipo RITA

b) Sistema de frascos gemelos (Twin Flasks System)

Está compuesto por dos frascos, uno contiene el material vegetal y el otro contiene el medio de cultivo, ambos frascos están ligados por una manguera de silicona, de tal manera que cuando la presión de aire aumenta en uno de los frascos, el medio es impulsado hacia el otro manteniendo los explantes sumergidos hasta que continúe aplicando presión. La frecuencia de inmersión es regulada por un timer conectado a válvulas solenoides. Al abrirse una de las válvulas, el medio es trasladado de un frasco a otro. Durante el periodo de inmersión el medio, al igual que en RITA, se mantiene aireado, los explantes agitados ligeramente y la atmosfera interna se reemplaza dejando escapar la presión por las salidas ubicadas en la parte superior de cada uno de los frascos. Para evitar contaminación, los flujos de aire pasan por filtros hidrofóbicos (Figura 2).

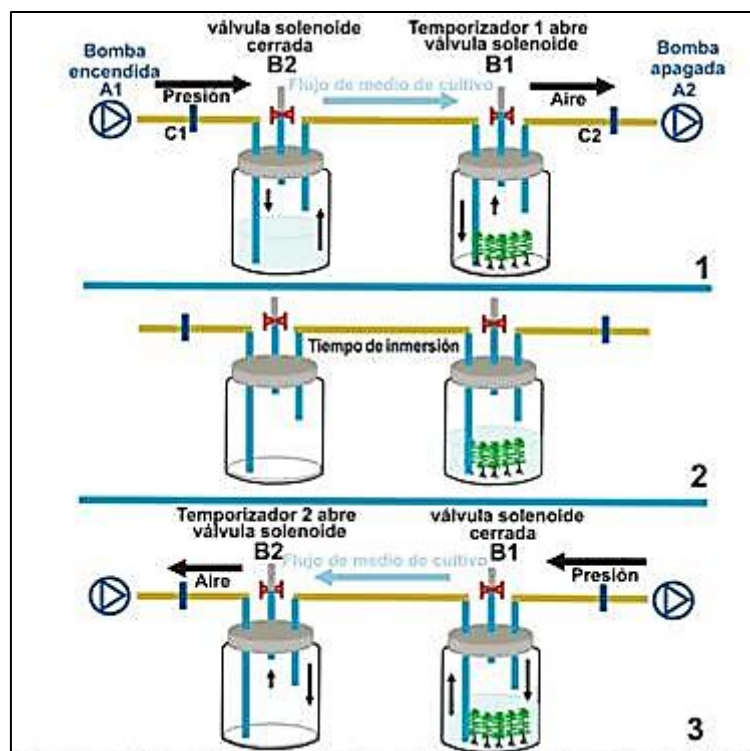


Figura 2: Esquema del Sistema de Inmersión temporal tipo Twin Flask

2.8. LA MICROTUBERIZACIÓN

La producción *in vitro* de tubérculos de papa o Microtuberización, se realiza desde hace más de 50 años. Inicialmente fue utilizada como una herramienta experimental para examinar la tuberización y problemas patológicos (Baker, 1953 y Mes and Mengue, 1954 citados por Coleman, 2001).

Entre las técnicas de cultivo de tejidos, la microtuberización ofrece una serie de ventajas, por su fácil manipulación debido a su tamaño y peso, facilidad de almacenaje, transporte y mecanización, lo cual es necesario en el mantenimiento y manipulación del germoplasma. Al ser fácilmente en espacios reducidos, pueden ser transferidos y distribuidos más fácilmente que las plántulas *in vitro* (Akita y Takayama, 1994).

Su alto contenido hormonal, producen plantas con mayor vigor y mejor estado fisiológico, permitiendo que se siembren directamente en el campo, lo cual es importante para la propagación masiva y rápida de papa en cualquier época del año (Lago, 1990; Etienne y Berthouly, 2002).

Además de contribuir a la selección y evaluación de caracteres agronómicos de germoplasma *in vitro* (Gopal and Minocha, 1997, 1998 citados por Coleman, 2001), su uso en los programas de producción de semilla pueden reducir el número de multiplicaciones en el campo (Struik y Lommen, 1999). Así mismo, sirven de material de partida para programas que carecen de infraestructura adecuada y de experiencia en cultivo de tejidos (Centro Internacional dela papa, 1995).

La producción de tubérculo semilla de buena calidad es un proceso complejo, laborioso y costoso. La micropropagación ha sido eficiente para eliminar enfermedades, aunque su principal ventaja es la rápida clonación de plántulas. Generalmente parte de cortes de tallo de uno o múltiples nudos que se multiplican en medios líquidos o sólidos (Ranalli, 1997).

Siendo efectivo para la rápida multiplicación de material vegetal selecto de plántulas y microtubérculos, para la producción de papa pre básica y básica respectivamente, en condiciones asépticas y libres de enfermedades (Ranalli, 1997).

2.9. LA MICROTUBERIZACIÓN CON SISTEMAS DE INMERSION TEMPORAL

Diversos avances se han hecho para mejorar la calidad y cantidad de microtubérculos por plántula, tales como el cambio de los componentes del medio de cultivo, la adición de altos contenidos de azúcar (Estrada et al., 1986; Harvey et al., 1991; citados por Jiménez et al., 1999), manipulación de las condiciones de cultivo como, temperatura, luz y fotoperiodo y el uso de medio líquido en frascos agitados o biorreactores (Jiménez et al., 1999; Teisson y Alvard, 1999; Teisson y Alvard, 1999; Etienne y Berthouly, 2002; Piao et al., 2003; Ziv, 2005).

Varias estrategias se han aplicado en sistemas de propagación a gran escala de microtubérculos con uso de biorreactores (Akita y Ohta, 1998; Jiménez et al., 1999; Teisson and Alvard, 1999; Piao et al., 2003). Estos, se han producido *in vitro* utilizando biorreactores del tipo ebb-and-flow (EFBR), con control semicontínuo del nivel del medio de cultivo líquido (Akita y Takayama, 1994), pero este sistema incrementa los costos por propágulo producido. Akita y Ohta (1998), desarrollaron un sistema con rotación del frasco de cultivo, sin fuerza de aireación, que provocó problemas de estrés y baja calidad (bajo peso fresco y materia seca) de los microtubérculos producidos.

El sistema de inmersión temporal descrito por Alvard et al. (1994) y Jiménez et al. (1999), es una alternativa de bajo costo para la producción de microtubérculos utilizando grandes frascos de cultivo. Piao et al. (2003), estudió los sistemas de inmersión temporal y los de inmersión continua, concluyendo que la utilización de sistemas de inmersión temporal mejoran la producción de microtubérculos de manera cualitativa y cuantitativamente.

El uso de sistemas de inmersión temporal es eficiente en la producción de microtubérculos de papa, ya que combina los avances del medio de cultivo sólido (máximo intercambio de gas) y del medio de cultivo líquido (incremento de la exposición de nutrientes), elimina el efecto adverso de la inmersión continua en el crecimiento y la morfogénesis, permitiendo una sucesión de cambio de medio y la automatización (Jiménez et al., 1999; Teisson and Alvard, 1999).

Estos sistemas reducen los costos al minimizar la manipulación, la contaminación y mejorar el control de las condiciones de cultivo con el contacto directo de los tejidos vegetales con el medio de cultivo, optimizando el suplemento de los nutrientes y reguladores del crecimiento. Así, no solo se produce más microtubérculos, sino que también se incrementa el tamaño y peso de éstos, los cuales pueden ser almacenados y directamente trasplantados al campo sin aclimatación (Simonton 1991; Etienne y Bertholy, 2002; Piao et al., 2003).

2.10. TUBERIZACIÓN DE PAPA EN INVERNADERO A PARTIR DE PLANTAS *IN VITRO* Y MICROTUBÉRCULOS PROVENIENTES DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL

a. Condiciones ambientales en un invernadero

Alpi, A. y Tognoni, F. (1984), manifiestan que el invernadero es un refugio creado esencialmente para proteger las plantas en la épocas del año en que la temperatura es más baja y por lo tanto es conveniente considerar la temperatura puesto que el balance térmico, junto con la cantidad total de energía luminosa constituye el elemento principal para determinar la eficiencia de un invernadero. Estas características, sobre todo la intensidad de energía solar, son las que determinan la luminosidad de un invernadero, y a su vez depende de los factores meteorológicos del ambiente interno, de las características de la construcción y del material. En relación a la temperatura de la atmosfera de un invernadero, las radiaciones más importantes son las infrarrojas cortas que pasan a través de los materiales de recubrimiento y son absorbidas por las plantas, por el terreno y por

los otros materiales que se encuentran en el invernadero. Las radiaciones infrarrojas que pasan a través del material de recubrimiento, el cual a su vez emite radiaciones caloríficas tanto hacia el exterior como hacia el interior, son las que calientan la atmósfera del invernadero, a este fenómeno es lo que se suele llamar efecto invernadero.

b. Sustrato

Marca, J. (1995), nos dice que hay diversos sustratos y mezclas que se usan en la multiplicación de papa, ya que para la germinación de semilla botánica, enraizamiento de esquejes, transplante de plántulas *in vitro* y siembra de tuberculillos en macetas o camas de producción dentro de un invernadero, para ello el sustrato debe reunir las siguientes características:

- Debe ser lo suficientemente firme y denso para mantener las plantas en su sitio durante el cultivo.
- Su volumen no debe variar mucho, ya sea seco o húmedo, es negativo que tenga una reducción excesiva al secarse.
- Debe ser lo suficientemente poroso, de modo que se escurra el exceso de agua y permita una aireación adecuada.
- Debe estar libre de malezas, nematodos y otros organismos patógenos nocivos.
- Al ser esterilizado con vapor de agua y productos químicos no debe tener efectos nocivos a las plantas.
- Las combinaciones de turba, arena y musgo, por lo general, dan los mejores resultados que empleando cualquiera de ellos individualmente.

Para lograr una adecuada emergencia y posterior crecimiento de plántulas, el sustrato debe poseer un alto porcentaje de materia orgánica y una cantidad muy limitada de arcilla. Una proporción excesiva de arcilla causa compactación y encostramiento del sustrato, lo cual dificulta la emergencia de las plántulas. La presencia de arcilla en proporciones adecuadas o de compost, favorece la retención tanto de los nutrientes aportados por los fertilizantes como la humedad del sustrato (Soplín, 1987).

c. Aclimatación

Cock J, H. (1983), afirma que el trasplante directamente al campo de plántulas *in vitro* es dificultoso, por lo cual el Centro internacional de la papa recomienda transferirlas primero a bandejas o macetas de sustrato y luego llevarlas a campo.

Malagamba, J. P. (1984), manifiesta que la recuperación de las plántulas, después del trasplante está mayormente influenciado por la reacción de la variedad a las condiciones ambientales y a su habilidad para recuperarse del choque al trasplante, siendo el factor más importante la regeneración inmediata de su sistema radical adventicio, lo cual puede llegar a influir hasta 87 por ciento.

Tovar y Dodds (1986), indica que las plántulas producidas en el laboratorio, a partir de meristemas apicales cuando tienen una altura de 3 a 5 cm y han desarrollado un buen sistema radicular, pueden ser llevados a invernaderos donde son trasplantados y sometidas a proceso de multiplicación rápida para obtener semilla pre básica.

Calderón (1987), indica que las plántulas *in vitro* que han desarrollado en el laboratorio son transferidos al invernadero, en estas condiciones las plántulas van a desarrollarse en un sustrato y con luz natural por lo tanto estas plántulas son delicadas y necesitan cuidado en el manipuleo desde el inicio hasta el trasplante ya sea en camas o macetas para la producción de tubérculos (Figura 10).

Cuando las plantas de papa que están creciendo en macetas o en camas en el invernadero, llegan a la senescencia y comienza a producirse un amarillamiento que se inicia generalmente por las hojas basales, indican que la planta ha llegado a la madurez fisiológica, para tal efecto se eliminan los tallos mediante el corte, los implementos que se utilizan para esta labor deben desinfectarse con una solución de agua jabonosa y de hipoclorito de calcio al 10% para evitar cualquier contaminación. Luego de cortados los tallos a los 10 o 15 días debe proceder al a cosecha, este tiempo desde el corte hasta la

cosecha sirve para que la piel de los tubérculos se suberice; seguidamente debe desinfectarse los tubérculos con un fungicida para luego almacenarlos.

d. Fertilización

Cuando las plántulas presentan signos de prendimiento se deben regar con una solución de fertilizante de NPK (10-55-10) disolviendo 1.0 g por cada 4 litros de agua. También pueden usarse solución nutritiva de Hoagland en proporción de 1:4 esto es, una parte de la solución por cuatro partes de agua (Mejía et al., 1988).

Los tubérculos cosechados en invernadero se clasifican de acuerdo al tamaño y peso, teniendo en cuenta el criterio de mayor y menor tamaño obtenido en camas o macetas.

Tabla 1: Criterio de clasificación de semilla tubérculo pre básica de papa producida en invernadero (INIA, 2009).

Escalas	Peso (g)
Gruesa	> 40
Primera	30-39
Segunda	20-29
Tercera	10-19
Cuarta	1-9

e. Antecedentes

CIP (1987), señalan que las plántulas *in vitro* exhibieron un crecimiento inicial más lento que los microtubérculos y produjeron más tubérculos por tallo y por unidad sembrada. El menor vigor inicial de la planta y la mayor cobertura del terreno se registraron en las parcelas con plántulas *in vitro*, los que produjeron más tubérculos por unidad de superficie, especialmente de tamaño más pequeño que los microtubérculos. Los rendimientos más altos se obtuvieron con 48 plantas por m².

Wiersema, *et al.* (1986), en un trabajo realizado en el CIP manifiestan que las plántulas crecidas a partir de microtubérculos, emergen 97 a 100 % y el prendimiento de plántulas *in vitro* es en un 95%. Las plántulas *in vitro* presentaron un menor vigor de planta y cobertura comparado a los microtubérculos. El número de tallos fue menor en microtubérculos al igual que el número de tubérculos por metro cuadrado. Utilizaron una densidad de 48 plantas por m², para ambos casos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE SIEMBRA

El trabajo experimental se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto de Biotecnología (IBT), área Cultivo de Tejidos de la Universidad Nacional Agraria La Molina (238 msnm).

3.2. MATERIALES Y EQUIPOS

3.2.1. Materiales de laboratorio

Material vegetal: El material vegetal que se utilizó como material madre fueron: plántulas *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. “papa” proveniente del Centro Internacional de la Papa (CIP). Las variedades fueron las siguientes:

- a) **CANCHAN.-** La papa Canchán proviene del cruzamiento (BI-1)2 como progenitor femenino, cuya resistencia deriva de Black (*Solanum tuberosum* x *Solanum demisum*) y la variedad Libertas (*Solanum tuberosum*) y el progenitor masculino Murillo III-80 que proviene del cruzamiento de dos cultivares nativos (*Solanum ajanhuiri* y *Solanum andigena*) que aportan tolerancia a heladas y resistencia de campo a la ranchara.

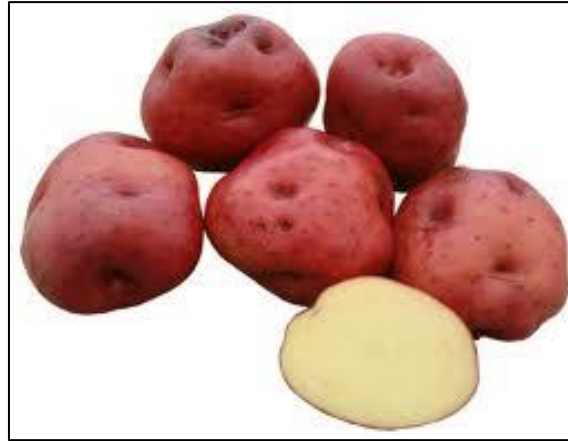


Figura 3: Tubérculos de papa Var. Canchán

- b) YUNGAY.-** Proviene del cruzamiento de (Saskia x Earline) x (Huagalina x Renacimiento) Desarrollada por: Carlos Ochoa (UNALM) y liberada en 1970. Posee una amplia adaptabilidad, en especial para cultivo de sierra alta, además de resistencia a rancho y tolerancia a rizoctoniasis.

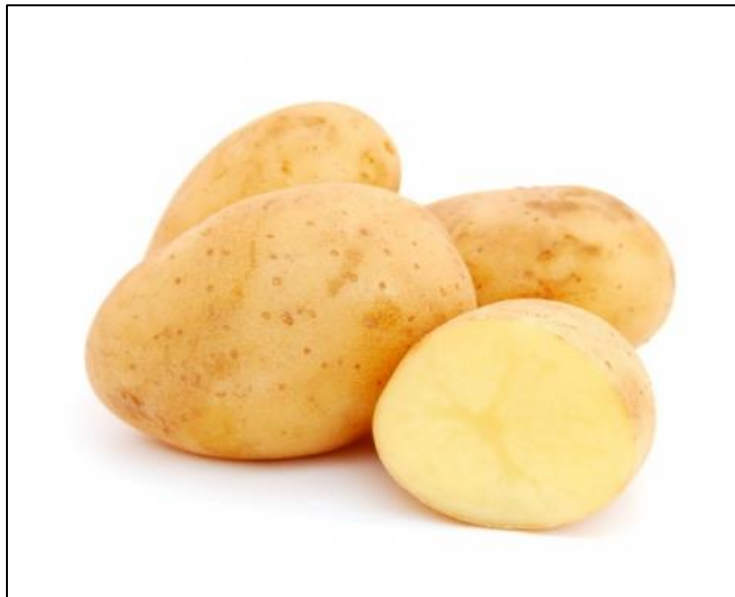


Figura 4: Tubérculos de papa Var. Yungay

- c) UNICA.-** Es una variedad que posee alta resistencia al PVY y al PVX, es tolerante a sequía, al calor, es moderadamente resistente al nematodo del nudo (*Meloidogyne ssp.*), es precoz y su rendimiento es estable en varias épocas de siembra, además posee una leve tolerancia a sales.

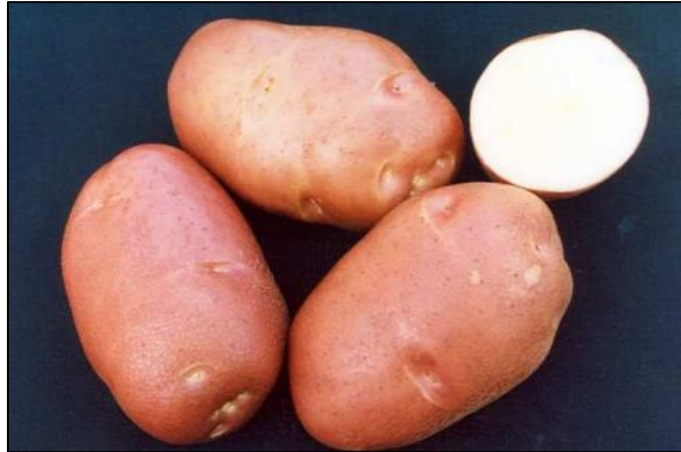


Figura 5: Tubérculos de papa Var. Unica

- d) **CAPIRO.-** Proviene de cruzamientos con Tuquerreña (CCC 61) x 1967 (C) (9) (CCC751). Liberada en 1968. Es susceptible a PYVV y Roña (*Spongospora subterranea*) y altamente susceptible a lanchar (*Phytophthora infestans*).



Figura 6: Tubérculos de papa Var. Capiro

- e) **PERUANITA.-** Pertenece a la subespecie andigena. Origen sur del Perú (Apurímac). Susceptible a verruga (*S. endobioticum*) roña (*Spongospora subterranea*) y nemátode del quiste. Tolera la ranchar, pero es susceptible a los golpes.



Figura 7: Tubérculos de papa Var. Peruanita

Material de vidrio: frascos de 250 ml, probetas graduadas de 100 ml, 1 y 2 L, pipetas de 10 ml, baguetas, Kitasatos de 500 ml.

Equipos: Balanza de precisión, agitador magnético, potenciómetro, autoclave, horno microondas, cámara de flujo laminar, sistemas de biorreactores, compresor de aire, estufa.

Reactivos: Ácido clorhídrico e hidróxido de sodio para ajustar el pH del medio, además de la lista de reactivos necesarios para la preparación del medio de cultivo (Anexo 1).

Otros: mangueras de silicona, hojas de bisturí, mangos y pinzas, papel aluminio, tapones de jebe con tubo de aluminio incorporado para tapar los matraces, filtros de 2 μ m, alcohol al 96 por ciento, hipoclorito de sodio y sellador hecho de stretch film.

3.2.2. Materiales de invernadero

Material vegetal: El material vegetal que se utilizó fueron: plántulas *in vitro* y microtubérculos de la variedad Canchan producido en el laboratorio del Área de cultivo

de tejidos del IBT y minitubérculos producidos en el invernadero del IBT – Área cultivo de tejidos en una campaña anterior.

Otros: Bandejas de 120 celdas, Premix 3, perlita, agua destilada, túneles de plástico, lápiz, bolsas de vivero, etiquetas de plástico.

3.3. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTO

3.3.1. En laboratorio:

Como material inicial se utilizó plántulas *in vitro* de papa de 21 días, de las siguientes variedades: Canchan, Capiro, Yungay, Unica y Peruanita.

3.3.1.1. Preparación del medio de cultivo:

Para la preparación del medio de cultivo se mezclaron todas las sales, vitaminas y azúcares que se describen en el Anexo 1, se ajustó el pH a 5.7 utilizando hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico a 1N.

Durante el experimento se preparan dos tipos de medio, el de Proliferación que contiene 30 gr de sacarosa y el de Tuberización que contiene 80 gr de sacarosa.

3.3.1.2. Preparación de los biorreactores:

Se desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio al 2% los Kitasato, mangueras de silicona y tapas, posteriormente se enjuagó tres veces con agua destilada y se procedió a armar los biorreactores.

Para la fase inicial (proliferación) en uno de los Kitasato se agregó 10 ml de medio de cultivo líquido (anexo 1) y en el otro 90 ml, se taparon los Kitasato y se esterilizaron los biorreactores en autoclave por 40 minutos a 121 °C y 1.5 lb de presión.

Para la fase de tuberización se prepararon Kitasato conectados a filtros hidrofóbicos y se agregó 100 ml de medio de tuberización, se taparon con un pedazo de papel aluminio y se esterizaron en autoclave por 40 minutos a 121 °C y 1.5 lb de presión.

3.3.1.3. Instalación del Sistema de Inmersión Temporal

a. Etapa de Proliferación

Se sembró en cada biorreactor un grupo de 6 segmentos con tres a cuatro nodos, se hermetizó el sistema y se instalaron en los estantes. Se mantuvo a un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad y a 24°C por cuatro semanas. (Figura 8).



Figura 8: Plántulas de papa en la fase de proliferación en Biorreactores

b. Tuberización

Cuando las plántulas cumplieron un mes en el sistema, en la cámara de flujo laminar, se cambió el medio de proliferación al de tuberización, cambiando el kitasato donde se depositaba el medio de cultivo, se hermetizó el sistema y se cubrió con una bolsa oscura el kitasato que contenía las plántulas para que estén en oscuridad, se instalaron en los estantes y se incubaron a 24°C por ocho semanas (Figura 9).

Después de las 8 semanas se apagó el sistema y se cosecharon los biorreactores.



Figura 9: Biorreactores en la fase de tuberización.

3.3.1.4. Experimentos:

a. Pre adaptación:

Se utilizaron para este experimento segmentos de tallo de 3 a 4 nodos de la variedad Canchán, fueron sembrados en el kitasato que contenía los 10 ml de medio de cultivo, se hermetizó el sistema y se instalaron en los estantes. Los biorreactores que correspondían al tratamiento de 0 días de pre adaptación se pusieron a funcionar en el mismo día de siembra, los que correspondían al tratamiento de 7 días de pre adaptación se pusieron a funcionar a los 7 días de siembra y los que correspondían al tratamiento de 14 días de pre adaptación, a los 14 días de siembra. A partir del día de inicio del funcionamiento del

sistema, se contaron las 4 semanas que pasarían en la etapa de proliferación. Pasado las 4 semanas se procedió con los pasos descritos en la etapa de tuberización

b. Comportamiento de las cinco variedades al Sistema de inmersión temporal:

Se utilizaron para este experimento segmentos de tallo de las variedades Canchán, Capiro, Yungay, Unica y Peruanita, se procedió con los pasos descritos en proliferación y tuberización descritos anteriormente. El sistema se puso a funcionar el mismo día que fueron sembrados los segmentos de tallo.

3.3.2. Ensayo en invernadero

a. Aclimatación de plántulas *in vitro*

En laboratorio se lavaron las plántulas *in vitro* con agua destilada, eliminando todo resto de agar, después se remojó en una solución de benomyl (1 gr/L) por 10 minutos y se enjuagó dos veces con agua destilada.

Posteriormente se llevaron las plántulas al invernadero en envases con agua destilada para evitar que se deshidraten, se sembraron las plántulas en bandejas de 200 celdas, poniendo una planta por celda y se colocó dentro de los túneles de plástico donde permanecieron por 15 días (Figura 10).

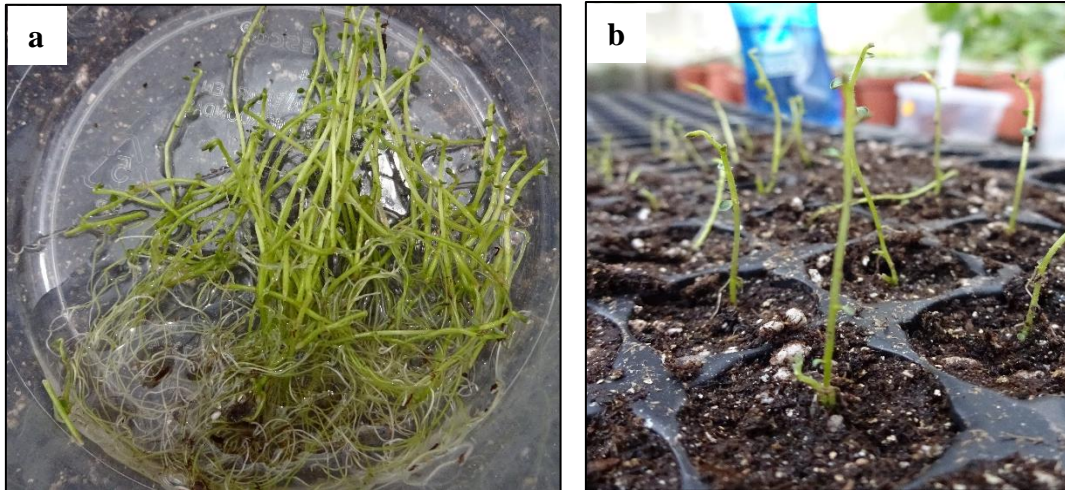


Figura 10: (a) Plántulas de papa in vitro listas para su aclimatación. (b) Plántulas de papa sembradas en bandeja para su aclimatación.

b. Transplante

Cumplido los 15 días después de la siembra, se trasladaron las plántulas a bolsas de 2 litros para vivero rellenas de sustrato hasta la mitad. Se colocó 2 plántulas en cada bolsa sin quitarle el sustrato de la bandeja para no dañar la raíz (Figura 11).

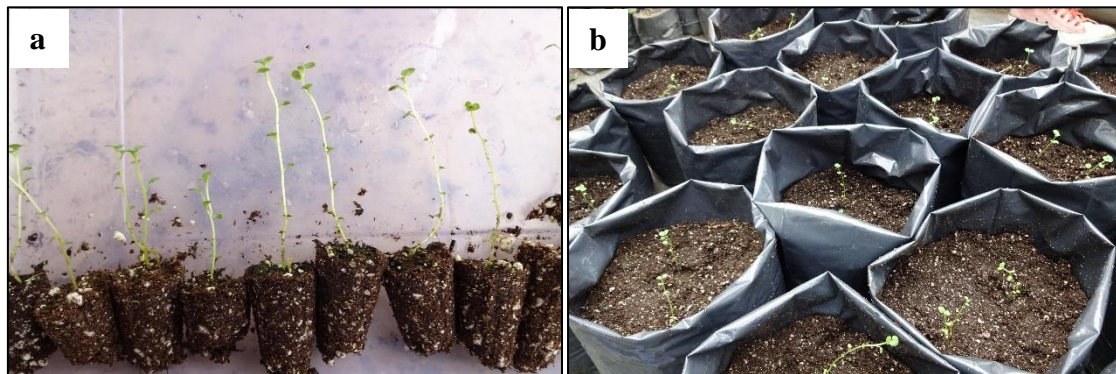


Figura 11: (a) Plántulas listas para el tranplante a bolsa. (b) Plántulas aclimatadas, transplantadas a bolsas.

En el caso de los microtubérculos y minitubérculos se sembraron directamente en las bolsas de 2 litros para vivero con el mismo tipo de sustrato, sembrando dos unidades en cada bolsa.

c. Aporque

El aporque se realizó a los 45 días después de la siembra, conjuntamente con la fertilización nitrogenada (Figura 12).



Figura 12: (a) Aporque de plantas. (b) Fertilizante nitrogenado.

d. Riegos

Es la labor más delicada, de ellos depende el éxito o fracaso de la producción. Al inicio los riegos se realizaron cada 2 o 3 días, para evitar la deshidratación excesiva del material experimental, en función de la humedad del sustrato. Posteriormente la frecuencia de los riegos fue más distanciada; el riego se realizó en las primeras horas de la mañana o en las últimas horas de la tarde.

e. Control fitosanitario

Se realizaron aplicaciones preventivas de benomyl, para evitar chupadera fungosa, además de lannate, phyton que evitaron o eliminaron las plagas o enfermedades que se pudieron presentar durante su desarrollo.

f. Colocación de tutores

Para este fin se colocó bastidores en las esquinas de la cama, donde se colocó rafia siguiendo el borde de la cama. Esta operación se realizó con el fin de evitar el acame de plantas debido a que el sustrato de las bolsas fue ligero.

g. Corte del follaje

Esta labor se realizó a nivel de cuello de planta a tres centímetros del sustrato, a los 120 días después del transplante.

h. Cosecha de la semilla pre-básica

Se realizó de forma manual a los 15 días después del corte del follaje. Los tuberculillos cosechados se colocaron en bandejas de plástico y bolsas de malla previamente identificadas para luego pesarlos, clasificarlos y almacenarlos.

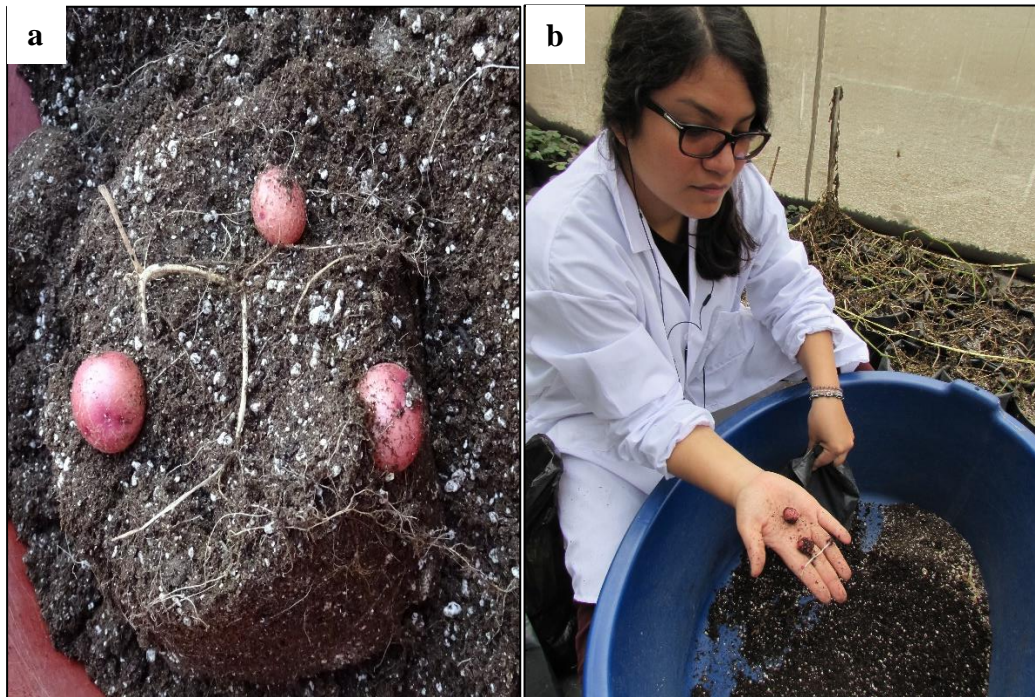


Figura 13: (a) Minitubérculos desarrollados en las bolsas. (b) Cosecha de papa.

3.4. SISTEMA DE EVALUACIÓN

3.4.1. Laboratorio:

Inmediatamente después de la cosecha de los microtubérculos se evaluó:

- Número de microtubérculos obtenidos por unidad experimental o biorreactor
- Peso fresco de cada microtubérculo
- Rendimiento por biorreactor

3.4.2. Invernadero:

3.4.2.1. Porcentaje de prendimiento

El prendimiento de las plántulas *in vitro* se evaluó a los 15 días después de la siembra. Se realizó por conteo y se consideró como “prendidos” aquellas que inician su crecimiento y desarrollo foliar.

3.4.2.2. Número de tubérculos por tratamiento

Se evaluó el número de tubérculos por repetición, además que se pesó cada tubérculo para finalmente obtener el rendimiento por bolsa (Figura 14).

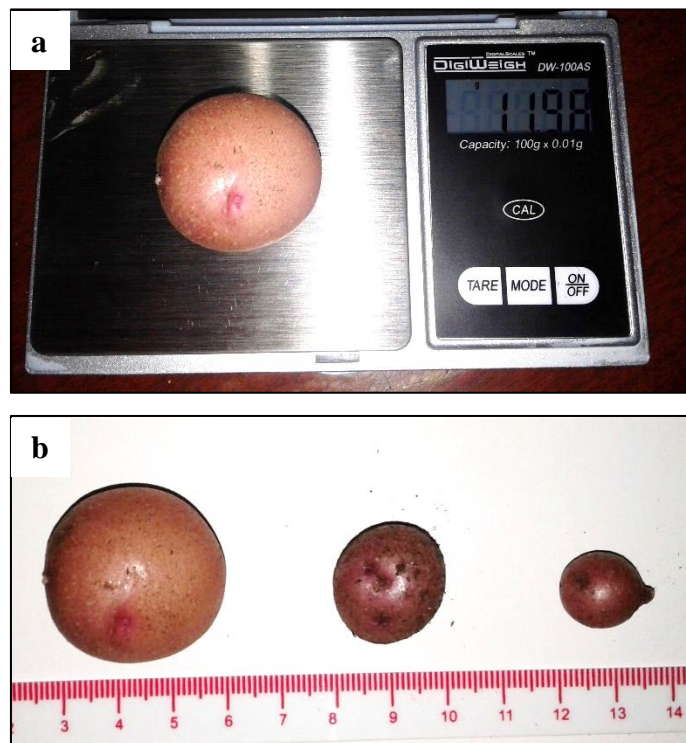


Figura 14: (a) Pesado de minituberculos. (b) Medición de minitubérculos.

3.5. FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

3.5.1. Experimento I: “Microtuberización *in vitro*”

Ho: La producción promedio de microtubérculos *in vitro* de las variedades trabajadas es la misma.

Ha: Al menos una de las variedades produjo una cantidad de microtubérculos diferente al promedio.

3.5.2. Experimento II: “Tuberización en invernadero”

Ho: El rendimiento promedio de tuberculillos en invernadero es la misma en los tres tipos de semilla.

Ha: El rendimiento promedio de un tipo de semilla fue diferente.

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.6.1. Experimento I: “Pre adaptación al Sistema de inmersión temporal”

Fuente de Variación	Grados de libertad
Tratamientos	2
Error experimental	12
Total	14

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} =Producción de microtubérculos de la i-ésimo tiempo de pre adaptación en el j-ésimo biorreactor

μ = Efecto de la producción promedio de microtubérculos

T_i =Efecto de i – ésimo tiempo de pre adaptación

E_{ij} =Error experimental obtenido al sembrar la i-ésimo tiempo de pre adaptación en el j-ésimo biorreactor.

3.6.2. Experimento II: “Comportamiento de 5 variedades de papa al Sistema de inmersión temporal”

Fuente de Variación	Grados de libertad
Tratamientos	4
Error experimental	20
Total	24

3.6.3. Experimento III: “Tuberización en invernadero” a partir de microtubérculo, plántula “*in vitro*” y minitubérculo

Fuente de Variación	Grados de libertad
Tratamientos	3
Error experimental	48
Total	51

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} =Producción de tuberculillos a partir de la i-ésimo tipo de semilla de papa en la j-ésima planta

μ =Efecto de la producción promedio de tuberculillos

T_i = Efecto del tipo de semilla.

E_{ij} =Error experimental obtenido al sembrar el i-ésimo tipo de semilla de papa en la j-ésima planta

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. MICROTUBERIZACIÓN EN BIORREACTORES.

Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

4.1.1. Pre adaptación de los segmentos de tallo al Sistema de inmersión temporal.

4.1.1.1. Por peso promedio de microtubérculos.

Tabla 2: Análisis de variancia de los pesos promedio de microtubérculo producido en cada tratamiento de pre adaptación al sistema de inmersión temporal ($\alpha=0.05$)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRA	2	0.6114227	0.3057113	0.5	0.6175 (ns)
Error	12	7.3087383	0.6090615		
Total	14	7.920161			

En la Tabla 2 se observa el análisis de variancia realizado a los pesos promedios de microtubérculo obtenido por biorreactor de cada tratamiento estudiado, con un nivel de significación mayor a 0.05 siendo no significativo las diferencias observadas entre los tratamientos de pre adaptación utilizando la prueba F. El coeficiente de variabilidad es de 109.96% siendo muy alto en un experimento de laboratorio, esto puede ser debido a que el desarrollo de los microtubérculos de los biorreactor/tratamiento no fue uniforme. Al realizar la corrección de datos, el coeficiente de variabilidad disminuye a 19.06%.

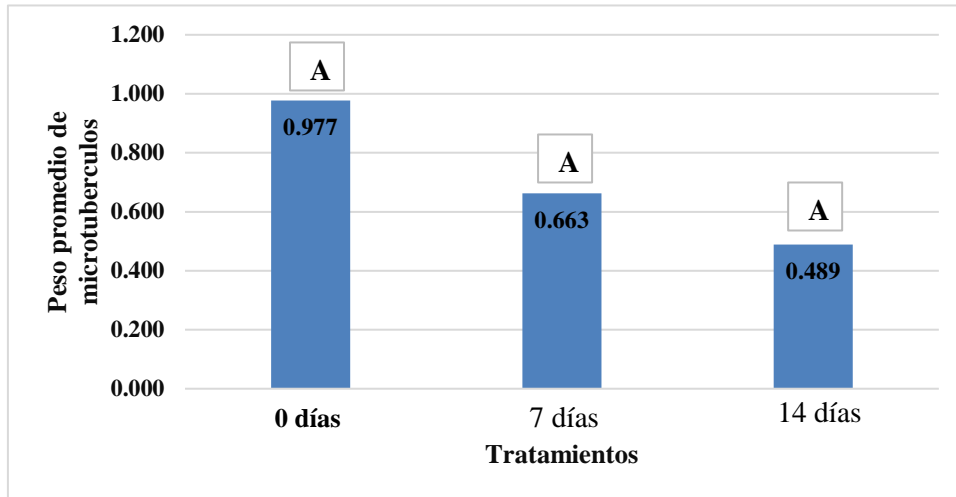


Figura 15: Prueba de comparación de medias del peso promedio de microtubérculo producido en cada tratamiento de pre adaptación al Sistema de inmersión temporal (Tukey $\alpha = 0.05$)

En la Figura 15 se observa que el peso promedio de los microtubérculos producidos en biorreactores en los tres tratamientos evaluados no tuvo diferencias significativas en la Prueba de Tukey con un nivel de significación del 5%, aunque destacaron los tratamientos 0 y 7 días que produjeron microtubérculos con un peso mayor a 0.5 gr, mínimo necesario para que se desarrolle normalmente campo, según Park, et al. (2009); Yu, et al. (2000); Lommen y Struik (1994); Struik and Lommen (1990). El tratamiento 0 días fue el que obtuvo mejores resultados, los cuales superan a los obtenidos por Pérez, et al. (2007) los que estudiaron la microtuberización en biorreactores en el cultivar “Atlantic” (2.745 g).

4.1.1.2. Masa fresca total de microtubérculos por biorreactor.

Tabla 3: Análisis de variancia del rendimiento de microtubérculos de masa fresca producido por biorreactor en cada tratamiento de pre adaptación al sistema de inmersión temporal ($\alpha=0.05$)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRA	2	37.261601	18.6308	3.88	0.0501 (n.s.)
Error	12	57.610574	4.8008811		
Total	14	94.872174			

En la Tabla 3 se observa el análisis de variancia de masa fresca de microtubérculos por biorreactor de cada tratamiento estudiado, con un nivel de significación mayor a 0.05 siendo no significativo las diferencias observadas entre los tratamientos de pre adaptación utilizando la prueba F. El coeficiente de variabilidad es de 33.11% siendo muy alto en un experimento de laboratorio, esto puede ser debido a que el desarrollo de los microtubérculos de los biorreactor/tratamiento no fue uniforme. Al realizar la corrección de datos, el coeficiente de variabilidad disminuye a 14.44%.

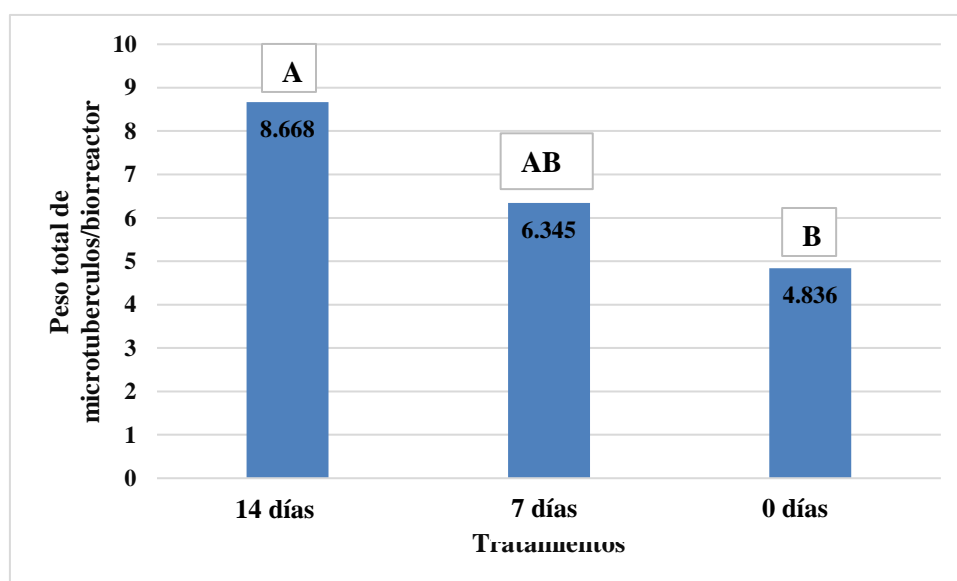


Figura 16: Prueba de comparación de medias del rendimiento de microtubérculos por peso producido por biorreactor en cada tratamiento de pre adaptación al Sistema de inmersión temporal (Tukey $\alpha =0.05$)

En la Figura 16 se observa que el peso total de microtubérculos producidos por biorreactor en los tres tratamientos evaluados presentaron diferencias significativas entre sus medias en la prueba de Tukey con un nivel de significación del 5%, destacando los brotes de 14 días con 8.668 gramos por biorreactor. Lo cual da por explante una producción de 1.44 gramos, el cual es un rendimiento menor en comparación a los obtenidos por Pérez, et al. (2007) en el cv. Atlantic, pero mayores a los obtenidos por Yu, et al. (2000) en el cultivar “Russet Burbank”.

4.1.1.3. Por número de microtubérculos por biorreactor.

Tabla 4: Análisis de variancia del rendimiento de microtubérculos por número de microtubérculos producido por biorreactor en cada tratamiento de pre adaptación al sistema de inmersión temporal ($\alpha=0.05$)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRA	2	235.6	117.8	6.97	0.0098 (*)
Error	12	202.8	16.9		
Total	14	438.4			

En la Tabla 4 se observa el análisis de variancia del rendimiento de microtubérculos por número de microtubérculos producido por biorreactor de cada tratamiento estudiado, con un nivel de significación mayor a 0.05 siendo significativo las diferencias observadas entre los tratamientos de pre adaptación utilizando la prueba F. El coeficiente de variabilidad es de 32.12% siendo muy alto en un experimento de laboratorio, esto puede ser debido a que el desarrollo de los microtubérculos de los biorreactor/tratamiento no fue uniforme. Al realizar la corrección de datos, el coeficiente de variabilidad disminuye a 18.22%.

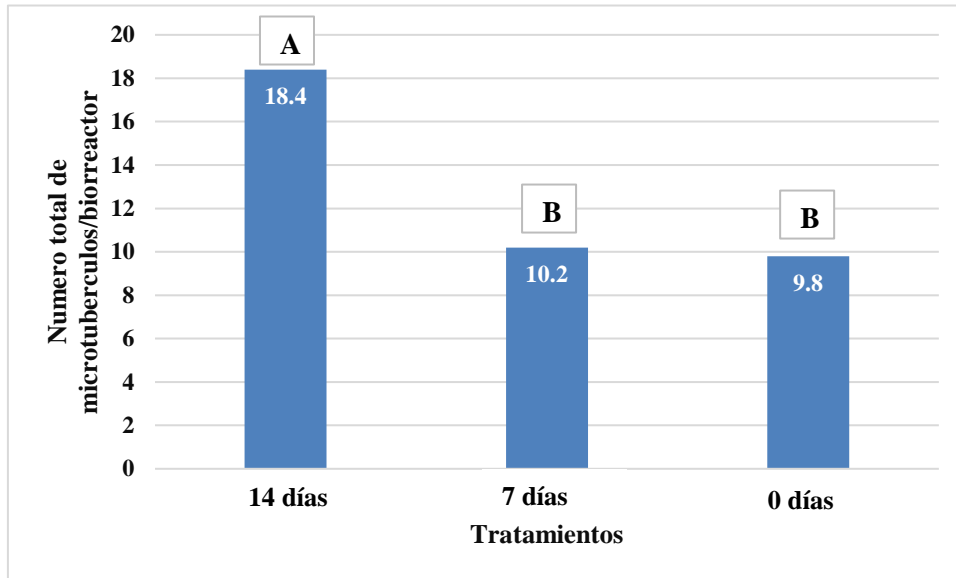


Figura 17: Prueba de comparación de medias del rendimiento de microtubérculos por número de microtubérculos producido por biorreactor en cada tratamiento de pre adaptación al Sistema de inmersión temporal (Tukey $\alpha = 0.05$)

En la Figura 17 se observa que el número de microtubérculos producido por biorreactor en los tres tratamientos evaluados presentan diferencias significativas entre sus medias, utilizando la prueba de Tukey con un nivel de significación del 5%, destacando con los mayores rendimientos los brotes de 14 días con un rendimiento promedio de 18.4 microtubérculos por biorreactor y 3.07 microtubérculos por explante los cuales concuerdan con los resultados obtenidos por Yu, et al. (2000) y Pérez, et al. (2007).

4.1.2. Comportamiento de cinco variedades al Sistema de inmersión temporal

4.1.2.1. Masa fresca promedio de microtubérculos.

Tabla 5: Análisis de variancia de la masa fresca promedio de microtubérculos producido por cada variedad en el sistema de inmersión temporal ($\alpha=0.05$)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
VAR	4	0.2434106	0.0608527	1.32	0.2975 (n.s.)
Error	20	0.9236102	0.0461805		
Total	24	1.1670208			

En la Tabla 5 se observa el análisis de variancia de la masa fresca promedio de microtubérculos producido por biorreactor de cada variedad estudiada, con un nivel de significación mayor a 0.05 siendo no significativo las diferencias observadas entre los tratamientos de pre adaptación utilizando la prueba F. El coeficiente de variabilidad es de 52.32% siendo muy alto en un experimento de laboratorio, esto puede ser debido a que el desarrollo de los microtubérculos de los biorreactor/variedad no fue uniforme. Al realizar la corrección de datos, el coeficiente de variabilidad disminuye a 7.46%.

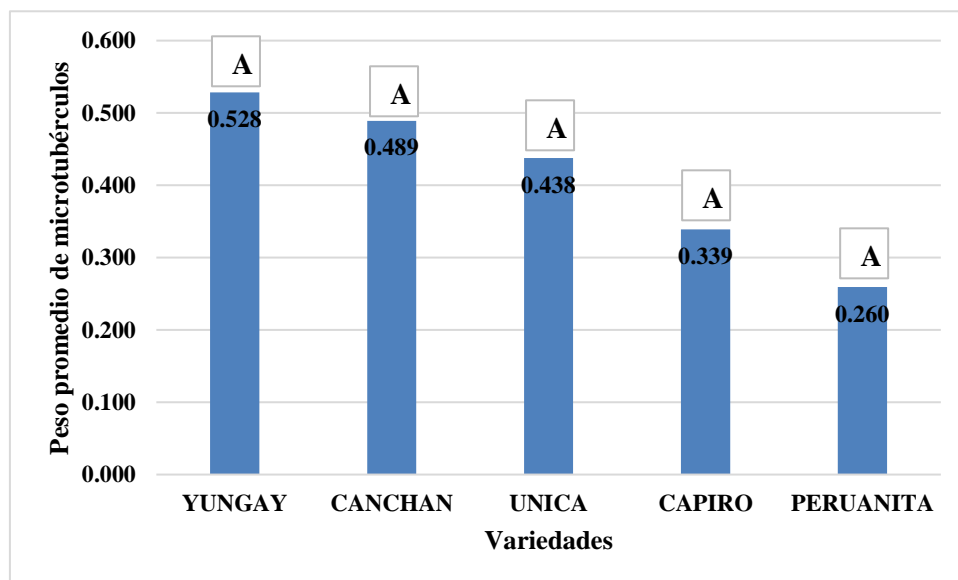


Figura 18: Prueba de comparación de medias del peso promedio de microtubérculos producido por cada variedad en el Sistema de inmersión temporal (Tukey $\alpha=0.05$)

En la Figura 18 se observa que el peso promedio de microtubérculos producido por biorreactor en las cinco variedades evaluadas no existe diferencias significativas entre sus medias, utilizando la prueba de Tukey con un nivel de significación del 5%, aunque la variedad “Yungay” obtuvo un peso promedio de 0.528 gr, el cual supera un poco al peso mínimo que deben tener los microtubérculos para su desarrollo en invernadero. Este peso es menor al obtenido por Yu, et al. (2000) en el cultivar “Russet Burbank” con 1.216 g, al obtenido por Pérez, et al. (2007) en el cv. Atlantic con 2.745 gr y lo que obtuvo Castro (2011) en las variedades Capiro (1.00 g) y Canchan (0.97 g).

Park et al. (2009) clasificaron los microtubérculos de papa del cultivar “Superior” en tres categorías: pequeño de 4.0 – 6.0 mm (0.18 g), mediano de 6.1 – 8.0 mm (0.29 g) y grande de 8.1 mm a más (0.54 g), basándonos en esta categorización los microtubérculos producidos en los biorreactores fueron en su mayoría de tamaño pequeño a mediano.

4.1.2.2. Por peso total de microtubérculos por biorreactor.

Tabla 6: Análisis de variancia del rendimiento de microtubérculos por peso producido por biorreactor en cada variedad en el sistema de inmersión temporal ($\alpha=0.05$)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
VAR	4	97.75416	24.43854	4.07	0.0142 (*)
Error	20	120.09927	6.0049634		
Total	24	217.85343			

En la Tabla 6 se observa el análisis de variancia del rendimiento de microtubérculos por peso producido por biorreactor de cada variedad estudiada, con un nivel de significación mayor a 0.05 siendo significativo las diferencias observadas entre las variedades utilizando la prueba F. El coeficiente de variabilidad es de 46.87% siendo muy alto en un experimento de laboratorio, esto puede ser debido a que el desarrollo de los microtubérculos de los biorreactor/variedad no fue uniforme. Al realizar la corrección de datos, el coeficiente de variabilidad disminuye a 21%.

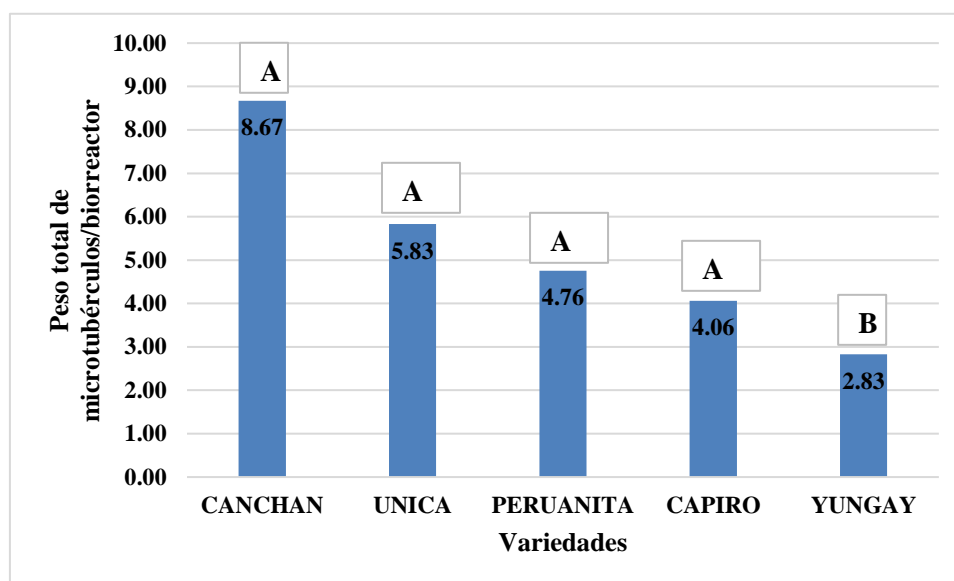


Figura 19: Prueba de comparación de medias del rendimiento de microtubérculos por peso producido por biorreactor/variedad en el Sistema de inmersión temporal (Tukey $\alpha = 0.05$)

En la Figura 19 se observa que la masa fresca de microtubérculos producido por biorreactor no existen diferencias significativas entre sus medias utilizando la prueba de Tukey con un nivel de significación del 5% en las variedades Canchan, Unica, Peruanita y Capiro, sí hubo diferencias significativas entre las variedades antes mencionadas y la variedad Yungay, siendo esta la de menor rendimiento con 2.83 gramos/biorreactor (Figura 20); esta masa fresca es menor al obtenido por Yu, et al. (2000) en el cultivar “Russet Burbank” con 60.8 g y 50 segmentos de tallo, al obtenido por Pérez, et al. (2007) en el cv. Atlantic con 164.7 gr y 60 segmentos de tallo en frascos de 4 litros y lo que obtuvo Castro (2011) en las variedades Capiro (70.5 g) y Canchan (66.9 g) con 50 segmentos de tallo.



Figura 20: Producción de microtubérculos de papa de la var. "Canchan"

4.1.2.3. Por número de microtubérculos por biorreactor.

Tabla 7: Análisis de variancia del rendimiento por número de microtubérculos producido por biorreactor en cada variedad en el sistema de inmersión temporal ($\alpha=0.05$)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
VAR	4	722.16	180.54	9.34	0.0002 (**)
Error	20	386.8	19.34		
Total	24	1108.96			

En la Tabla 7 se observa el análisis de variancia del rendimiento por número de microtubérculos producido por biorreactor de cada variedad estudiada, con un nivel de significación mayor a 0.05 siendo muy significativa las diferencias observadas entre las variedades utilizando la prueba F. El coeficiente de variabilidad es de 31.50% siendo muy alto en un experimento de laboratorio, esto puede ser debido a que el desarrollo de los

microtubérculos de los biorreactor/variedad no fue uniforme. Al realizar la corrección de datos, el coeficiente de variabilidad disminuye a 14.5%.

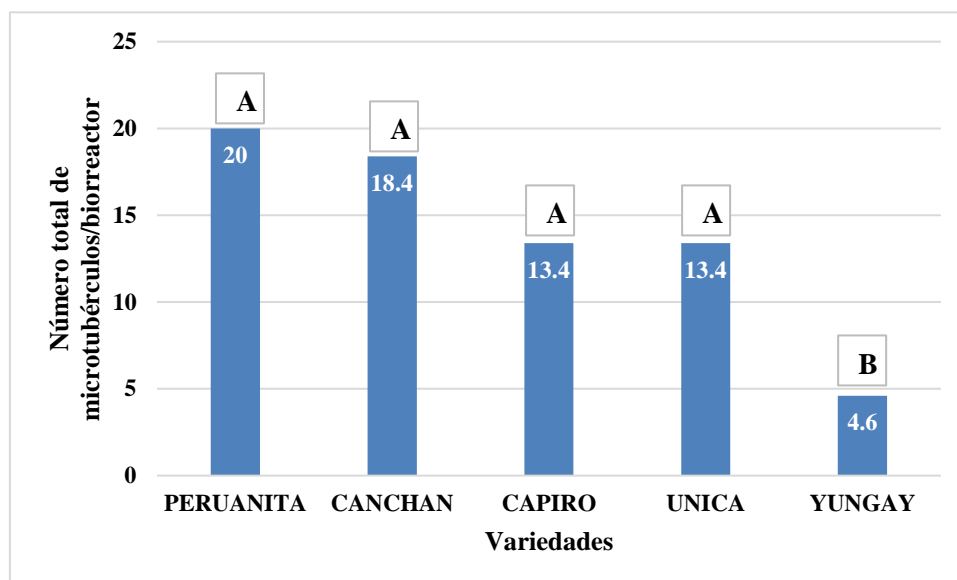


Figura 21: Prueba de comparación de medias del rendimiento por número de microtubérculos producido por biorreactor en cada variedad en el Sistema de inmersión temporal (Tukey $\alpha = 0.05$)

En la Figura 21 se observa que rendimiento de microtubérculos por número de microtubérculos producido por biorreactor en las cinco variedades estudiadas si existen diferencias significativas entre sus medias, utilizando la prueba de Tukey con un nivel de significación del 5%, destacando con los mayores rendimientos la variedad “Peruanita” con 20 microtubérculos/biorreactor en promedio, aunque no es significativo en comparación con lo obtenido en las variedades Canchán, Capiro y Unica (Figura 22); aunque si con la variedad “Yungay” con 4.6 microtubérculos/biorreactor, la de menor número de microtubérculos producidos. Este número es mayor al obtenido por Yu, et al. (2000) en el cultivar “Russet Burbank” con 175 microtubérculos y 50 segmentos de tallo, al obtenido por Pérez, et al. (2007) en el cv. Atlantic con 186 microtubérculos y 60 segmentos de tallo en frascos de 4 litros y lo que obtuvo Castro (2011) en las variedades Capiro (70.5 microtubérculos) y Canchan (69 microtubérculos) con 50 segmentos de tallo.



Figura 22: Microtubérculos de la var. "Peruanita"

Estas variaciones en la respuesta de las variedades de papa es debido a que la regeneración de las plantas *in vitro* en sistemas de inmersión temporal es dependiente de factores abióticos (temperatura, fotoperiodo, etc.) y bióticos, como la manipulación de los constituyentes orgánicos e inorgánicos del medio, tipo de explante y especie. También se sabe que las características morfológicas, organogénicas y nutricionales están determinadas por el genotipo, haciendo posible mejorar las investigaciones *in vitro*, al utilizar los genotipos más organogénicos, se aprovecha la variabilidad genotípica para la inducción de organogénesis *in vitro* (Casas et al., 1993). La regeneración completa desde el explante es a menudo específico a la especie, variedad, o incluso al genotipo introducido, la cual determina su capacidad de expresión morfogénica (Hansen et al., 1999; Ziv, 2000)

4.2. TUBERIZACIÓN EN INVERNADERO.

4.2.1. Por peso promedio de tubérculos.

Tabla 8: Análisis de variancia de la masa fresca promedio de minitubérculos producidos por los cuatro tipos de semilla ($\alpha=0.05$)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRA	3	424.81653	141.60551	12.83	<.0001 (**)
Error	48	529.95816	11.040795		
Total	51	954.77469			

En la Tabla 8 se observa el análisis de variancia de la masa fresca promedio de minitubérculos producidos por los tres tipos de semilla, con un nivel de significación mayor a 0.05 siendo muy significativa las diferencias observadas entre los tres tipos de semilla utilizando la prueba F. El coeficiente de variabilidad es de 48.96%. Al realizar la corrección de datos, el coeficiente de variabilidad disminuye a 21.9%.

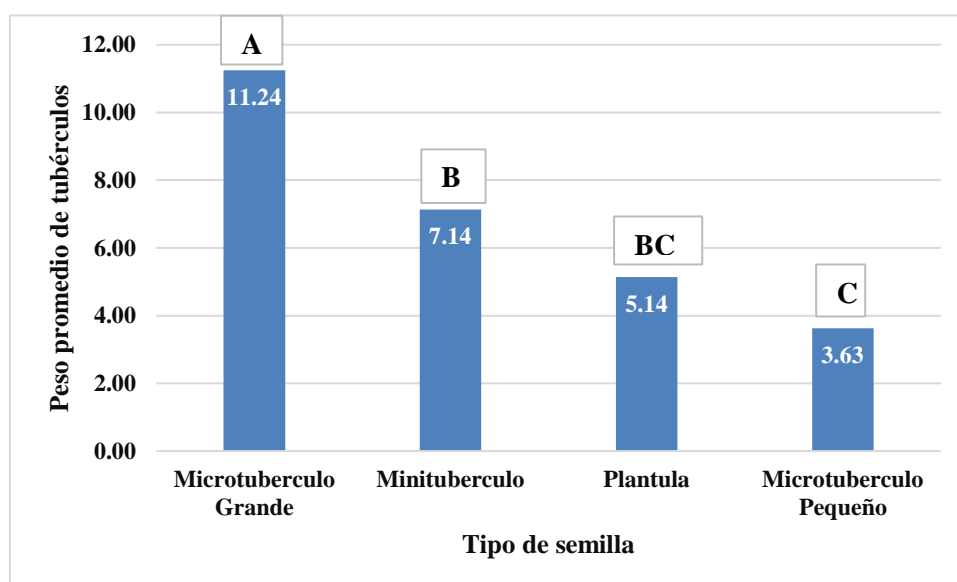


Figura 23: Prueba de comparación de medias del peso promedio de minitubérculos producidos por los cuatro tipos de semilla (Tukey $\alpha = 0.05$)

En la Figura 23 se observa que el peso promedio de minitubérculos producidos por los cuatro tipos de semilla en la variedad “Canchan” si existen diferencias significativas entre sus medias, utilizando la prueba de Tukey con un nivel de significación del 5%, destacando con el mayor peso promedio las semillas provenientes de los microtubérculos grandes con 11.24 gramos por minitubérculo en promedio; y con el menor peso promedio de minitubérculos (3.63 gramos) aquellos provenientes de semilla tipo microtubérculo pequeño.

Moeinil et al. (2011) estudiaron diferentes mezclas de sustrato para la producción de minituberculos de los cultivares “Agria” y “Marfona” a partir de plántulas *in vitro* y observaron que estos cultivares solo produjeron minituberculos en la mezcla de musgo con arena en la relación de 3:1, obteniendo un peso promedio de 4.82 g en “Agria” y 4.2 g en “Marfona”, comparándolos con la var. “Canchan” se logró un mayor peso promedio en la mezcla de sustrato de turba con perlita en la relación de 3:1, lo cual concuerda con lo obtenido por Sabzevar et al (2013) en el cultivar “Marfona” observando un peso promedio de 5.79 g, mejorando el peso promedio por el tipo de sustrato utilizado.

4.2.2. Masa fresca total de tubérculos.

Tabla 9: Análisis de variancia de la masa fresca de minitubérculos producidos por los cuatro tipos de semilla ($\alpha=0.05$)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRA	3	2673.5332	891.17774	5.83	0.0018 (*)
Error	48	7343.3785	152.98705		
Total	51	10016.912			

En la Tabla 9 se observa el análisis de variancia de la masa fresca total de minitubérculos producidos por los cuatro tipos de semilla, con un nivel de significación mayor a 0.05 siendo muy significativa las diferencias observadas entre los tres tipos de semilla utilizando la prueba F. El coeficiente de variabilidad es de 53.82%. Al realizar la corrección de datos, el coeficiente de variabilidad disminuye a 15.2%.

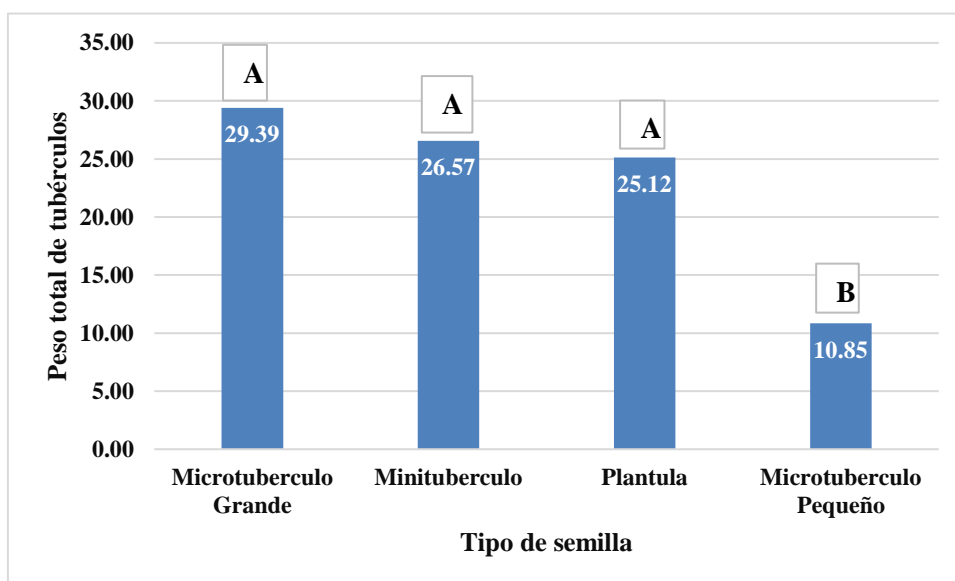


Figura 24: Prueba de comparación de medias de la masa fresca de minitubérculos producidos por los cuatro tipos de semilla (Tukey $\alpha = 0.05$)

En la Figura 24 se observa que la masa fresca de minitubérculos producidos por los cuatro tipos de semilla en la var. “Canchan” si existen diferencias significativas entre sus medias, utilizando la prueba de Tukey con un nivel de significación del 5%, destacando con el mayor rendimiento aquellas plantas provenientes de microtubérculos grandes con 29.39 gramos, aunque no difiere significativamente con lo obtenido por minitubérculos o plántulas, pero si con los microtubérculos pequeños (10.85 gramos).

Moeinil et al. (2011) observaron que el rendimiento del cultivar “Marfona” a partir de plántulas *in vitro* fue 18.6 g en una mezcla de musgo con arena en la relación de 3:1, en la var. “Canchan” se obtuvo un rendimiento de 25.12 g en la mezcla de sustrato de turba con perlita en la relación de 3:1, lo cual concuerda con lo obtenido por Sabzevar et al. (2013) en el cultivar “Marfona” con 34.54 g de rendimiento por planta. Demostrando la importancia de la mezcla utilizada en la tuberización en invernadero.

4.2.3. Por número total de tubérculos.

Tabla 10: Análisis de variancia del rendimiento por número de minitubérculos producidos por los cuatro tipos de semilla ($\alpha=0.05$)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRA	3	51.846154	17.282051	7.35	0.0004 (**)
Error	48	112.92308	2.3525641		
Total	51	164.76923			

En la Tabla 10 se observa el análisis de variancia del rendimiento total por número de minitubérculos producidos por los cuatro tipos de semilla, con un nivel de significación mayor a 0.05 siendo muy significativa las diferencias observadas entre los tres tipos de semilla utilizando la prueba F. El coeficiente de variabilidad es de 36.92%. Al realizar la corrección de datos, el coeficiente de variabilidad disminuye a 28.9%.

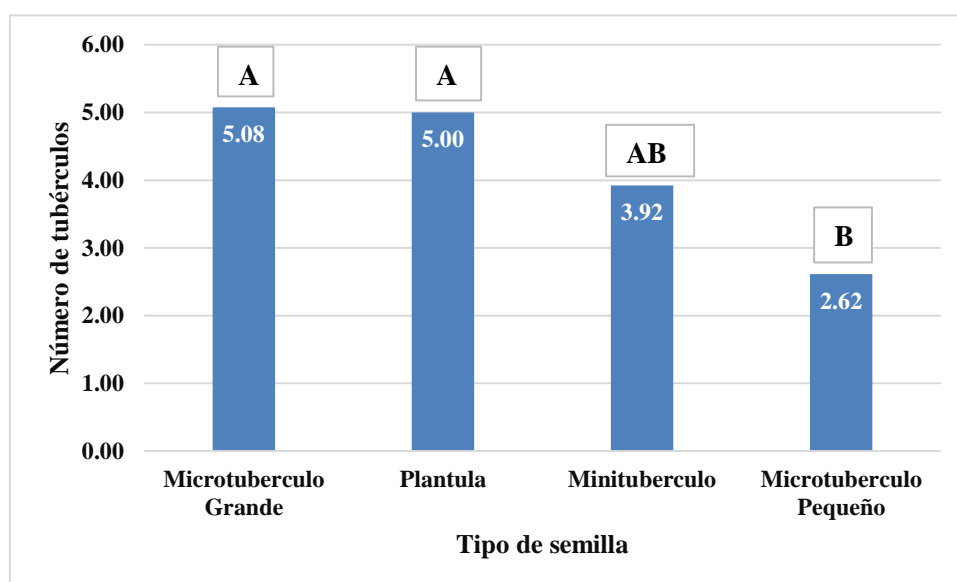


Figura 25: Prueba de comparación de medias del rendimiento por número de minitubérculos producidos por los tres tipos de semilla (Tukey $\alpha = 0.05$)

En la Figura 25 se observa que el rendimiento total por número de minitubérculos producidos por los cuatro tipos de semilla si existen diferencias significativas entre sus medias, utilizando la prueba de Tukey con un nivel de significación del 5%, destacando con el mayor rendimiento aquellas plantas provenientes de microtubérculos grandes con 5.08 minitubérculos/unidad experimental y con el menor rendimiento en aquellas plantas provenientes de microtubérculos pequeños (2.62 minitubérculos/unidad experimental).

Moeinil et al. (2011) observaron que el rendimiento del cultivar “Marfona” a partir de plántulas *in vitro* fue 4.5 minitubérculos en una mezcla de musgo con arena en la relación de 3:1, con la var. “Canchan” se obtuvo 5 minitubérculos en una mezcla de turba con perlita en la relación de 3:1, Sabzevar et al. (2013) en el cultivar “Marfona” obtuvo 5.9 minitubérculos por planta. Demostrando la importancia de la mezcla utilizada en la tuberización en invernadero.

V. CONCLUSIONES

La preadaptación de los esquejes de papa al sistema de inmersión temporal fue útil en la inducción de formación de microtubérculos de papa, siendo el pre tratamiento de 14 días el mejor, logrando un rendimiento mayor que cuando se siembran directamente, aunque el peso promedio disminuye drásticamente (aproximadamente el 50 por ciento), el cual es un factor importante para el desarrollo normal de la planta en invernadero.

El comportamiento de las variedades al sistema de inmersión temporal fue distinta en las variables evaluadas, de manera positiva la var. “Yungay” logró mayor peso promedio (0.528 g), la var. “Canchan” mayor rendimiento por biorreactor (8.67 g) y la var. “Peruanita” desarrolló mayor número de microtubérculos por biorreactor (20 microtubérculos). De manera negativa la var. “Peruanita” obtuvo menor peso promedio (0.26 g), la var. “Yungay” obtuvo menor rendimiento (2.83 g) y menor número de microtubérculos (4.6 microtubérculos) por biorreactor

En la fase de producción de minitubérculos en invernadero la semilla tipo microtubérculo grande (> 0.5 g) obtuvo mayor peso promedio de minitubérculos, mayor rendimiento por planta y mayor número de minitubérculos producidos por planta, siendo el sustrato una mezcla de turba con perlita en la relación de 3:1. El tipo de semilla que no respondió tan bien en invernadero fue el microtubérculo pequeño ($0.5 > p > 0.3$).

VI. RECOMENDACIONES

Realizar el experimento en envases diferentes, como frascos cuadrados que permitan el desarrollo normal de las plantas, ya que el kitasato obliga a los tallos juntarse en el cuello del envase, no permitiendo el desarrollo de tubérculos, además de no permitir un buen cubrimiento de los frascos en la fase de tuberización.

Realizar las evaluaciones en invernadero con las otras variedades en las zonas adecuadas, que permitan el buen desarrollo de las plantas y posteriormente la tuberización.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKITA, M. and OHTA, Y. 1998. A simple method for mass propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a bioreactor without forced aeration. *Plant Cell Reports*. 18(3-4):284-287.
2. AKITA, M. and TAKAYAMA S. 1994. Induction and development of potato tubers in a jar fermentor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 36(2): 117-182.
3. CASAS, A., KONONOWICZ, B., ZEHR, D., TOMES, J., AXTELL, L., BUTLER, G. and RBRESSAN, R. 1993. Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:11212-11216
4. CASTRO, A. 2011. Microtuberización in vitro de *Solanum tuberosum* L. "papa" de los cultivos Canchán y Capiro, en un sistema automatizado de inmersión temporal. *Tesis (Mag Sc)* 96 p. 18 cuadros, 5 fig., 82 ref. Impreso: Lima (Peru) UNALM 2011.
5. CASSELLS, A., KOWALSKI, B., FITZGERALD, D. and MURPHY, G. 1999. The use of image analysis to study developmental variation in micropropagated potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *Potato Research*. 42:541-548.
6. COLEMAN, W., DONNELLY, D. and COLEMAN, S. 2001. Potato Microtubers as Research Tool: A Review. *American Journal Potato Res*. 78: 47-55.
7. DEBABRATA S. and PRAKASH S. 1998. Effect of inorganic nitrogen nutrition on cytokinin-induced potato microtuber production *in vitro*. *Potato Research* 41:211-217.
8. DODDS, J. 1984. Tissue culture propagation of potatoes: Advantages and disadvantages'. p. 295-303. En: CIP. Innovative methods for propagating potatoes. Report of the xxvii Planning conference. Lima, Perú. 342 p.
9. EGUSQUIZA, R. La papa: producción, transformación y comercialización. Lima (Perú). Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) Asociación de Exportadores (ADEX) Prog. de Desarrollo Comunitario en Corredores Económicos (PRISMA) Proyecto Papa Andina CIP-COSUDE. 2000. 192 p.

10. ETIENNE, H. and BERTHOULY, M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*. 69: 215-231.
11. HANSEN, J., NIELSEN, B., and NIELSEN, S. (1999). *In vitro* shoot regeneration of *Solanum tuberosum* cultivars: interactions of medium composition and leaf, leaflet, and explant position. *Potato research*, 42(1), 141-151.
12. HULME, J., HIGGINS, E. and SHIELDS, R. 1992. An efficient genotype independent method for regeneration of potato from leaf tissue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 31: 161-167.
13. INIA. 2009. Resolución Jefatural N° 000166-2009-INIA, Normas para la producción, certificación y comercialización de semillas de algodón, arroz, leguminosas de grano, maíz, papa y cereales (trigo, cebada y avena).
14. JACKSON, S. 1999. Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiology* 119:1-8.
15. JIMÉNEZ, E., PÉREZ, N., DE FERIA, M., BARBÓN, R., CAPOTE, A., CHÁVEZ, M., QUIALA, E. and PÉREZ, J. 1999 improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 59(1): 19-23.
16. LAGO, C. 1990. Cultivo de tejidos para la producción de semilla básica de papa. *Fundamentos teóricos- prácticos del cultivo de tejidos vegetales*. Cadmo-Roselt y Victor M. Villalobos (Eds). Roma-Italia. pp.446-468.
17. LAM, S. 1975. Shoot formation in potato tuber disc in tissue culture. En: *American Potato Journal*. 52: 4 p. 103-106.
18. LOMMEN, W. and STRUIK, P. 1994. "Harvesting: Effects of crop husbandry on yield parameters". *Potato Research* 35: 419-432.
19. MEHROTRA, S., GOEL, M. K., KUKREJA, A. K., & MISHRA, B. N. 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology*, 6(13).
20. MOEINIL, M., ARMIN, M., ASGHARIPOUR, M., and YAZDI, S. 2011. Effects of different plant growth regulators and potting mixes on micro-propagation and mini-tuberization of potato plantlets. *Advances in Environmental Biology*, 631-639.
21. PAEK K., CHAKRABARTY D. and HAHN E. 2005. Application of birreactor for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81: 287-300.

22. PAEK K., HALN E., SON S. 2001. Application of birreactor for large scale micropropagation systems of plants. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 37: 149-157.
23. PARK, Y., RONIS, D., BOE, A. and CHENG, Z. 1995. Plant regeneration from leaf tissues of four North Dakota 1, genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). *American Potato Journal*. 72: 329-335.
24. PARK, S., JEON, J., KIM, H., HONG, S., ASWATH, C., and JOUNG, H. 2009. The effect of size and quality of potato microtubers on quality of seed potatoes in the cultivar 'Superior'. *Scientia horticulturae*, 120(1), 127-129.
25. PÉREZ, N., JIMÉNEZ, E., FERIA, M., CAPOTE, A., BARBÓN, R., QUIALA, E., CHÁVEZ, M. 2007. Potato microtubers using a temporary immersion system: Inoculum density, immersion time and field studies. *Biotec. Veg. Vol 7, Num. 3*. 149 – 154.
26. PIAO, X., CHAKRABARTY, D., HAHN, E. and PAEK, K. 2003. A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. *Current Science*. 84(8): 1129-1132.
27. POZO, M. 1997. Tuberización, tamaño de la semilla y corte de tubérculos. *Producción de Tubérculos-semillas de Papa. Manual de Capacitación Fasc. 2.3*. CIP.
28. PRUSKI, K., ASTARKIE, T., DUPLESSIS, P., LEWIS, T., NOWAK, J. and STRUIK, P. 2003. "Use of jasmonate for conditioning of potato plantlets and microtubers in greenhouse production on minitubers". *American Journal of Potato Research* 80: 183-193.
29. RANALLI, P. 1997. Innovative propagation methods used in seed tuber multiplication systems. *Potato Research* 40: 4539-453.
30. ROSS, H. 1986. Potato breeding: problems and perspectives. *J Plant Brees. Vol. 37 (suppl.)*
31. ROSU, R.; CHIRU, N. and ROLOT, J. 2004. Researches on genotype influence on potato microtuberization. *EAPR*, pp. 120-128.
32. SABZEVAR, R., MIRABDULBAGHI, M., ZARGHAMI, R. and SARDROOD, B. 2007. Mini-tuber production as affected by planting bed composition and node position in tissue cultured plantlet in two potato cultivars. *J. Agri. & Biol*, 9, 416-418.

33. SIMONTON, W., ROBACKER, C. and KRUEGER, S. 1991. A programmable micropropagation apparatus using cycled liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 27(2): 211-218.
34. STEAD, D. 1999. Bacterial diseases of potato: relevance to *in vitro* potato seed production. *Potato Research* 42: 449-456.
35. STRUIK, P. and LOMMEN, W. 1999. Improving the field performance of micro- and minitubers. *Potato Research*. 42: 559-568.
36. TEISSON, C. AND ALVARD, D. 1999. *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. *Potato Research*. 42: 449-504.
37. VASIL, I. and THROPE, T. 1994. *Plant cell and tissue culture*. Klumer Academic, 593p.
38. VREUGDENHIL, D. and SERGEEVA, L. I. 1999. Giberellins and tuberization in potato. *Potato Research* 42: 471-481.
39. WEBB, K.J., OSIFO, E.O. AND HENSHAW, G.G. 1983. Shoot regeneration from leaflet disc of six cultivars of potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*). *Plant Science Letters*. 30(1): 1-8.
40. WENZLER, H., MIGNERY, G., MAY, G. and PARK, W.A. 1989. Rapid and efficient transformation method for the production of large numbers of transgenic potato plants. *Plant Science* 63: 79-85.
41. WISAR, R. y ORTIZ, R. 1988. Mejoramiento de papa en el CIP por adaptación a climas cálidos tropicales. *Guía de investigación CIP* 22.
42. YU W., JOYCE P., CAMERON D. and MCCOWN B. 2000. Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. *Plant Cell Reports* 19:407-413.
43. ZIV, M. 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. *Horticultural Reviews*. 24: 1-30.
44. ZIV, M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants. *PlantCell, Tissue and Organ Culture* 81 (3): 277-285.

VIII. ANEXOS

8.1. ANEXO 1:

MS modificado para papa:

Sales	Peso (gr/l)
NH ₄ NO ₃	1.75
KNO ₃	2
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.45
KH ₂ PO ₄	0.175
H ₃ BO ₃	0.005
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.025
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.01
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.37
KI	0.001
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.00025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0000125
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0000125
Na ₂ EDTA	0.0373
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.0278

Vitaminas	Peso (mg/l)
Tiamina	0.4
Ac. Nicotínico	0.5
Piridoxina	0.5
Glicina	2
Myoinositol	100
Ac. Fólico	1
Arginina	4
Pantotenato de Ca	2

Medio de proliferación (agregar al medio base)

Sacarosa	30 gr/l
----------	---------

Medio de inducción de tuberización (agregar al medio base)

Sacarosa	80 gr/l
----------	---------

8.2. ANEXO 2

Glosario

- **Explante.-** Tejido vivo separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial de crecimiento. El nombre “explante” es una versión castellanizada del vocablo inglés “explant”; acuñado especialmente para identificar a los tejidos vegetales cultivados in vitro y sin otro significado.
- **Segmentos de tallo.-** Son porciones vegetativas de la planta, como los tallos modificados (rizomas, tubérculos, cormos y bulbos), las hojas o las raíces. Se pueden hacer diversos tipos de segmentos de tallo, que se clasifican de acuerdo con la parte de la planta de la cual proceden: Segmentos de tallo, Segmentos de hoja y Segmentos con hoja y yema. Para esta investigación se utilizaron segmentos de tallo a partir de tallos.
- **Sistema de Inmersión temporal.-** Para el presente trabajo se denominará de esa manera al conjunto de biorreactores que funcionan simultáneamente a razón de un periodo de inmersión/burbujeo y periodo de secado.
- **Biorreactor.-** Para el presente trabajo se considerará como unidad de estudio en el sistema de inmersión temporal, es donde se desarrollaran las plántulas (fase de proliferación) y los microtubérculos (fase de tuberización).
- **Microtubérculo.-** es el tubérculo producido en laboratorio ya sea en frascos con medio de cultivo semisólido o en medio de cultivo líquido, en la presente investigación se producirá en los biorreactores, los cuales utilizan medio de cultivo líquido.

- **Medio de cultivo.-** Es una técnica de laboratorio que consta de un gel o una solución que contiene los nutrientes necesarios para permitir el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas en condiciones favorables de pH y temperatura. En la presente investigación se hará uso de esta técnica para el desarrollo de plantas y microtubérculos.