

OBSERVACIONES

SOBRE

LA TUBERIZACION DE BROTES DE PAPA Y «ULLUCUS»

CULTIVADOS «IN VITRO»

POR FRANCISCO K. CLAVER ¹

INTRODUCCIÓN

El proceso de tuberización ha llamado la atención de los botánicos desde hace largo tiempo. Los primeros investigadores trataron de establecer los principales factores determinantes de dicho proceso, pero sólo recientemente comenzó a ser analizado en cultivos *in vitro*.

Casi la totalidad de los trabajos mencionados en la literatura científica pertinente se refiere a diversos aspectos de la tuberización de plantas de papa, y el primero de ellos fué debido a Magrou (1938). Posteriormente Barker (1953) desarrolló un método práctico para el cultivo de brotes *in vitro* con el objeto de estudiar el ataque de los tubérculos por la sarna.

Mes y Menge (1954) cultivaron *in vitro* brotes extraídos de plantas normales desarrolladas a la luz, y observaron también la formación de tubérculos en medios asépticos.

Recientemente, Chapman (1955) cultivó distintos órganos y tejidos de papa: raíz, nudos, yemas y parénquima del tubérculo. Obtuvo tuberización de los nudos de los brotes, preferentemente.

En la presente comunicación se detallan trabajos realizados sobre la tuberización de brotes de papa y *Ullucus* cultivados *in vitro*.

¹ Ingeniero Agrónomo. Jefe de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Fisiología Vegetal y Fitogeografía de la Facultad de Agronomía de La Plata.

MATERIAL Y MÉTODO

El medio de cultivo utilizado fué el de White (1943) más 2,5 mg/l de pantotenato de calcio. Como fuente de hidratos de carbono se usó sacarosa al 2 %; la concentración del agar fué de 0,75 %. Se emplearon como recipientes Erlenmeyer y frascos de 200 cc. La cantidad de medio de cultivo agregado a los frascos fué de 100 cc.

Los recipientes fueron esterilizados en autoclave durante 20' y a 1,2 kg/cm² de presión.

La desinfección del material de siembra, que consistía en brotes y tubérculos de papa de la variedad Katahdin y de *Ullucus*, se efectuó por medio de hipoclorito de calcio comercial con un tenor de cloro de 30 a 35 %.

La concentración de hipoclorito empleado fué de 10 a 15 %, y el período de desinfección de 20 a 40 minutos.

Los brotes fueron esterilizados introduciéndolos en un frasco con tapa esmerilada, al que se le agregó hipoclorito más unas gotas de detergente. Transcurrido el tiempo fijado para la esterilización, se extrajeron del frasco secándolos entre hojas de papel de filtro esterilizado. Luego se lavaron con agua estéril y se sembraron en los frascos de cultivo.

Aunque todo el manipuleo se realizó en condiciones de asepsia, utilizando instrumental previamente esterilizado y flameándolo cada vez que se realizaba una nueva siembra, se produjo gran porcentaje de infecciones causadas por hongos y bacterias.

Después de sembrados los cultivos, se colocaron en cuarto oscuro y a una temperatura de alrededor de 20° C.

El origen y estado de desarrollo del material, se detalla a continuación:

I) Papas provenientes de Estados Unidos. En la fecha que se utilizaron para cultivarlas *in vitro* los tubérculos estaban incubados ¹, es decir, se habían formado algunos tuberculitos en los brotes.

II) Papas producidas en el país que habían brotado el 30-V-55.

¹ La papa, una vez cosechada, tiene un desarrollo distinto según la variedad y las condiciones a que está expuesta. Después de cierto tiempo, los tubérculos comienzan a brotar y continúan creciendo hasta la aparición de rizomas con pequeños tubérculos. A este estado particular del tubérculo en que tiene capacidad de producir tuberculitos, se le da el nombre de incubación.

Los brotes formados por estos tubérculos no mostraban signos de incubación cuando se extrajeron para el cultivo *in vitro*.

III) Papas que se habían formado sin follaje ¹. Originadas de papas importadas en 1953. En la fecha en que se realizó el cultivo *in vitro* (17-V-55), estos tubérculos estaban incubados. Se sembraron brotes y algunos tuberculitos que ya habían aparecido en los brotes.

IV) *Ullucus tuberosus* Loz. provenientes de Perú. En los medios de cultivo sólo se sembraron brotes.

OBSERVACIONES Y RESULTADOS

1. *Brotes de tubérculos incubados.* — La brotación de las yemas en los brotes sembrados no ocurre simultáneamente, pues varía entre 5 y 20 días. Los brotes formados son de escasa longitud; al parecer crecen sin ninguna dirección: algunos son aéreos y otros se sumergen en el medio de cultivo. La mayoría de los cultivos no forma raíces.

El momento de formación de los tubérculos también es muy variable, ocurriendo la tuberización después de 60 días de la siembra. En nuestros ensayos, el diámetro alcanzado por los tubérculos ha sido pequeño, llegando el mayor a 0,8 cm.

Los tuberculitos se forman indistintamente en los tallos aéreos (fig. 1), o en los sumergidos (fig. 2).

Los tuberculitos sumergidos forman un tejido esponjoso de color claro, con lenticelas prominentes. En algunos cultivos también se produjeron en los tallos proliferaciones indiferenciadas.

La formación de tubérculos se produjo en el ápice de los tallos o en las yemas axilares, siendo en este último caso sésiles, es decir, sin formarse rizomas.

Después de la formación del primer tubérculo, en algunos cultivos se observó la formación de tubérculos en cadena, o secundarios, es decir, que el primer tuberculito formado originaba una yema que, después de pocos milímetros de crecimiento, tuberizaba nuevamente (fig. 3, A, B y C).

En uno de los cultivos se sembró un trozo de brote con el rizoma, y en el ápice de éste un pequeño tuberculito de 8 mm en proceso de formación. A partir de 15 días de la siembra, el tuberculito sem-

¹ Se llama tubérculos formados sin follaje, a aquéllos producidos en brotes de papas colocadas en condiciones de humedad y oscuridad.

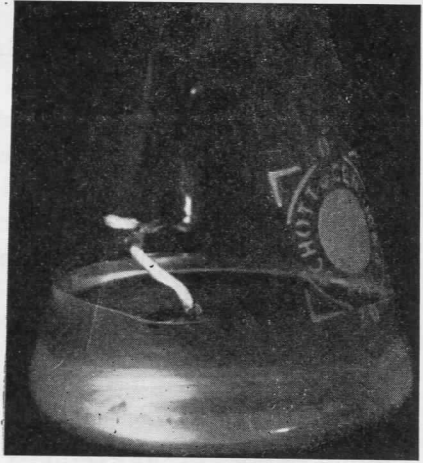
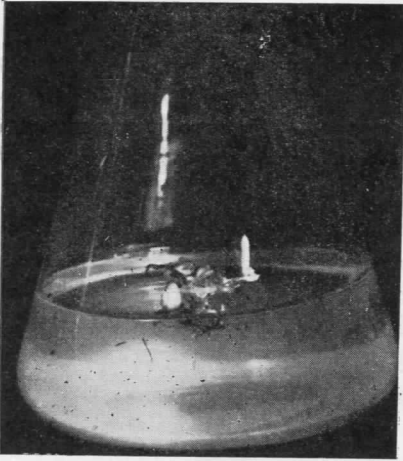


Fig. 1. — Brotes de papas cultivados «in vitro», en oscuridad, que han formado tubérculos aéreos. Obsérvese que no han formado raíces y que el crecimiento de los tallos ha sido escaso. Los brotes de papas sembrados provienen de tubérculos incubados.

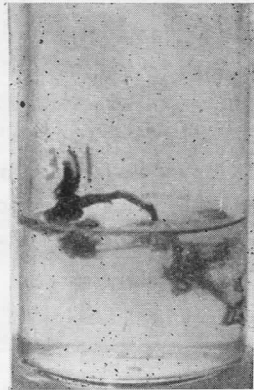
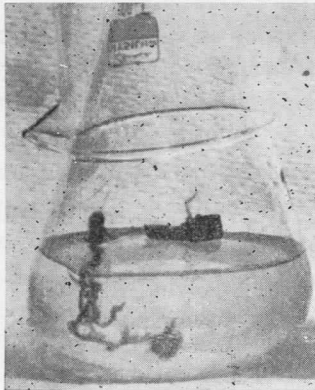


Fig. 2. — Brotes de papas cultivados «in vitro», en oscuridad, que han formado tubérculos sumergidos. Los brotes sembrados no forman raíces. En los tubérculos sumergidos producen proliferaciones de células. Los brotes sembrados provienen de tubérculos incubados.

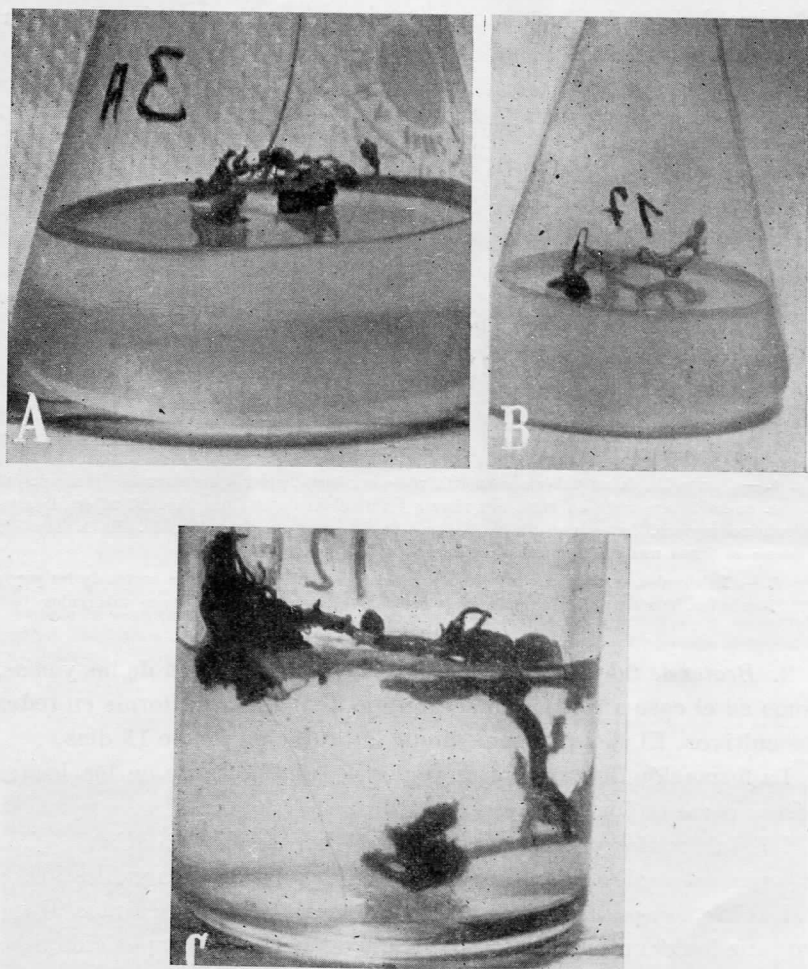


Fig. 3. — Brotes de papas cultivados « in vitro », en oscuridad. A y B, forman tubérculos aéreos en cadena. C, produce tubérculos en cadena semi-sumergidos y sumergidos; nótese las proliferaciones de los tubérculos sumergidos. Los brotes sembrados no originan raíces y provienen de papas incubadas.

brado, en lugar de seguir engrosando, produjo en su base una yema, la cual, después de crecer 1 cm, formó un nuevo tuberculito (fig. 4).

En otro cultivo en el que se había sembrado solamente el tubérculo, éste brotó después de 3 meses originando tallos, y sobre éstos un nuevo tubérculo (fig. 5).

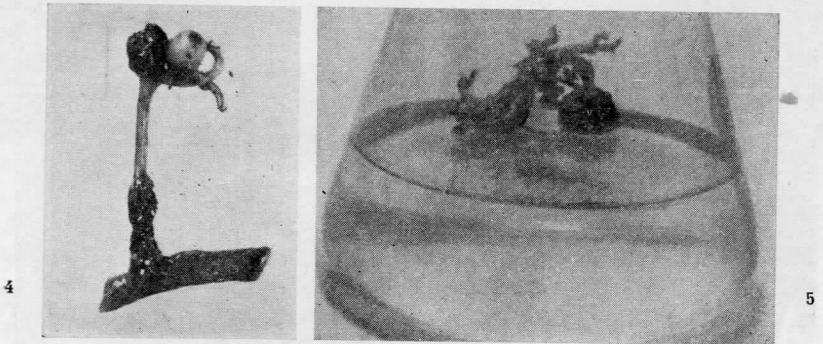


Fig. 4. — Formación de un tubérculo en cultivos « in vitro », crecido en oscuridad y sacado del agar. Se había sembrado un brote con rizoma y un tubérculo en formación. El tubérculo sembrado no engrosa, forma uno nuevo después de la brotación del tubérculo. En la base del rizoma se forma una proliferación de células.

Fig. 5. — Tubérculos cultivados « in vitro » que se encontraban en algunos brotes de las papas incubadas. Forman tallos después de la brotación y sobre éstos se forman tubérculos

2. *Brotos de tubérculos no incubados.* — La brotación de las yemas, como en el caso anterior, no se produjo de manera uniforme en todos los cultivos. El tiempo promedio de la brotación fué de 15 días.

La formación de nuevos tubérculos se produjo tanto en los brotes aéreos como en los sumergidos (fig. 6).

Los tubérculos y tallos sumergidos forman en la periferia un tejido esponjoso de color claro, que a veces se desprende de aquéllos.

Los brotes aparecidos antes de la formación de tubérculos alcanzan una longitud que oscila entre 20 y 22 cm, en contraposición a los brotes de los cultivos de las series anteriores, que no alcanzan a los 6 cm.

Los tuberculitos formados tenían diámetros mayores que en la serie anterior: uno de estos tubérculos alcanzó 1,4 cm de diámetro.

Los brotes sembrados formaron numerosas raíces que aparecen 3 a 4 días antes que la yema caulinar. Las raíces alcanzaron una longitud promedio de 5 cm. No se observó la formación de tubérculos en cadena, como en el caso anterior.

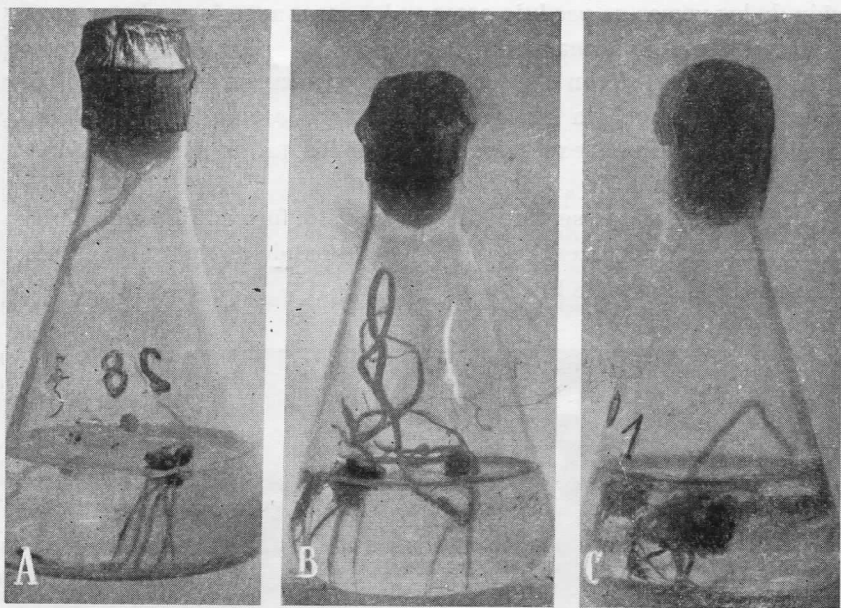


Fig. 6. — Formación de tubérculos sobre brotes sembrados provenientes de papas no incubadas, crecidos en oscuridad. A y B, tubérculos aéreos. C, tubérculos sumergidos. Forman numerosas raíces. Los brotes sembrados originan tallos de alrededor de 20 cm. B y C, forman abundantes proliferaciones en las partes sumergidas.

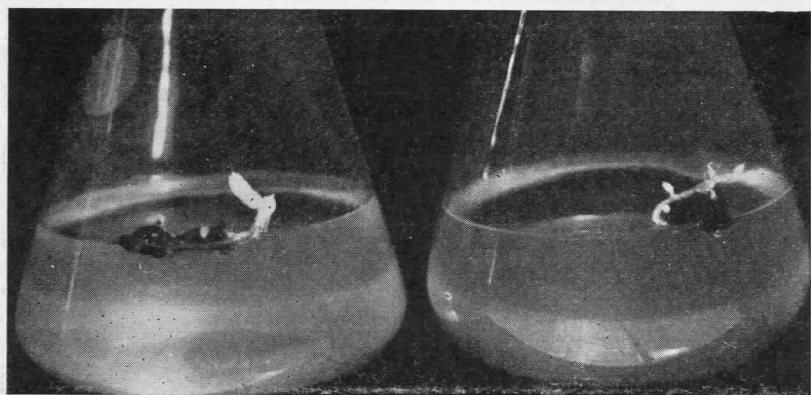


Fig. 7. — Formación de tubérculos sobre brotes provenientes de tubérculos formados sin follaje e incubados. Los tallos que crecen de los brotes sembrados son los que alcanzan longitudes menores en las series estudiadas en este ensayo. No forman raíces.]

3. *Brotos de tubérculos formados sin follaje e incubados.* — La brotación de las yemas se produjo como en los casos anteriores. La mayoría de los cultivos no formaron raíces.

Los tallos crecieron en forma lenta y alcanzaron una longitud promedio de 2 cm, la más pequeña observada en este trabajo. Los tubérculos se forman exclusivamente en los tallos aéreos, después de los 80 días (fig. 7).

En un cultivo se sembró un tuberculito formado en uno de los brotes, el cual brotó después de 25 días formando un nuevo tubérculo, después de 4 meses de la siembra (fig. 8).

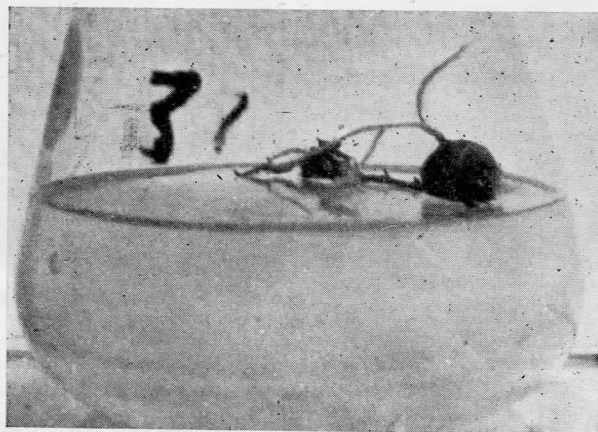


Fig. 8. — Igual que figura 5. Tubérculo formado directamente por otro proveniente de papa incubada y sin follaje. A su vez produce « in vitro » un nuevo tuberculito

4. *Cultivos con brotes de Ullucus.* — En nuestros ensayos la tuberización ocurrió en una forma similar a la de los brotes de papa.

El crecimiento se inició después de 20 días de la siembra. Los brotes alcanzaron mayor longitud que en la papa. Algunos cultivos formaron raíces más numerosas y largas; en cambio, en otros, los brotes crecieron sin formar raíces.

La tuberización se produjo después de 3 a 4 meses de la siembra.

Los tubérculos se formaron indistintamente en los brotes aéreos y sumergidos (fig. 9).

DISCUSIÓN

Con respecto a la tuberización, en nuestros ensayos se obtuvo la formación de tubérculos *in vitro* a partir de brotes, igual que en los trabajos de otros investigadores.

Según Mes y Menge (1954), el factor que influiría en la formación de raíces, sería la humedad. Nosotros nos inclinamos a pensar que un factor muy importante, que debe tenerse en cuenta en estos trabajos, ya se trate de la producción de raíces, de tallos o de tubérculos,

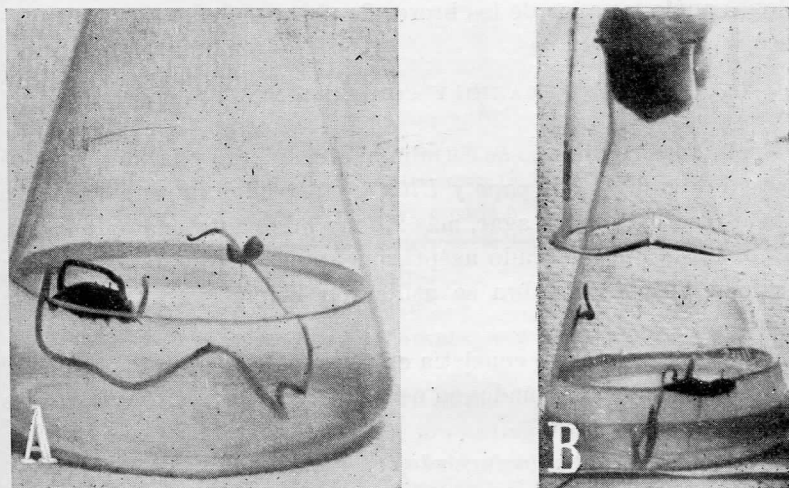


Fig. 9. — Tubérculos formados sobre brotes de *Ullucus* cultivados «in vitro», en oscuridad.
A, tubérculos axilares aéreos. B, tuberización en el ápice de un tallo sumergido

es la edad o evolución del brote unido al tubérculo madre, como lo demostraron Madec y Perennec (1955), que sembraron papas en distintos estados de incubación y encontraron diferencias profundas en el comportamiento ulterior de las plantas. En el crecimiento de brotes *in vitro* ocurriría un hecho semejante, puesto que debería tenerse en cuenta si el brote que se va a cultivar es extraído cuando comienza a brotar el tubérculo madre o cuando éste se acerca al estado de incubación.

Los cultivos sembrados con brotes de tubérculos incubados (figs. 1, 2 y 3), se desarrollan escasamente comparándolos con aquellos extraídos de papa no incubada (fig. 6).

Estos hechos nos inducen a pensar que nos encontramos en pre-

sencia de un fenómeno de correlación, es decir, que cuando los brotes se encuentran en condiciones para la formación de tubérculos, disminuye su capacidad de crecimiento y de formación de raíces.

La formación de los tubérculos tuvo lugar después de 60 días de la siembra, coincidiendo aproximadamente con los resultados obtenidos por Chapman (1955), no así con los de Barker (1953). Además, se produjo tanto en los brotes extraídos de tubérculos originados de plantas normales, con follaje, cuanto en los extraídos de tubérculos formados sin follaje y en la oscuridad, infiriéndose que el follaje no es necesario para el proceso que estamos estudiando.

En nuestros ensayos, la tuberización del *Ullucus* acontece en condiciones análogas a las de los brotes de papa.

SUMARIO Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se estudia el crecimiento y la formación de tubérculos en brotes de papa y *Ullucus* cultivados *in vitro* en medio de White en 0,75 % de agar, más 2,5 mg/l de pantotenato de calcio.

El material fué sembrado asépticamente por medio de hipoclorito de calcio. Para la siembra se utilizaron Erlenmeyer y frascos de 200 cc.

El material sembrado consistía en :

1° Brotes de papa formados en oscuridad y tuberculitos originados sobre estos brotes.

2° Brotes no incubados formados en oscuridad.

3° Brotes formados en oscuridad, provenientes de tubérculos formados sin follaje, y algunos tuberculitos que se habían formado sobre éstos.

4° Brotes de *Ullucus* formados en oscuridad.

Para la siembra se utilizaron nudos y pequeños tuberculitos. Cada frasco de cultivo contenía 100 cc del medio de White, colocándolos después de la siembra en oscuridad y a 20 grados de temperatura.

Se formaron tubérculos en los cultivos sembrados con material proveniente de las 4 series experimentadas.

El crecimiento de los tallos de los brotes de papa no incubada fué mayor (promedio 20 cm) que el de los tallos de los brotes de papa incubada (promedio 3 cm).

Los cultivos sembrados de papa no incubada formaron numerosas raíces. La mayor parte de los cultivos de papa incubada no formó raíces.

Tubérculos en cadena o secundarios se formaron en los cultivos de brotes de papa incubada.

Se explica la diferencia de comportamiento de los brotes según el estado de desarrollo en que se encuentren.

En los brotes y tubérculos sumergidos se desarrollan proliferaciones de tejidos no diferenciados.

Tuberculitos sembrados brotan, forman tallos y nuevos tubérculos.

Se obtuvieron *in vitro* tubérculos después de tres generaciones sin follaje. Se infiere que la parte aérea no es necesaria para la tuberización.

En los brotes de *Ullucus* se desarrollan tubérculos en condiciones semejantes a las de brotes de papa.

Summary and conclusions¹. — In the present paper a study of the formation and growth of tubers in potato sprouts and *Ullucus* tubers « *in vitro* » cultures was made. White's medium was utilized to this purpose. Agar (0,75 per cent) and calcium pantothenate (2,5 mg/l) were added.

The material was rendered aseptic by means of calcium hypochlorite and then was placed on the medium. Erlenmeyer flasks and bottles (200 ml) were used as containers for the cultures.

The following materials were sown :

1° Potato sprouts grown in the darkness and little tubers originating from these sprouts.

2° Sprouts without incubation grown in the darkness.

3° Sprouts grown in the darkness, proceeding from tubers developed without foliage, and in part from little tubers grown on those sprouts.

4° *Ullucus* sprouts grown in the darkness.

For planting sprout nodes and little tubers were used. Each culture bottle contained 100 ml of White's medium, and after sowing was placed in the darkness at a temperature of 20 degrees C.

Tubers grew in the cultures sown with material from the four above-mentioned series.

The rate of growth of the stems developed in the sprouts from the potatoes without incubation was greater (20 cm mean average) than the stems from the sprouts developed from potatoes with incubation (3 cm mean average).

The cultures sown with potatoes without incubation grew numerous roots.

The majority of the cultures from potatoes with incubation did not form roots.

¹ Vertido al inglés por el profesor Ricardo D. Rodríguez.

Secondary or chain tubers were formed upon the sprout cultures from the incubated potatoes.

The different behaviour of the sprouts is explained with reference to the conditions of its development.

Immersed sprouts and tubers developed proliferations of undifferentiated tissues.

The little tubers sown germinated, and grew stems and new tubers.

It was possible to get tubers «in vitro» after three generations without foliage. It is inferred that aerial components are not necessary for tuberization.

Ullucus sprouts developed tubers in a manner similar to that of the potato sprouts.

BIBLIOGRAFIA

1. BARKER, W. G. (1953). *A method for the «in vitro» culturing of potato tubers.*— *Science*, **118** : 384-385.
2. CHAPMAN, H. W. (1955). *Potato tissue cultures.* — *Amer. Potato Jour.*, **32** : 207-210.
3. MADEC, P. ET PERENNEC (1955). *Les possibilités d'évolution des germes de la pomme de terre et leurs conséquences.* — *Ann. Amél. Plantes*, **4** : 555-574.
4. MAGROU, J. (1938). *Sur la tuberization de la pomme de terre.* — *Comp. Rend. Soc. Biol.*, **127** : 793-796.
5. MES, M. G. AND MENGE, I. (1954). *Potato shoot and tuber cultures «in vitro».*— *Phys. Plantarum*, **7** : 637-650.
6. WHITE, P. R. (1943). *A handbook of plant tissue culture.* The Ronald Press Co. 277 págs.