

# Micropropagación de tubérculos de *Solanum chaucha*

J. Cerezo & A. Rodríguez



## Introducción

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es una técnica de reproducción en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento nodal inicial de tejido es posible regenerar en poco tiempo numerosas plantas genéticamente iguales a la planta madre, cuando a este tejido le es aplicado un estímulo por medio de variables físicas y químicas controladas en un medio de cultivo.

A diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, esta técnica permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo; así como el manejo de las mismas en espacios reducidos. Por otro lado, la técnica es de gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos; plantas homocigotas, en la producción de plantas en peligro de extinción, en estudios de ingeniería genética, etc. Esta metodología ha propiciado que en los últimos 25 años se haya incrementado el número de laboratorios de cultivo de tejidos en el país para la producción comercial de plantas ornamentales y frutales.

Por esto, en la Universidad Politécnica de Cartagena con el apoyo de Antonio Calderón y la disposición del espacio y el material necesario; hemos desarrollado un proyecto de producción de plantas de *Solanum chaucha* utilizando la técnica antes mencionada con el propósito de saber más de este tipo de cultivo, poco conocido en la zona; para lo cual se empezó, a partir de principios de Marzo, en la instalación de un Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, donde pudimos trabajar con la mayor asepsia posible durante todo el proceso que duro unos 4 meses a partir de la fecha mencionada. Por hoy, se tienen resultados satisfactorios en la producción de vástagos, y segmentos nodales del cultivo, pero escasos en la producción de tubérculos de patata negra, cuyas características se mencionan a continuación:

- *Solanum chaucha* es el nombre botánico de esta especie perteneciente a la familia Solanaceae y es conocida de forma común como: *chaucha* y *papa negra*.

- Original de **América del Sur (Andes)**.
- Planta perenne, herbácea, vivaz, provista de un sistema caulinar aéreo y otro subterráneo, de naturaleza rizomática (donde se originan los tubérculos). Sus raíces son fibrosas y muy ramificadas.
- La inflorescencia es en cimas umbeliformes; las flores, bisexuales,

poseen la corola rotácea gamopétala, de color morado en diferentes tonos e intensidades; generalmente presentan una sola inflorescencia por tallo y cada inflorescencia agrupa entre 4 y 25 flores.

- Medianamente exigente en necesidades lumínicas.

## Materiales y métodos

### ▪ Cultivo

Se procede a la selección y corte del material seleccionado de *Solanum chaucha* con el que se desee realizar la experimentación, debiendo descartar el material más basal dejando unos tallos de 15 cm, imprescindible seleccionar material sano y en estado óptimo.

El material vegetal debe quedar desinfectado, realizando 2 pasos. En primer lugar se introduce en alcohol al 70% agitando intensamente durante 20 segundos. El segundo procedimiento consiste en la introducción en la disolución de hipoclorito de sodio al 5% y agua destilada jabonosa a razón de 1/4 durante 15 minutos los más jóvenes y 20 los más basales.

Para el medio de cultivo se realizaron las preparaciones de los medios de agar a razón de 8g/l, sacarosa 25g/l, giberelinas 0,1 mg/l a un pH de 5,75; Para la propagación agar a razón de 8g/l, sacarosa 25g/l, citoquininas 5mg/l a un pH de 5,75. Para la inducción a tuberización agar a razón de 8g/l, sacarosa 80g/l, a un pH de 5,75; se utiliza El agua debe ser destilada. Todo realizado en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar, procediendo a la desinfección del área con alcohol en el interior de la cámara. Los utensilios, botes contenedores y tubos de ensayo con los que se

cuenta han de quedar esterilizados en el autoclave al igual que el material a utilizar.

Cada tubo de ensayo debe contener 500 ml del medio preparado, en los botes hasta que el fondo quede totalmente cubierto.

En el interior de la cámara de flujo laminar se procede al corte de los nudos de los tallos, introduciendo estos en el interior de los tubos de ensayo con el medio anteriormente preparado, se debe realizar en condiciones de asepsia situando el material de forma perpendicular al medio, no introduciendo en exceso el nudo y en sentido natural del tallo, con la zona basal hacia abajo y la zona apical hacia arriba.

### ▪ Siembra

Se toman placas Petri con medio favorable para bacterias y levaduras, se autoclavan las placas y en condiciones estériles. Se realiza la preparación siguiendo las recomendaciones del fabricante del medio, recolectando el material afectado empanando la aguja de siembra de forma estriada.

### ▪ Análisis

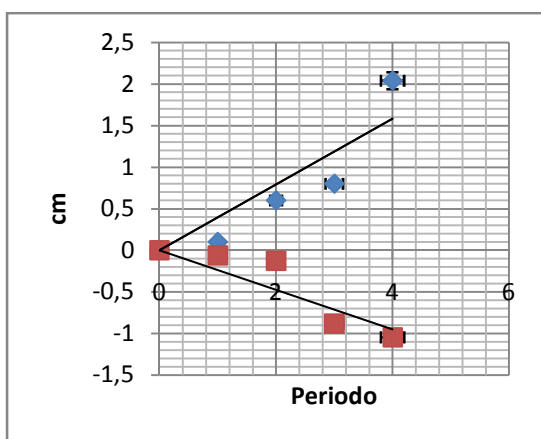
Se toma una porción del cultivo infectado en agar o en dilución, se toma un portaobjetos y el material seleccionado se fija con un mechero Bunsen hasta la completa fijación y

deshidratación del material, manteniendo la precaución de no elevar en exceso la temperatura a fin de no romper el cristal y no carbonizar el material.

Se aplica una tinción de azul de metileno 1% dejando actuar 5 minutos, se procede al lavado de forma superficial con agua para retirar el sobrante, se deposita una gota de aceite de inmersión.

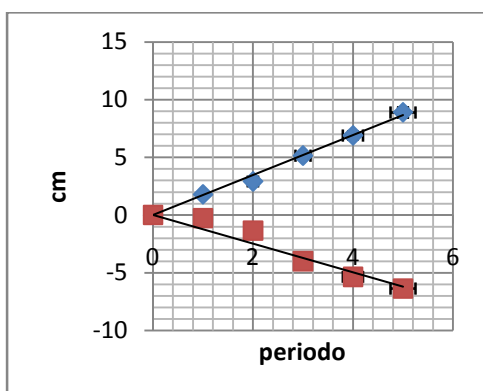
## Resultados

### ■ Cultivo



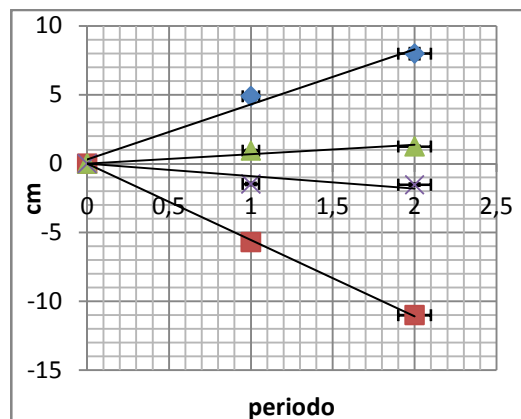
En el primer cultivo realizado se seleccionaron 15 nudos durante un periodo de 29 días con el siguiente crecimiento mostrado, se normalizó en una línea la curva que muestra el crecimiento de la población pues en el primer tramo de crecimiento el crecimiento es similar a la tendencia de la línea. Se obtuvieron las ecuaciones de crecimiento aéreo y radicular de  $y = 0,395 x$  e  $y = -0,238 x$  con un  $R^2$  de 0,82 y 0,81 respectivamente.

### ■ Subcultivo



En el primer subcultivo realizado se seleccionaron 10 nudos durante 33 días de los que tomamos la muestra población para realizar el estudio de crecimiento, parte de los nudos suministrados por el cultivo anterior se destinó a otros estudios. Se obtuvieron las ecuaciones de crecimiento aéreo y radicular de  $y = 1,731 x$  e  $y = -1,239 x$  con un  $R^2$  de 0,99 y 0,93 respectivamente.

### ■ Tuberización



En el proceso de tuberización realizado se seleccionaron 9 nudos durante 72 días de los que tomamos la muestra población para realizar el estudio de crecimiento, parte de los nudos suministrados por el cultivo anterior se destinó a mantenimiento y otros estudios.

Se realizó una comparativa del crecimiento en la fase de inducción a la tuberización, donde el crecimiento de los nudos que se encuentran inmersos en líquido con estructuras de papel de filtro era menor en comparación a las

preparaciones en agar parte aérea y radicular a razón de  $y = 4,18x$  e  $y = -5,54x$  con un  $R^2$

de 0,98 y 0,99 respectivamente; y en la muestra líquida  $y = 0,69x$  e  $y = -0,9x$  con un  $R^2$  de 0,9 y 0,73 respectivamente.

▪ Tasa de replicación

El material obtenido en el primer cultivo tuvo una tasa de replicación del 167% con una muy buena calidad del material seleccionado, se realizaron ensayos con citoquininas y giberelinas donde éste último tuvo una mayor prolificidad; el medio standard de propagación obtuvo un 1170% que se presentaba en tubos de ensayo de forma individual, se ha de tener en

- Crecimiento aéreo
- Crecimiento radicular
- Crecimiento aéreo líquido
- × Crecimiento radicular líquido

cuenta que el primer cultivo recibe una abrasión química y física reduciendo la calidad del material vegetal. En el proceso de tuberización se obtuvieron tasas mayores pero con el doble del tiempo que en los anteriores experimentos, el medio líquido mostraba tejidos muy deteriorados y de escasa calidad.

Cultivo		Subcultivo			Tuberización	
Medio	MS <sup>1</sup>	CK <sup>2</sup>	GAB <sub>3</sub> <sup>3</sup>	MS	MSt <sup>4</sup>	MSt <sup>5</sup>
Tasa de replicación	167%	300%	390%	1170%	1475%	2100%

▪ Detección de la infección

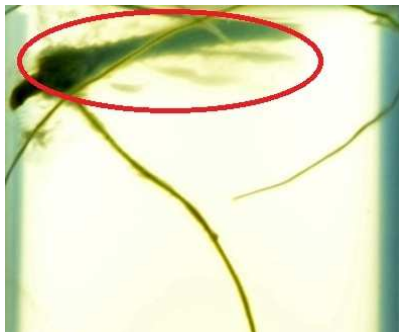


Figura 1. Detalle del halo infeccioso

preparaciones localizadas en la zona de la raíz. Realizamos siembras del material contaminado descubriendo bacterias del tipo streptococcus .

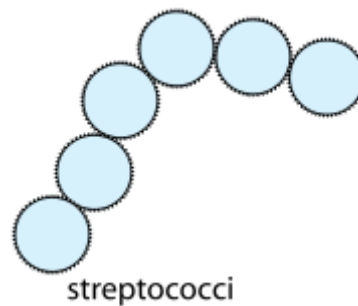


figura 1. Descriptiva de la bacteria visualizada

En las diferentes preparaciones realizadas se presentaron halos infecciosos en diferentes

<sup>1</sup> MS standard para propagación  
<sup>2</sup> Citoquininas al 5mg/l  
<sup>3</sup> Giberelinas al 0,1 mg/l  
<sup>4</sup> Ms para inducción a la tuberización en líquido  
<sup>5</sup> Ms para inducción a la tuberización

## Discusión



Figura 1. Vástago basal

Es importante en los primeros cultivos realizar un descarte más selectivo del material vegetal a fin de asegurar líneas más potentes en la duplicación, descartar las partes demasiado basales que contienen gran cantidad de patógenos y su rotura a la inhibición del crecimiento será mucho más lenta.

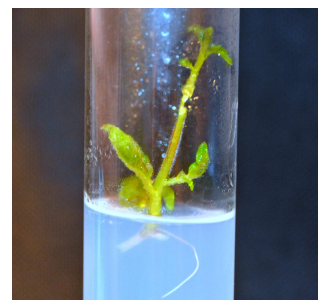


Figura 2. Vástago apical

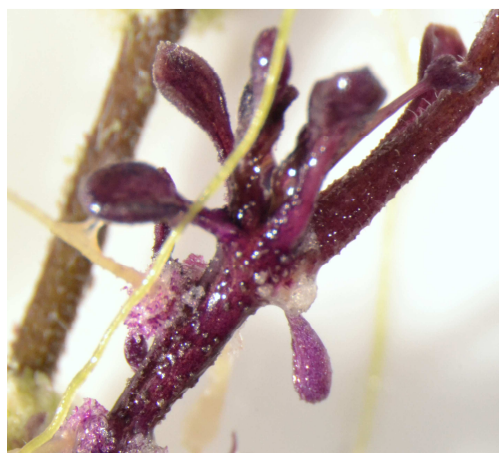


Figura 2. Hojas en MS de tuberización en lupa

Las hojas presentaban menor tamaño de las hojas y raíces con enroscamiento de las mismas, crecimientos anómalos de la parte aérea y propensión de formaciones abultadas por toda la superficie. Tallos más engrosados pero con baja lignificación y aspecto poco consistente del tejido. Se recomienda cultivos de inducción a la tuberización en medios de agar.

En los medios de tuberización líquido las hojas tomaron un color violáceo en todos los casos variando sus intensidades, se presume que fue la interacción que sufrió con el incremento de la sacarosa en solución acuosa. En los medios líquidos las muestras presentaron menor crecimiento y peor calidad del tejido.



Figura 3. Hojas en MS de tuberización en lupa apreciación de formaciones mucilaginosas

## Bibliografía

- Golmirzaei and J.Toledo; CIP, Lima, Peru; In Vitro Conservation of Potato and Sweetpotato Germoplasm. 351-356
- Haeng-Hoon Kim, Ju-Won Yoon, Young-Eun Park, Eun-Gi Cho, Jae-Keun Sohn, Tae-San Kim & Florent Engelmann. Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification. 223-234