

Universidad de San Carlos de Guatemala

Dirección General de Investigación

Programa Universitario de Investigación en Alimentación y Nutrición

INFORME FINAL

“Establecimiento de un protocolo para la propagación masiva de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* var. Loman) utilizando un sistema de inmersión temporal (SIT) en el laboratorio de cultivo de tejidos y células vegetales, en la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala”.

Equipo de investigación:

Coordinador

Carlos Alfonso Orozco Castillo PhD.

Investigadora

Inga. Agra. Paola Amarilis Cedillo Gámez

Auxiliar de Investigación II

Oscar Humberto Barrios Sánchez

Guatemala, 24 de noviembre de 2016

Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales

M.Sc. Gerardo Arroyo Catalán

Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Inga. Liuba María Cabrera de Villagrán
Nombre Coordinador del Programa de Investigación

Carlos Alfonso Orozco Castillo PhD.
Nombre del Coordinador del proyecto

Inga. Agra. Paola Amarilis Cedillo Gámez
Nombre del Investigador

Oscar Humberto Barrios Sánchez
Nombre del Auxiliar de Investigación II

Partida Presupuestaria

4.8.63.6.69

Año de ejecución: 2016

Índice

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Introducción | 4 |
| 2 | Marco teórico y estado del arte | 7 |
| 2.1 | Cultivo de papa en Guatemala | 7 |
| 2.2 | Importancia de la variedad Loman | 7 |
| 2.3 | Medios líquidos en cultivo in vitro | 8 |
| 2.4 | Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) | 8 |
| 2.5 | Ventajas de los SIT sobre la micropropagación convencional en medios de cultivo semisólidos | 9 |
| 2.6 | Fotoperiodo | 10 |
| 2.7 | Frecuencias y tiempo de inmersión | 10 |
| 2.8 | Vitrificación | 11 |
| 2.9 | Estado del arte | 12 |
| 3 | Materiales y métodos | 14 |
| 3.1 | Ubicación del área de estudio | 14 |
| 3.1.1 | Ubicación de áreas de colecta | 14 |
| 3.1.2 | Ubicación del área de experimentación | 15 |
| 3.1.3 | Materiales de Laboratorio | 15 |
| 3.1.4 | Equipos de Laboratorio | 16 |
| 3.1.5 | Reactivos | 16 |
| 3.1.6 | Materiales y equipos de oficina | 17 |
| 3.1.7 | Esterilización de materiales y limpieza de equipo | 17 |
| 3.2 | Establecimiento de ápices meristemáticos | 17 |
| 3.2.1 | Preparación y desinfección del material vegetativo | 17 |
| 3.2.2 | Fase de establecimiento | 18 |
| 3.2.3 | Fase de multiplicación | 18 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.2.4 | Fase de tuberización | 19 |
| 3.2.5 | Operatización de las variables..... | 20 |
| 3.2.6 | Tratamientos | 22 |
| 4 | Resultados | 23 |
| 4.1 | Matriz de resultados..... | 23 |
| 4.2 | Impacto esperado | 26 |
| 5 | Análisis y discusión de resultados..... | 26 |
| 5.1 | Numero de microtubérculos..... | 26 |
| 5.2 | Numero de vitrificados. | 27 |
| 5.3 | Peso fresco de microtubérculos | 28 |
| 6 | Conclusiones | 28 |
| 7 | Referencias..... | 29 |
| 8 | Apéndice..... | 32 |
| 9 | Actividades de gestión, vinculación y divulgación..... | 39 |

Índice de figuras

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1. | Mapa representativo de las zonas de muestreo efectuados en el departamento de Quetzaltenango. | 14 |
| Figura 2. | Peso fresco de microtubérculos de papa por tratamiento..... | 23 |
| Figura 3. | Numero de microtubérculos obtenidos por tratamiento..... | 24 |
| Figura 4. | Número de microtubérculos vitrificados por tratamiento. | 25 |
| Figura 5. | Semilla de papa con meristemos colectados en San Mateo, Quetzaltenango. 32 | |
| Figura 6. | Colecta de meristemos de papa, La Esperanza, Quetzaltenango. | 32 |
| Figura 7. | Meristemos de papa obtenidos de las semillas..... | 33 |
| Figura 8. | Siembra de meristemos de papa en medio MS solido..... | 33 |
| Figura 9. | Exposición a la luz de los meristemos del segundo bloque de plantas madre. 34 | |
| Figura 10. | Meristemos de papa utilizados en el bloque de plantas madre. | 34 |
| Figura 11. | Microtubérculos obtenidos de los bloques de plantas madre..... | 35 |
| Figura 12. | Colecta de microtubérculos a partir de bloques madre de plántulas de papa.35 | |

| | |
|--|----|
| Figura 13. Esterilización de los recipientes RITA..... | 35 |
| Figura 14. Recipientes RITA® con meristemos de papa. | 36 |
| Figura 15. Recipiente RITA® con meristemos de papa..... | 36 |
| Figura 16. Explantes de papa sumergidos en medio de cultivo..... | 37 |
| Figura 17. Microtubérculos de papa obtenidos del RITA® | 37 |
| Figura 18. Microtubérculos de papa obtenidos de los RITA® | 38 |
| Figura 19. Peso fresco de microtubérculos de papa | 38 |

Índice de cuadros

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Reactivos utilizados en la elaboración de medio para tuberización de los explantes. | 19 |
| Cuadro 2. Tratamientos evaluados en la micropropagación de tubérculos de papa variedad Loman, RITA®. | 22 |
| Cuadro 3. Prueba múltiple de medias para la variable peso fresco. | 23 |
| Cuadro 4. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable no paramétrica número de microtubérculos. | 24 |
| Cuadro 5. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable no paramétrica microtubérculos vitrificados. | 25 |

Título del proyecto

“Establecimiento de un protocolo para la propagación masiva de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* var. Loman) utilizando un sistema de inmersión temporal (SIT) en el laboratorio de cultivo de tejidos y células vegetales, en la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala”.

Resumen

La papa está entre los nueve cultivos prioritarios en el país, se cosecharon 1.1 millones de toneladas aportando al PIB agrícola 0.80% creando empleo directo en campo de 3, 301,888 jornales/año, esto es equivalente a 11, 792 empleos permanentes. La variedad Loman es la que más que se cultiva en el país con rendimientos que van desde 20 a 30 t/ha en alturas comprendidas entre los 2,390 msnm hasta 3,500 msnm (Azurdia, C., 2014). Dada la importancia que tiene el cultivo en Guatemala es necesario brindar al agricultor semilla con alta calidad fitosanitaria (libre de patógenos).

El uso de los RITA[®] ayudo a la producción de microtubérculos de papa obteniendo 4.17 microtubérculos con 2.32 g de peso fresco en promedio siendo el tratamiento cinco el mejor a una frecuencia de inmersión de tres minutos en intervalos de diez horas y un fotoperiodo de catorce horas de luz y diez horas de oscuridad con una intensidad de lumínica de 2000 lux, el fotoperiodo afectó la microtuberización bajo diez horas luz produciendo un mayor número de microtubérculos pero bajo dieciséis horas luz se incrementó el peso y tamaño de los mismos; para la variable microtubérculos vitrificados el tratamiento dos fue el que más obtuvo con un total de 54 microtubérculos, la causa es la frecuencia de inmersión tres minutos en intervalos de tres horas dado que la vitrificación o hiperhidricidad es un es un desorden fisiológico causado por grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de los tejidos.

Palabras clave: biotecnología, in vitro, RITA[®], yemas axilares, explantes

Abstract

The potato is among nine priority crops in the country, been harvested 1.1 million ton, contributing with 0.80% of the GDP and creating 3301888 wages/year, this is equivalent to 11972 permanent jobs. The Loman variety is the most cultivated in the country, with yield ranging from 20 to 30 ton/ha in altitudes between 2390 to 3500 masl. (Azurdia, 2014). Due to the importance of the potato in Guatemala it is necessary to provide the farmers with seeds of high phytosanitary quality.

The results of using RITA® to produce potato microtubercles showed that treatment number five was more efficient, obtaining 4.17 microtubercles with an average fresh weight of 2.32 grams. This treatment consisted of a three minutes immersion frequency in ten hours intervals and a photoperiod of fourteen hours light and ten hours of darkness and a luminic intensity of 2000 lux. The ten hour photoperiod affected the microtuberization producing more microtubercles but under sixteen hours of light the size and weight increased. Treatment number two showed more vitrified microtubercles, with a total of 54, this was caused by the immersion frequency of three minutes and three hours intervals. The vitrification or hiperhidricity is a fisiological disorder caused by large amounts of residual water in the apoplastic tissues.

1 Introducción

La papa *Solanum tuberosum*, es originaria de América del sur, en las cercanías del lago Titicaca que está a 3,800 msnm, en la cordillera de los Andes, en la frontera de Bolivia y Perú. (FAO, 2008), es uno de los tres cultivos de mayor importancia a nivel mundial.

En Guatemala las montañas del centro y occidente poseen condiciones óptimas para el cultivo de la papa, en alturas de 1500 a 2800 msnm, con temperaturas desde los 7° a los 25°. Debido a los factores favorables de producción, Guatemala es el principal productor de América central, de acuerdo a El Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, en el documento “El Agro en Cifras”, edición 2014; en Guatemala se producen 11, 576,900 quintales en un área aproximada de 30,100 manzanas, la producción nacional genera 3,546,200 empleos directos en el campo al año y 12,665 empleos permanentes. (MAGA, 2013), la papa que se produce en el país es vendida mayormente en zonas urbanas y para la exportación a países vecinos. Sin embargo, la falta de material certificado de siembra y la fragmentación de las cadenas de suministro limitan el potencial productivo de papa en Guatemala.

La propagación convencional por medio de tubérculos, tiene algunas desventajas como la transmisión de enfermedades virales y bacterianas, costos por transportes de tubérculos pesados y voluminosos, y brotes de tubérculos antes de la temporada de la plantación (Oropeza, 2012).

El uso de la biotecnología permite reducir las limitantes del potencial productivo de papa, debido a que los microtubérculos se obtienen de forma aséptica en medios de cultivo definidos y en un ambiente controlado. Adicionalmente, el uso de microtubérculos como herramientas de investigación experimental tiene potencial en las áreas del metabolismo de plantas, evaluación y selección de germoplasma, transformación genética, hibridación somática y biología molecular (Coleman et al., 2001).

Atendiendo a los requerimientos de mayor disponibilidad de nutrientes en el cultivo in vitro utilizando medios líquidos, se implementó el uso de recipientes especiales llamados sistemas de inmersión temporal, estos se basan en la inmersión temporal de los explantes en el medio de cultivo (Aitken-Christie, 1991), solo durante unos minutos con determinada frecuencia diaria o mediante burbujeo, evitan la inmersión continua del

material vegetal en el medio de cultivo, proveen una adecuada transferencia de oxígeno, facilitan los cambios secuenciales y automatizados del medio de cultivo, reducen la contaminación microbiana y tienen bajo costo de producción (Teisson, C., Alvard, D. 1999)

El objetivo de la presente investigación fue la elaboración de un protocolo que nos permitiera la propagación masiva de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* var. Loman), mediante el uso de sistemas de inmersión temporal, dentro de estos sistemas se encuentran los recipientes de inmersión temporal automatizado o RITA[®], los factores evaluados fueron el fotoperiodo y la frecuencia de inmersión en la etapa de tuberización, periodo en el cual permanecieron en los RITA[®], la sacarosa se utilizó como inductor de tuberización ya que actúa como inductora de varios genes que controlan la producción de tubérculos (Xu, et al., 1998).

Las variables no paramétricas evaluadas fueron número de microtubérculos y número de vitrificados, para las cuales se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, con un $\alpha=0.05$, de acuerdo a los resultados de la prueba, el fotoperiodo y la frecuencia de inmersión si tienen una influencia significativa en la formación de microtubérculos, el mayor número de microtubérculos se obtuvo en los tratamientos cinco y seis con una media de 4.17 y 3.75 microtubérculos respectivamente, para la variable vitrificación, el tratamiento que presentó menor número de vitrificados fue el tratamiento cinco, con una frecuencia de inmersión de tres minutos en intervalos de diez horas y un fotoperiodo de catorce horas luz y diez horas sin luz, en este tratamiento se contabilizó el menor número de vitrificados y la mayor cantidad de microtubérculos.

Para la variable peso fresco se realizó la prueba de Duncan con un $\alpha=0.05$ en relación a los resultados de mayor número de microtubérculos en el tratamiento cinco, se esperaba que el peso fresco de los frascos que correspondían al tratamiento fuese mayor que otros tratamientos, la media fue de 2.32 gr por recipiente, 0.75gr más que el segundo mejor tratamiento, se observó que los tratamientos con mejor respuesta fueron los que se sometieron a periodos más cortos de inmersión en intervalos más amplios, en exposiciones de luz más cortas. De acuerdo a (Lugo G., 2000) el fotoperiodo afecta la microtuberización, en el periodo de 14 horas luz y 10 horas oscuridad, se produce un mayor número de microtubérculos, mientras que en el periodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, se incrementa el peso y tamaño de los mismos.

Objetivos

General

Elaborar un protocolo para el establecimiento in vitro de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* var. Loman) para su propagación masiva a través de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT).

Específicos

Producir microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* var. Loman) a partir del uso de Sistemas de Inmersión Temporal.

Evaluar la influencia del fotoperiodo y frecuencia de inmersión en la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* var. Loman) utilizando el Sistema de Inmersión Temporal.

Hipótesis

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) mostrará resultados positivos en la propagación masiva de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L. var Loman).

La frecuencia de inmersión y el fotoperiodo influirán de manera significativa en la formación de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L. var Loman).

2 Marco teórico y estado del arte

2.1 Cultivo de papa en Guatemala

Según la encuesta nacional agropecuaria hecha en el 2013 por el MAGA prioriza nueve cultivos y entre los cuales se encuentra la papa entre los cultivos prioritarios. Entre mayo y diciembre de 2013 a nivel nacional se cosecharon 0.97 millones de quintales de papa, con una superficie cultivada de 3, 803 hectáreas, generando 11 millones de quintales aportando al PIB agrícola 0.80% generando empleo directo en campo de 3, 301,888 jornales/año, esto es equivalente a 11, 792 empleos permanentes. En Guatemala, el cultivo de la papa se realiza en áreas con temperaturas templadas, preferentemente menores a los 20°C. En este tipo de clima la papa se desarrolla adecuadamente y se obtiene mejor productividad, el 88.9% de la superficie cosechada se encuentra concentrada en 6 departamento: Huehuetenango 29.1%, San Marcos 24%, Quetzaltenango 21.7%, Guatemala 5.6%, Jalapa 4.7% y Sololá 3.8%. En el ciclo del cultivo en Guatemala, oscila entre los 70 – 100 días y las principales variedades sembradas son la Loman, la Tollocan y la Atzimba. La variedad Loman se caracteriza por tener una forma alargada y es de color blanco, (MAGA 2013).

La papa se ha convertido en un cultivo comercial valioso para los pequeños productores, que la cultivan principalmente para la venta a las zonas urbanas y para exportar a los países contiguos. Sin embargo, la falta de material certificado de siembra y la fragmentación de las cadenas de suministro limitan el potencial productivo de papa de Guatemala. La enfermedad conocida como pudrición bacteriana; las plagas del suelo; insectos como las chicharritas, la mosca minadora, la polilla y pulguilla de la papa; enfermedades como el tizón tardío y la marchites bacteriana; y afecciones viróticas como el mosaico de la hoja (virus X), el mosaico rugoso (virus Y) y el enrollamiento de la hoja (virus PLRV)

2.2 Importancia de la variedad Loman

Es la variedad más cultivada en Guatemala, las características de la planta son tallos y hojas de color verde oscuro. Su altura de planta varía desde 20-30 cm en alturas de 3,500 msnm a 60-65 cm en alturas de 2,390 msnm. En condiciones de campo no produce flores o algunas veces pocas. La forma del tubérculo puede variar de oblongo

alargado ha alargado. La pulpa y piel es de color crema, susceptible a Tizón Tardío. Su ciclo vegetativo varía de 80-90 días (2,390 msnm) a 120 días (3,500 msnm). A 2,390 msnm presenta 18.8 % de sólidos y 13.2 % de almidón. De acuerdo a su uso, se caracteriza por ser excelente para papas hervidas y puré; de regular a buena para papalinas y enlatado. Presenta una textura cerosa. Los rendimientos pueden variar de 20 a 30 t/ha (3,500 msnm) a 20-30 t/ha (2,390 msnm). (Azurdia, C., 2014).

2.3 Medios líquidos en cultivo in vitro

El empleo de los medios de cultivo líquidos en el cultivo in vitro es un aspecto primordial en la automatización de la micropropagación y en el desarrollo de técnicas para la producción a gran escala. Sin embargo, provocan un efecto depresivo sobre el crecimiento del tejido en el cultivo in vitro, que conduce a la hiperhidricidad de los tejidos, por esto en el mundo se han desarrollado varias estrategias encaminadas a reducir estas desventajas, así como los costos de producción. Una de ellas ha sido el diseño de nuevos modelos de biorreactores y sistemas automatizados empleando medios de cultivo líquidos (Pérez, N., 2001)

2.4 Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)

Para el cultivo de plantas con medio de cultivo líquido, se han diseñado equipos y sistemas de cultivo que posibilitan su uso en la propagación masiva, estos sistemas reducen la intervención del hombre en la producción. Estos sistemas se basan en la inmersión temporal de los explantes en el medio de cultivo, solo durante unos minutos con determinada frecuencia diaria o mediante burbujeo, (Igarza Castro, J., Agramonte, D., Alvarado-Capó, Y., de Feria, M., y Pugh, T., 2012).

Los sistemas de inmersión temporal, evitan la inmersión continua del material vegetal en el medio de cultivo, lo que permite una adecuada transferencia de oxígeno, facilitan los cambios secuenciales y automatizados del medio de cultivo, reducen la contaminación microbiana, tienen bajo costo, lo cual facilita el desarrollo de los procesos a gran escala, generan un aumento en la productividad del material propagado (Berthouly y Etienne, 2002).

El uso del SIT, constituye una tecnología accesible que permite automatizar de forma parcial, algunas etapas del cultivo in vitro, aumentando la eficiencia biológica y productiva del material propagado, sin los efectos colaterales causados por los medios de cultivo estáticos, conocidos como hiperhidricidad e hipoxia, el uso de estos sistemas aumentan la eficiencia biológica y productiva del material propagado (Jiménez et al., 1999).

2.5 Ventajas de los SIT sobre la micropropagación convencional en medios de cultivo semisólidos

Entre las ventajas que presenta el uso de SIT sobre los medios de cultivo semisólidos están

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

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

Se plantea, además, que en este tipo de sistema de cultivo las condiciones de renovación periódica de la atmósfera interna del frasco de cultivo logran en las plantas cultivadas una mejor relación entre la fotosíntesis y la transpiración, lo cual permite una mayor asimilación de nutrientes del medio de cultivo para su crecimiento (Escalona, 2006). La estrategia de adaptación de las plantas a las condiciones de los Sistemas de Inmersión Temporal es una combinación de características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas que permiten un uso más eficaz de los recursos del medio interno en el recipiente de cultivo (Aragón et al., 2004; Escalona, 2006).

2.6 Fotoperiodo

La papa es una planta de día corto. En su lugar de origen, el acortamiento de los días es la señal que anuncia la llegada del período frío, inadecuado para el crecimiento. Ante este estímulo la planta inicia la formación de sus órganos de almacenamiento y resistencia, estos son los tubérculos.

El acortamiento de los días o fotoperiodo corto es un factor que estimula o acelera la entrada a la tuberización de la mayoría de variedades, pero no determina este proceso, por lo que se puede decir que este es un proceso cuya respuesta es cuantitativa (Piedra, M., 2014)

2.7 Frecuencias y tiempo de inmersión

La frecuencia y tiempo de inmersión son muy importantes, puesto que, regulan la absorción de nutrientes y la expresión de hiperhidratación (Berthouly et al., 2005). Además, el contacto intermitente del medio de cultivo con los explantes reduce el nivel de toxinas presentes, ya que se mantienen limpias de sus propios exudados que pueden ser perjudiciales para su crecimiento (Cruzat, 2009).

Para evitar la hiperhidratación de varias especies deben usarse tiempos cortos y frecuencias espaciadas de inmersión, ya que el contacto continuo de los tejidos con el medio de cultivo líquido es fuente de hiperhidratación (Etienne et al., 2002).

Los tiempos de exposición utilizados para el trabajo varían considerablemente. Esto es probablemente debido a la gran variedad de especies, los procesos de micropropagación y los Sistemas de Inmersión Temporal utilizados. Los largos tiempos

de inmersión (1 hora cada 6 horas) demostraron ser eficaces para la tuberización de papa, mientras que los tiempos de exposición muy cortos (1 minuto cada 12 horas) estimula la producción de embriones somáticos en el café y el caucho (Berthouly, et al., 2005).

2.8 Vitrificación

La hiperhidricidad, ha sido descrita como un severo desorden fisiológico, causado por la presencia de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de los tejidos y afecta tanto a las plantas herbáceas como a las leñosas durante su propagación vegetativa *in vitro* (Ziv, 1994).

Las hojas y los tallos de las plantas hiperhídricas muestran una apariencia turgente y superficie acuosa, sus órganos son de cierto modo translúcidos, menos verdes y se quiebran con facilidad (Piqueras et al., 1998). Este fenómeno ha sido observado en varios cultivares de papa e informado por diferentes autores como (Krueger et al.; Simonton et al. 1991), (Berthouly et al. 1995) y (Calderón et al. 2008).

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

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

2.9 Estado del arte

Artículo científico: Efecto del tipo de explante y la frecuencia de inmersión en la producción de microtubérculos de papa cv. ‘Andinita’ en Sistemas de Inmersión Temporal.

Autores: Janet Igarza, Manuel de Feria, Yelenys Alvarado-Capó, Tatiana Pugh, Juan Jaime, Miguel Pérez, Mario San Roman, Daniel Agramonte.

El tipo de explante que se utilizó en esta investigación fueron las yemas apicales estas estuvieron sometidas a inmersiones cada 4 h utilizando el sistema de inmersión temporal, lo cual fue determinante en la formación y desarrollo de los microtubérculos.

De los tratamientos utilizados el que obtuvo mejor respuesta en la etapa de crecimiento fue en el que las plantas estuvieran sometidas a inmersiones cada 4 h, produciendo el mayor número de microtubérculos por planta y con mayor masa fresca. Más del 88.0% de los microtubérculos en todos los tratamientos tenían más de 4.0 mm. El número de microtubérculos por planta en todas las frecuencias de inmersión fue significativamente inferior en aquellas procedentes del primer segmento nodal. La variable diámetro de los microtubérculos no mostró diferencias significativas entre los tratamientos.

Se corroboró la influencia de la frecuencia de inmersión y el tipo de explante en la producción de microtubérculos de papa cv. ‘Andinita’ en Sistemas de Inmersión Temporal. Los mejores resultados se obtuvieron con inmersiones cada cuatro horas y el uso de yemas apicales como explante inicial con un promedio de 4.9 microtubérculos por planta, resultado superior a los descritos hasta el presente en la literatura científica para este mismo cultivar en condiciones estáticas y medio de cultivo semisólido. Más del 88% de los microtubérculos tuvieron un diámetro mayor de 4.0 mm y su masa fresca osciló entre 0.5 y 3.5 g.

Artículo científico: Efecto del intercambio gaseoso sobre el crecimiento y tuberización de vitroplantas de papa

Autores: J.G. Lugo G., N. Mogollón, Z.F. Rodríguez G. y J.G. Díaz

El mayor de los problemas a los que se enfrentan los productores de papa es la mala calidad de la semilla, por esta razón la micropropagación permite una multiplicación rápida de clones en un tiempo relativamente corto, libres de plagas y enfermedades y en un ambiente controlado (Barquero et al.,2001). Este método ha venido en auge en los últimos años con la finalidad de obtener material de propagación de alta calidad fitosanitaria y este sea beneficioso para los productores, asociado con el consecuente aumento en la productividad del cultivo (Pereira y Fortes, 2003).

Reseña bibliográfica: Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa.

Autores: Janet Igarza Castro, Daniel Agramonte, Yelenys Alvarado-Capó, Manuel de Fera, T. Pugh³.

Las yemas axilares se usan comúnmente para la producción de plantas in vitro y microtubérculos de papa; ambos métodos son utilizados como constituyente de material vegetal para la producción de semilla de papa.

La papa se propaga vegetativamente por tubérculos y semillas lo que asegura la conservación de características durante generaciones sucesivas, la forma asexual en la que esta se propaga está sometida a un riesgo de contaminación por patógenos ya sean virus, hongos, bacterias e insectos, durante el período de cultivo y almacenamiento. El uso de material vegetativos por ciclos repetidos puede ocasionar degeneración del cultivo por la acumulación de enfermedades, especialmente virales (Scherwinski y Luces, 2004).

La propagación de papa por medio de técnicas biotecnológicas es una alternativa viable para la obtención de semilla de alta calidad fitosanitaria, el uso de los sistemas de inmersión temporal posibilita la propagación masiva basándose en la inmersión temporal

de explantes en medio de cultivo liquido durante unos minutos a una determinada frecuencia de inmersión.

3 Materiales y métodos

3.1 Ubicación del área de estudio

3.1.1 Ubicación de áreas de colecta

La colecta se llevó a cabo en los municipios de San Mateo y La Esperanza del departamento de Quetzaltenango, ubicado a 210 km de la ciudad capital, con productores de la empresa Frito Lay. La semilla de papa proviene de la empresa semillerista Bejo Guatemala, con categoría de semilla certificada como fuente inicial de material de propagación.

Las coordenadas del municipio de San Mateo son $14^{\circ}52'00''N$ $91^{\circ}35'00''O$, en una altitud de 2,497 msnm y del municipio de La Esperanza $14^{\circ}52'00''N$ $91^{\circ}34'00''O$ en una altitud de 2,465 msnm

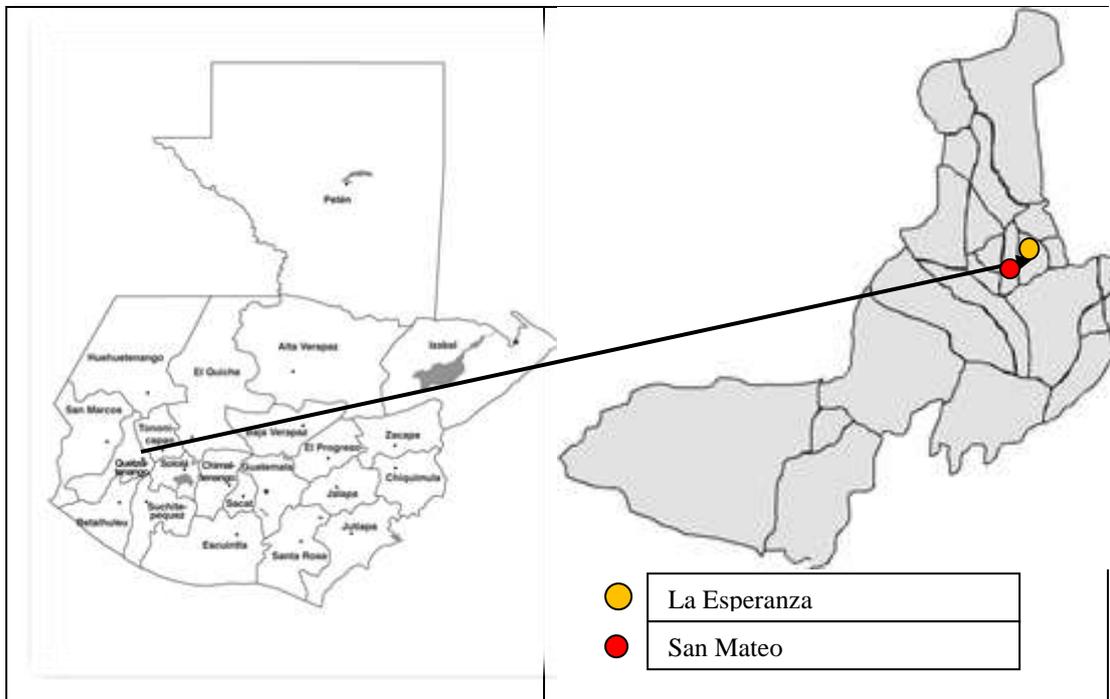


Figura 1. Mapa representativo de las zonas de muestreo efectuados en el departamento de Quetzaltenango.

3.1.2 Ubicación del área de experimentación

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de células y tejidos vegetales y el laboratorio de biotecnología, de la unidad de vinculación y gestión de recursos Uviger, la unidad es parte del área tecnológica de la facultad de agronomía, de la universidad de San Carlos de Guatemala campus central zona 12.

3.2 Técnicas e instrumentos

3.1.3 Materiales de Laboratorio

- Frascos de vidrio de 50 ml
- Probetas
- Tubos de ensayo
- Micropipetas
- Beakers 2 litros
- Bisturís
- Pinzas
- Cajas Petri
- Lámpara de alcohol
- Fósforos
- Guantes y Mascarillas
- Bata de manga larga.
- Parafilm
- Papel aluminio
- Papel mayordomo.

3.1.4 Equipos de Laboratorio

| Equipo de laboratorio | Marca |
|---|---------------------|
| Recipientes de inmersión temporal RITA® | Creado por el CIRAD |
| Cámara de flujo laminar | Premlab |
| Autoclave | All American |
| pH metro | Oakton |
| Refrigerador | Mabe |
| Balanza de precisión | AE ADAM |
| Agitador | Fisher Scientific |
| Dispensador | Ward's Science |
| Microondas | Panasonic |

3.1.5 Reactivos

| Reactivo | Marca |
|-----------------------------------|--------------|
| Murashige and Skoog with FeNaEDTA | Caisson |
| Agar | Caisson |
| ácido 1-naftalenacético (ANA) | Caisson |
| ácido giberelico (GA3). | Caisson |
| Bencil amino Purina (BAP) | Caisson |
| Sucrosa | Sigma |
| Etanol 95% | Quimiprova |
| Hipoclorito de sodio 10% | Quimiprova |

| | |
|----------------------|------------|
| Agua desmineralizada | Salvavidas |
|----------------------|------------|

3.1.6 Materiales y equipos de oficina

- Resmas de papel bond
- Computadora
- Impresora
- Marcadores y lapiceros
- Cámara de fotográfica

3.1.7 Esterilización de materiales y limpieza de equipo

En la esterilización de la cristalería se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO_3) al 5% con la sumersión de los recipientes de vidrio durante 6 horas. Los residuos de cloro en los recipientes se eliminaron con agua desmineralizada, posteriormente las cajas Petri, las pinzas y los bisturí se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Previo a la siembra de los tejidos se desinfectó el área de trabajo de la cámara de flujo laminar con Etanol al 70%.

3.2 Establecimiento de ápices meristemáticos

3.2.1 Preparación y desinfección del material vegetativo

Los tubérculos en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, se lavaron con agua y detergente para eliminar los residuos polvo y con cuchillo desinfectado con NaClO_3 al 2%, se dividieron en secciones, cada una conteniendo al menos una yema axilar y se sumergieron durante 20 minutos en 2 g de benomil diluido en 1 L de agua.

3.3.2. Siembra in vitro del material vegetativo

La fase in vitro se llevó a cabo en tres etapas, establecimiento, multiplicación y tuberización en sistemas de inmersión temporal.

3.2.2 Fase de establecimiento

Los brotes de yemas se desinfectaron durante 5 minutos con NaClO₃ al 2%, posterior se eliminaron los residuos de cloro con tres lavados sucesivos en agua desmineralizada estéril. Con las hojas estériles de bisturí se extrajeron ápices meristemáticos de aproximadamente 0.5 cm y se sembraron en grupos de tres en frascos de vidrio de aproximadamente 7cm de alto y 5 cm de diámetro a los que se les adiciono 25 ml de medios de cultivo MS con 0.2 mg/L de ácido 1-naftalenacético (ANA) y 0.1 mg/L de ácido giberélico (GA3).

Estos frascos sembrados se colocaron en un cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de 20 ± 2 °C de temperatura y 16 horas luz de fotoperiodo, durante 30 días.

3.2.3 Fase de multiplicación

A los 30 días del establecimiento, con las plantas formadas se inició la multiplicación por micro esquejes para reproducir el material necesario para la fase de tuberización, los microesquejes se sembraron en tubos de ensayo. En la fase de multiplicación se agregaron ácido giberélico y 6-BAP incorporadas a los medios de cultivo solas o combinadas.

Estos tubos fueron sembrados se colocaron en un cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de 20 ± 2 °C de temperatura y 16 horas luz de fotoperiodo, durante 21 días (Castro et al., 2012).

3.2.4 Fase de tuberización

3.2.4.1 Limpieza de los componentes

Se realizó la limpieza de los componentes del RITA® en un balde amplio donde se colocaron las mangueras, tapas y frascos por un tiempo para desinfectarlos en una solución de NaClO₃ al 2.5%, además los componentes autoclavables se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

3.2.4.2 Propagación en Sistemas de Inmersión Temporal

Como fuente de explantes se utilizaron brotes, obtenidos por medio de micropropagación convencional, en medio de cultivo semisólido, cada RITA se conectó a un sistema de entrada de aire proveniente de un compresor con un sistema automatizado que controla las frecuencias, duración de inmersión y flujo de gases (Montoya et al., 2008).

Para la fase de tuberización se seleccionaron 15 esquejes con seis o siete yemas axilares cada uno, la cantidad fue seleccionada de acuerdo a la capacidad del Recipiente de inmersión temporal RITA®

3.2.4.3 Preparación de medio de tuberización

Para la fase de tuberización se prepararon 15 litros de medio de cultivo adicionados con:

Cuadro 1. Reactivos utilizados en la elaboración de medio para tuberización de los explantes.

| Reactivo | Dosis |
|--------------------------|-----------|
| Medio de cultivo MS 100% | 4.33 gr/l |
| L cysteina | 0.1 mg/l |
| Ácido cítrico | 0.05 mg/l |
| Ácido ascórbico | 0.05 mg/l |

| | |
|-----------------------|----------|
| Pantotenato de Calcio | 0.3 mg/l |
| 6-BAP | 1mg/l |
| Sucrosa | 80 gr/l |

Fuente: (Montoya et al., 2008).

El inductor de tuberización utilizado en este experimento fue la sacarosa la cual actúa como inductora de varios genes que controlan la producción de tubérculos (Xu, et al., 1998), según (Jiménez et al., 1999) la concentración óptima de sacarosa para la formación de microtubérculos es de 80 g/L, las concentraciones inferiores o superiores a estas condujeron a una tuberización más lenta con pocos microtubérculos y muy pequeños. Los 72 frascos RITA esterilizados se colocaron en la cámara de siembra y se trasvasaron 300 ml de medio de tuberización en cada recipiente.

3.2.4.4 Siembra de explantes en RITA ®

Los recipientes se mantuvieron cerrados hasta tener los 15 esquejes listos para la siembra, posterior a la selección se abrió el recipiente se colocaron los esquejes sobre el tamiz, evitando movimientos bruscos, para no provocar el derrame del medio en la cámara de siembra.

Posterior a la siembra se llevaron los frascos a cuarto de crecimiento, donde se sometieron a diferentes condiciones de fotoperiodo y frecuencia de inmersión, como lo indican los tratamientos.

3.2.5 Operatización de las variables.

3.2.5.1 Las variables no paramétricas

- a. Número de microtubérculos
- b. Número de microtubérculos

Para el análisis de las variables no paramétricas se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis modificada con un nivel de significancia α 0.05, ya que cuando se producen empates, es decir, cuando varias observaciones de la misma o de distintas muestras son iguales y a todas se les asigna el mismo rango, es necesario dividir el valor de H por el siguiente factor de corrección:

$$1 - \frac{\sum_{i=1}^g t_i^3 - t_i}{n^3 - n}$$

En esta expresión g es el número de rangos que se repiten y t_i es el número de veces que se repite el rango i -ésimo. El efecto del factor de corrección es elevar ligeramente el valor de H .

Utilizando la fórmula de la siguiente manera.

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(n+1)$$

$$1 - \frac{\sum_{i=1}^g t_i^3 - t_i}{n^3 - n}$$

Donde:

K = número de grupos

N = número total de sujetos

n_j = número de sujetos en cada grupo

R_j = Suma de los rangos en cada grupo

$\sum_{i=1}^k$ = Indica que se suman los k grupos

t_i = es el número de veces que se repite el rango i -ésimo

3.2.5.2 Variables paramétricas

c. Peso fresco de microtubérculos.

Mediante la prueba de Duncan se determina la diferencia entre pares de medias después que se ha rechazado la hipótesis nula en el análisis de varianza, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$

$$D_p = d_{\alpha, p, gl_{error}} \sqrt{\frac{CM_{error}}{n}}$$

Donde:

P = toma valores entre 2

K = (K es el número de tratamientos)

D = se obtiene de la tabla T-9

CM_{Error} = se obtiene de la tabla de ANDEVA respectiva.

3.2.6 Tratamientos

Cuadro 2. Tratamientos evaluados en la micropropagación de tubérculos de papa variedad Loman, RITA®.

| Tratamiento | Variedad | Frecuencia de inmersión | Fotoperiodo |
|----------------------|----------|-----------------------------|------------------------|
| Tratamiento 1 | Loman | 3 min en intervalos de 3 h | 14 h luz, 10 h sin luz |
| Tratamiento 2 | Loman | 3 min en intervalos de 3 h | 16 h luz, 8 h sin luz |
| Tratamiento 3 | Loman | 3 min en intervalos de 7 h | 14 h luz, 10 h sin luz |
| Tratamiento 4 | Loman | 3 min en intervalos de 7 h | 16 h luz, 8 h sin luz |
| Tratamiento 5 | Loman | 3 min en intervalos de 10 h | 14 h luz, 10 h sin luz |
| Tratamiento 6 | Loman | 3 min en intervalos de 10 h | 16 h luz, 8 h sin luz |

4 Resultados

4.1 Matriz de resultados

Prueba múltiple de comparación de medias Duncan para la variable peso fresco.

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 0.7555 gl: 66

Cuadro 3. Prueba múltiple de medias para la variable peso fresco.

| Tratamiento | Medias | n | E.E. | | | |
|-------------|--------|----|------|---|---|---|
| 5 | 2.32 | 12 | 0.25 | A | | |
| 6 | 2.19 | 12 | 0.25 | A | B | |
| 4 | 1.56 | 12 | 0.25 | | B | C |
| 3 | 1.47 | 12 | 0.25 | | B | C |
| 1 | 1.35 | 12 | 0.25 | | | C |
| 2 | 1.28 | 12 | 0.25 | | | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

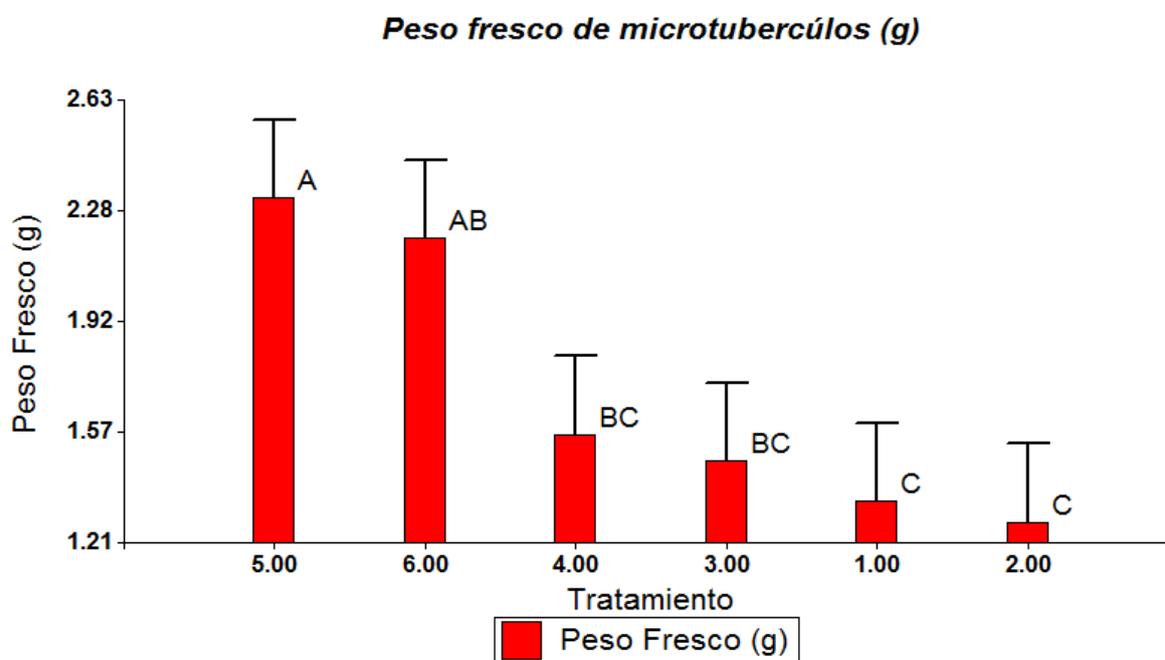


Figura 2. Peso fresco de microtubérculos de papa por tratamiento.

Cuadro 4. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable no paramétrica número de microtubercúlos.

| Variable | Tratamiento | N | Medias | D.E. | Medianas | H | p |
|-----------------|-------------|----|--------|------|----------|-------|--------|
| Microtubercúlos | 1 | 12 | 2.25 | 1.66 | 2.50 | 12.24 | 0.0271 |
| Microtubercúlos | 2 | 12 | 2.42 | 1.44 | 3.00 | | |
| Microtubercúlos | 3 | 12 | 2.83 | 1.64 | 3.00 | | |
| Microtubercúlos | 4 | 12 | 2.58 | 1.83 | 2.50 | | |
| Microtubercúlos | 5 | 12 | 4.17 | 1.70 | 4.00 | | |
| Microtubercúlos | 6 | 12 | 3.75 | 1.60 | 4.50 | | |

| Tratamientos | Rangos | | | |
|--------------|--------|---|---|---|
| 5 | 50.33 | A | | |
| 6 | 46.00 | A | | |
| 3 | 34.28 | A | B | |
| 4 | 32.04 | A | B | C |
| 2 | 28.67 | | B | C |
| 1 | 27.58 | | | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

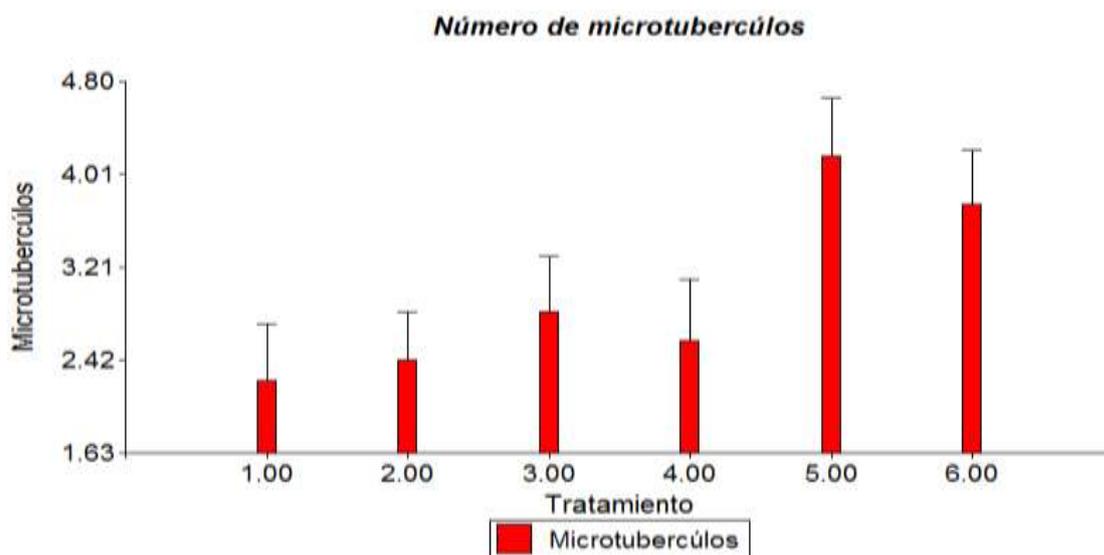


Figura 3. Numero de microtubercúlos obtenidos por tratamiento.

Cuadro 5. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable no paramétrica microtubercúlos vitrificados.

| Variable | Tratamiento | N | Medias | D.E. | Medianas | H | p |
|---------------|-------------|----|--------|------|----------|-------|--------|
| Vitrificación | 1 | 12 | 1.92 | 1.68 | 2.00 | 14.22 | 0.0101 |
| Vitrificación | 2 | 12 | 2.58 | 0.90 | 2.50 | | |
| Vitrificación | 3 | 12 | 1.25 | 1.14 | 1.00 | | |
| Vitrificación | 4 | 12 | 1.50 | 1.00 | 1.50 | | |
| Vitrificación | 5 | 12 | 1.17 | 1.19 | 1.00 | | |
| Vitrificación | 6 | 12 | 0.83 | 0.72 | 1.00 | | |

| Tratamientos | Rangos | | |
|--------------|--------|---|---|
| 6 | 25.00 | A | |
| 5 | 30.04 | A | |
| 3 | 32.17 | A | |
| 4 | 36.83 | A | |
| 1 | 40.96 | A | B |
| 2 | 54.00 | | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

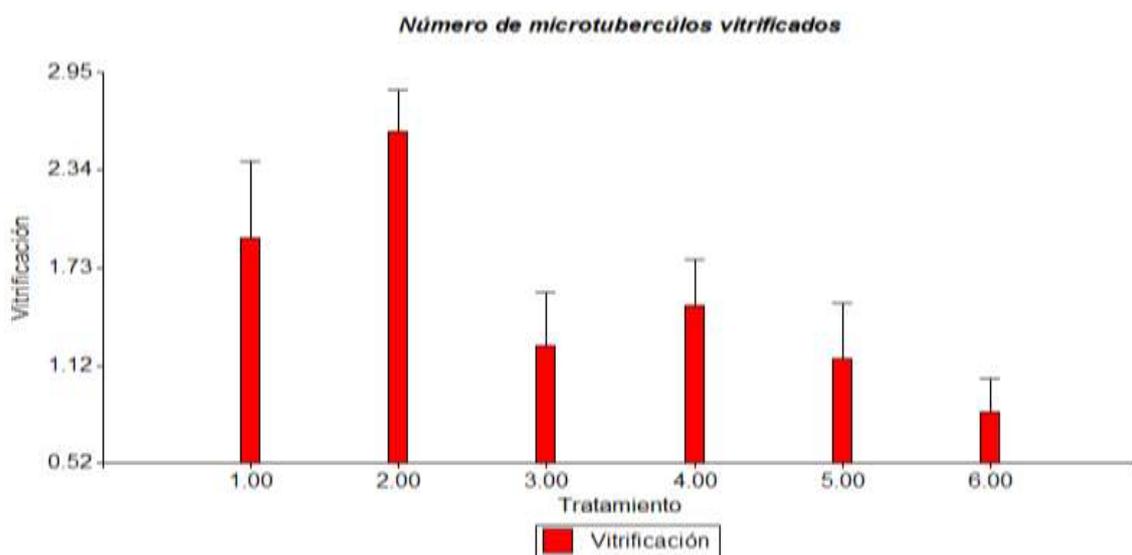


Figura 4. Número de microtubercúlos vitrificados por tratamiento.

4.2 Impacto esperado

Con este proyecto de investigación se evaluó la eficiencia del RITA[®] para la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L. var Loman), en la Universidad de San Carlos de Guatemala, además que teniendo los RITA[®] se podrán dar clases demostrativas a los estudiantes que se interesen en el aprendizaje de la técnica, aumentando con esto el interés por la investigación, dentro del campo de la propagación masiva de plantas libres de patógenos.

Con la implementación de la técnica se introducirán nuevas opciones para la producción masiva de microtubérculos de papa, esto beneficiará a los productores de dicho cultivo, debido a que la tasa productiva es significativamente superior a los resultados obtenidos mediante el cultivo de tejidos convencional, esta condición influenciará en la disminución de los costos en la producción de semilla de calidad genética y fitosanitaria.

A través de Uviger, que cuenta con las instalaciones adecuadas para el desarrollo del proyecto y por medio de un proyecto auto financiable, se podrán comercializar los microtubérculos de papa, de esta manera se pretende llegar a los productores de papa, quienes tendrían la oportunidad de adquirir estos microtubérculos a menor costo, producidos con calidad fitosanitaria.

5 Análisis y discusión de resultados

5.1 Numero de microtubérculos

De acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis para la variable número de microtubérculos, el tratamiento que presento mayor numero fue el tratamiento cinco, con una frecuencia de inmersión de tres minutos en intervalos de 10hr y un fotoperiodo de 14hr de luz y 10hr oscuridad con una intensidad de luz de 2000 lux, en el tratamiento cinco se obtuvo un promedio de 4.17 microtubérculos papa variedad Loman por planta.

En estudios realizados a las variedades Andinita, en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) de Venezuela fue posible obtener un promedio entre

cinco y siete microtubérculos, con calibres entre 4 y 16 mm por planta de la variedad Andinita, en SIT (Castro et al., 2011).

Se debe tomar en cuenta que a todos los tratamientos se les agrego 80gr/L de sacarosa como inductora de tuberización, La sacarosa puede jugar un doble papel en el desarrollo de microtubérculos. Aparte de ser una fuente de carbono adecuada fácilmente asimilada por las plantas in vitro y convertida en almidón en el desarrollo de los microtubérculos a una concentración de sacarosa de 80 gr/L, también proporciona una osmolaridad favorable para el desarrollo de microtubérculos (Khuri y Moorby, 1995).

Otros factores que influyen en la tuberización son la temperatura, el fotoperiodo y la intensidad de la luz, se observó que el tratamiento cinco que fue expuesto a menor fotoperiodo, comparado con el tratamiento seis, aunque comparten la misma frecuencia de inmersión, el promedio de microtubérculos del tratamiento cinco fue 0.42 mayor que el tratamiento seis, también se deben tomar en cuenta los componentes de los medios de cultivo y la variedad (Garner y Blake 1989; Hussey y Stacey 1984).

5.2 Numero de vitrificados.

El mayor número de vitrificados se presentó en el tratamiento dos y en el tratamiento uno, debido que son los tratamientos con mayor frecuencia de inmersión, tres minutos en intervalos de tres horas, para los dos tratamientos, la vitrificación o hiperhidricidad es un fenómeno es un desorden fisiológico, causado por la presencia de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de los tejidos (Ziv, 1994).

Las hojas y los tallos de las plantas hiperhidricas muestran una apariencia turgente y superficie acuosa, sus órganos son de cierto modo translúcidos, menos verdes y se quiebran con facilidad (Van Huylenbroeck, J.M., Van Laere, L. M., Piqueras, A., Debergh, P., C., Bueno, P., 1998), de igual forma se observaron y cuantificaron microtubérculos turgentes, frágiles y con un cambio de color café-amarillento, los cuales no se consideran viables para un proceso en campo.

5.3 Peso fresco de microtubérculos

Para esta variable se realizó una prueba de Duncan con un $\alpha= 0.05$ para lo cual se obtuvo mejores resultados en el tratamiento cinco con una frecuencia de inmersión de 3 minutos en intervalos de 10 h y un fotoperiodo de 14 h luz y 10 h oscuridad, sin embargo no hubo una diferencia significativa con el tratamiento cinco, de acuerdo a (Lugo, J. 2000) en las variedades Kennebec y Andinita, el fotoperiodo afectó la microtuberización bajo 10 h luz, se produjo un mayor número de microtubérculos pero bajo 16 h luz, se incrementó el peso y tamaño de los mismos.

El resultado se ve afectado por la variedad, ya que en otros casos se presenta mayor peso fresco en fotoperiodos cortos, así lo reporta (Jaramillo. A., Rivera; M., Montaña., H., Lozano, J. 2003) en su estudio sobre microtuberización in vitro de cuatro variedades de papa. (*Solanum tuberosum* L.) respecto a las demás variables el mejor tratamiento fue el tratamiento 2 (8 horas/luz + BAP + CCC) con el cual se obtuvieron los tubérculos más grandes y de mayor peso, así como las plantas de más altura, mayor número de nudos y mayor biomasa.

6 Conclusiones

El cultivo de papa variedad Loman presentó una respuesta positiva en cuanto a formación de microtubérculos en recipientes de inmersión temporal, se debe tomar en cuenta que la adición de 80gr/L de sacarosa es importante en la tuberización, factores como la frecuencia de inmersión y el fotoperiodo influyen en la formación de los mismos.

El fotoperiodo influye en el número y peso de microtubérculos de papa variedad Loman, en fotoperiodos de menos luz se forma mayor número de microtubérculos, mientras que en fotoperiodos de más luz hay mayor peso de microtubérculos.

Para disminuir la vitrificación o hiperhidricidad es importante tomar en cuenta la frecuencia de inmersión, mientras menos frecuente sea la inmersión menor será la posibilidad de obtener material vitrificado, además se debe tener en cuenta la cantidad de explantes que se colocaran en el sistema, ya que mientras más explantes mayor será el tiempo en que deban permanecer sumergidos en el medio de cultivo, para que todos puedan aprovechar los nutrientes.

7 Referencias

1. Aitken-Christie, J. (1991). Automation. Micropropagation: Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 363–388 p.
2. Aitken-Christie, J., Kozai, T., Takayama, S. (1995). Automation in plant tissue culture - general introduction and overview. Moscú., RU. Kluwer Academic Publisher. 24 -32 p.
3. Akita, M., Takayama, S. (1994). Induction and development of potato tubers in jar fermentor. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 18: 284 – 287 p.
4. Aragón, C. E., Escalona M., Capote I., Pina D., Cejas I., González-Olmedo J. (2004). Evaluación del efecto de las condiciones generadas por Biorreactores de inmersión temporal sobre enzimas y procesos clave del metabolismo del carbono en plantas in vitro de plátano cv. CEMSA ¾. Biotecnología Vegetal 4 (3): 147-152 p.
5. Azurdia, C. (2014). Cultivos nativos de Guatemala y bioseguridad del uso de organismos vivos modificados. Papa (*Solanum tuberosum*). Consejo Nacional de Áreas Protegidas. Documento Técnico No. 11-2014. 39 p.
6. Barquero, M., Gómez, L., Brenes A., y Vaverde R. (2001). El tamaño del pote en la producción de semilla prebásica de papa en invernadero. Agronomía Costarricense 25(1):61-66 p.
7. Coleman, W. K., Donnelly, D.J., Coleman, S. E. (2001). Potato microtubers as research tools: a review. American Journal of Potato Research 78: 47-55 p.
8. Escalona, M., Lorenzo, J., Daquinta, M., Borroto, C. (2003). Procedimiento y equipo para la propagación de plantas por inmersión temporal. La Habana., CU. 48 – 49 p.
9. Escalona, M. (2006). Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. Propytha Annual 48-49 p.
10. Etienne E., Berthouly M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell Tissue Org. Cult. 69: 215–231 p.
11. Garner, N., Blake, J. (1989). The induction and development of potato microtubers in vitro on media free of growth regulating substances. Ann. Bot. 63:663-674 p.

12. Hussey, G. (1986). Problems and prospects in the in vitro propagation of herbaceous plants. *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*. Withers LA y Alderson PG (eds). Butterworths, Boston. 69–84 p.
13. Igarza Castro, J., Agramonte, D., Alvarado-Capó, Y., de Feria, M., & Pugh, T. (2012). Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. *Biotecnología Vegetal*, 12(1). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/495>
14. Santos, A.J., González, M. D. J. R., Montañó, H., Rodríguez, J. J. L. G. Microtuberización in vitro de cuatro variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.).
15. Scherwinski, P., Lucas, G.R. (2004). Organogênese de ápices meristemáticos de batata em meios de isolamento e multiplicação in vitro. *Horticultura Brasileira* 22(2). 197-201 p.
16. Jiménez, E., Pérez N., de Feria M., Barbón R., Capote A., Chávez M., Quiala E. y Pérez J.C. (1999). Improved production of potato (*Solanum tuberosum* L.) Microtubers using a temporary immersion system. *Plant cell, tissue and organ culture* 59: 19-23 p.
17. Khuri, S., Moorby J. (1995). Investigation into the role of sucrose in potato cv. ‘Estima’ microtuber production in vitro. *Ann Bot* 75: 295-303 p.
18. Lugo, J. (2000). Factores que afectan la producción de vitroplantas y microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) y el uso de estos materiales en la obtención de microtuberculos de las variedades Kennebec y Andinita. Disponible: http://postgrado.ucla.edu.ve/agronomia/Horticultura/trabajos/Lugo_Jos%C3%A9.htm en:
19. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. (2014). El Agro en Cifras. Disponible en: <http://web.maga.gob.gt/download/1agro-cifras2014.pdf>
20. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO). 2008. Año Internacional de la Papa. Disponible en: <http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/origenes.html>
21. Oropeza, M. P. (2012). Efecto de la composición del medio de cultivo y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
22. Pérez-Alonso, N., de Feria, M., Jiménez, E., Capote, A., Chávez, M., & Quiala, E. (2001). Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para la producción a gran escala de tubérculos in vitro de *Solanum tuberosum* L. var. Atlantic y estudio de

- su comportamiento en el campo. *Biotecnología Vegetal*, 1(1). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/54>
23. Pereira, J.E.S. y G.R.L. Fortes. (2003). Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. *Pesq. Agropec. Bras.* Brasília 39(9):1035-1043 p.
 24. Piedra Burbano, M. A. (2014). Tesis: Evaluación de la microtuberización de los cultivares de papa INIAP-VICTORIA y SUPERCHOLA, bajo sistemas de inmersión temporal. Quito, Ecuador. 66 p.
 25. Suárez, K. F., Martín, F. F., Declerck, S. (2013). Búsqueda de un medio de cultivo para la micorrización in vitro de plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Cultivos Tropicales*, 34(4), 9-19 p.
 26. Teisson, C., Alvard, D. (1999). In vitro production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. *Potato research*. 42: 499 – 504 p.
 27. Van Huylenbroeck, J.M., Van Laere, L. M., Piqueras, A., Debergh, P., C., Bueno, P. (1998). Time course of catalase and superoxide dismutase during acclimatization and growth of micropropagated *Calathea* and *Spathiphyllum* plants. *Plant Growth Regulation* 26(1): 7-14 p.
 28. 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 Physiol*. 117: 575 -584 p.
 29. Ziv, M. (1994). The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Environmental Effects and their Control in Plant Tissue Culture* 393, 25-38 p.
 30. Ziv, M., y Shemesh D., (1996). Propagation and tuberization of potato bud clusters from bioreactors culture. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 32: 31-36 p.

8 Apéndice



Figura 5. Semilla de papa con meristemos colectados en San Mateo, Quetzaltenango.



Figura 6. Colecta de meristemos de papa, La Esperanza, Quetzaltenango.



Figura 7. Meristemos de papa obtenidos de las semillas.



Figura 8. Siembra de meristemos de papa en medio MS solido.



Figura 9. Exposición a la luz de los meristemas del segundo bloque de plantas madre.



Figura 10. Meristemas de papa utilizados en el bloque de plantas madre.



Figura 11. Microtubérculos obtenidos de los bloques de plantas madre.



Figura 12. Colecta de microtubérculos a partir de bloques madre de plántulas de papa.



Figura 13. Esterilización de los recipientes RITA.



Figura 14. Recipientes RITA® con meristemos de papa.



Figura 15. Recipiente RITA® con meristemos de papa.



Figura 16. Explantes de papa sumergidos en medio de cultivo.



Figura 17. Microtubérculos de papa obtenidos del RITA[®]



Figura 18. Microtubérculos de papa obtenidos de los RITA®



Figura 19. Peso fresco de microtubérculos de papa

9 Actividades de gestión, vinculación y divulgación

Se realizó una visita técnica a la Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH), Tapachula, Chiapas, México, además de estrechar lazos y la vinculación al centro de Bioplantas ubicado en la Universidad Ciego de Ávila, Cuba; esto con la finalidad de intercambiar experiencias en el uso de los sistemas de inmersión temporal y el uso de RITA® en la propagación masiva de plantas.

Se hicieron visita de campo a las zonas de colecta de meristemos y semilla de papa ubicadas en San Mateo y La Esperanza municipios de Quetzaltenango, y se dieron charlas informativas sobre la propagación de papa a través de meristemos y microtubérculos conjuntamente se explicaron los beneficios que esto representa dado el interés presentado por los productores.

Las zonas productoras de papa que se visitaron y los productores con los que se contactaron se llegó a un acuerdo para la implementación de un banco de germoplasma con materiales locales y materiales importados.