

Esterilización, establecimiento y microtuberización *in vitro* de la papa *Solanum chaucha* var. 'Negra yema huevo'.

Sterilization, establishment and microtubering *in vitro* of potato *Solanum chaucha* var. 'Negra yema huevo'.



Trabajo de Fin de Grado

ÓSCAR PERDOMO SOSA

Tutorizado por Juan Felipe Pérez Francés y Emma Suárez Toste.
Grado en Biología. Julio 2020.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	1
Introducción	2
Datos generales de la papa y de su historia en Canarias.	2
Cultivo <i>in vitro</i> frente a métodos tradicionales.	4
Microtuberización.	5
Objetivos	6
Material y Métodos	6
Material vegetal.	6
Esterilización del material vegetal.	6
Diseño de los medios empleados.	8
Siembra.	10
Condiciones de cultivo.	10
Análisis estadístico.	10
Resultados y discusión	11
Estudio de diferentes protocolos de esterilización.	11
Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Solanum chaucha</i> variedad ‘Negra yema huevo’. Relación entre los protocolos de esterilización y el crecimiento de los explantes.	13
Microtuberización <i>in vitro</i> de <i>Solanum chaucha</i> var. ‘Negra yema huevo’.	14
Conclusiones	26
Conclusions	27
Bibliografía	27

Resumen

La papa es uno de los cultivos más importantes en el mundo y en Canarias, y en este trabajo tratamos de optimizar un protocolo de esterilización y de microtuberización para la variedad ‘Negra yema huevo’ (*Solanum chaucha*). Esta variedad pertenece a las Papas Antiguas de Canarias que son Denominación de Origen Protegida (DOP). Mediante el cultivo *in vitro* de las Papas Antiguas de Canarias se puede perpetuar su germoplasma, ya que se está disminuyendo su cultivo, y ello supondría una pérdida incalculable. Para la esterilización del material vegetal se idearon 4 protocolos combinando diferentes concentraciones de lejía (< 5% hipoclorito sódico) y fungicida (16,7 g/L difenoconazol) para intentar eliminar la contaminación procedente de campo. Los protocolos con 20 ml/L de fungicida fueron los más eficaces en la esterilización, con independencia de la concentración de hipoclorito sódico. Una vez esterilizados los explantes de papa, se establecieron *in vitro* en un medio MS0, estudiándose como la esterilización pudo afectar a su crecimiento. El protocolo con las concentraciones más bajas de lejía (30 %) y fungicida (10 ml/L) resultó ser el que los explantes tuvieron un mayor crecimiento. Posteriormente se indujo la microtuberización en 12 medios con diferentes concentraciones de hormonas y sacarosa, en condiciones de luz y oscuridad, observándose que los mejores tratamientos eran aquellos que incluían en el medio 2,5 mg/L de benciladenina (BA), 8% de sacarosa y con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. El cloruro de clorocolina (CCC) a 0,5 g/L, también resultó óptimo en ciertas condiciones, pero no esencial para el desarrollo de los microtubérculos.

Palabras clave: Papas Antiguas de Canarias; cloruro de clorocolina; benciladenina; difenoconazol; hipoclorito sódico.

Abstract

The potato is one of the most important crops in the world and in Canary Islands, and in this work, we try to optimize a sterilization and microtuberization protocol for the ‘Negra yema huevo’ variety (*Solanum chaucha*). This variety belongs to the Ancient Potatoes of the Canary Islands that are Protected Designation of Origin (PDO). Through the *in vitro* cultivation of the Ancient Potatoes of the Canary Islands, their germplasm can be perpetuated, since their cultivation is decreasing, and this would represent an incalculable loss. For the sterilization of the plant material, 4 protocols were devised combining different concentrations of lye (<5% sodium hypochlorite) and fungicide (16.7 g/L diphenconazole) to try to eliminate contamination from the field. The protocols with 20 ml/L fungicide were the most effective in

sterilization, regardless of the concentration of sodium hypochlorite. Once the potato explants were sterilized, they were established *in vitro* in an MS0 medium, studying how sterilization could affect their growth. The protocol with the lowest concentrations of lye (30%) and fungicide (10 ml/L) was the one in which the explants had the highest growth. Subsequently, microtuberization was induced in 12 media with different concentrations of hormones and sucrose, in light and dark conditions, observing that the best treatments were those that included in the medium 2.5 mg/L of benzyladenine (BA), 8% of sucrose and with a photoperiod of 16 h light/8 h darkness. Chlorocholine chloride (CCC) at 0.5 g/L was also optimal under certain conditions, but not essential for the development of microtubers.

Keywords: Ancient Potatoes of the Canary Islands; chlorocholine chloride; benzyladenine; diphenconazole; sodium hypochlorite.

Introducción

Datos generales de la papa y de su historia en Canarias.

La papa (*Solanum spp.*) es un organismo vegetal perteneciente a la familia Solanaceae, la cual crea un tubérculo bajo tierra, del que se alimentan millones de personas en el mundo y que tiene un gran valor nutricional. A esta familia, también pertenecen otras especies de carácter hortícola, con valor comercial y nutricional, como son el tomate (*Solanum lycopersicum*), la berenjena (*Solanum melongena*) y los pimientos (*Capsicum spp.*) (Moreno, 2012). La papa es el tercer cultivo alimenticio más importante del mundo, por detrás del arroz y del trigo. Aproximadamente 1,4 mil millones de personas la consumen regularmente, y su producción mundial actual sobrepasa los 300 millones de toneladas métricas (International Potato Center, 2019). Por todo ello, es de gran importancia la realización de estudios de investigación sobre la papa, puesto que puede ser una gran baza para optimizar su producción, y aliviar el hambre en muchas partes del mundo, puesto que se puede sembrar en casi cualquier parte del planeta (tanto en latitud como altitud) (International Potato Center, 2019).

El cultivo de la papa tuvo su origen probablemente en las cercanías del lago Titicaca en el Alto Perú, hace más de 8 mil años, y hoy en día son ya muchos los países en desarrollo que han optado por su cultivo. Produce de 2 a 4 veces más alimento por hectárea que los cereales y es hasta 7 veces más eficiente que dichos cereales en el aprovechamiento del agua, siendo uno de los cultivos que más alimento produce por unidad de agua. Todo ello ha llevado a que sea uno de los cultivos que mayor expansión ha implementado en las últimas décadas (International Potato Center, 2019).

La papa llegó a Canarias probablemente en los primeros años de la década de 1560, pero quizás no fuera hasta 1622 cuando se extendió su cultivo, adquiriendo mayor importancia a finales de ese siglo. Fue Icod el Alto uno de los primeros sitios donde se cultivó, siendo D. Juan Bautista de Castro de las primeras personas en hacerlo (Centro de Conservación de la Biodiversidad Agrícola de Tenerife, 2020). Icod el Alto es hoy en día, uno de los lugares de Canarias donde mejor se conserva el acervo genético de las variedades de papas de Canarias (Papas Antiguas de Canarias, 2019). También hay que denotar la importancia que ha tenido este cultivo en la economía de Canarias, puesto que se cultiva en todas las islas. Incluso en el siglo XX, cuando mayor auge tuvo, se realizaban exportaciones a Reino Unido. En cambio, hoy en día el comercio se limita casi exclusivamente al ámbito local (Papas Antiguas de Canarias, 2019), aunque sigue siendo uno de los reclamos turísticos que tiene la gastronomía canaria y de la que presumen multitud de restaurantes. Puede alcanzar altos precios tanto en el comercio local, como en el peninsular, donde en ocasiones ronda 20€/Kg (ABC, 2019), con lo cual su importancia en la economía sigue vigente, y con el impulso suficiente y los estudios adecuados podría ser una gran baza para la economía canaria en el futuro.

Actualmente existen más de 4000 variedades comestibles de papa en el mundo, y 151 variedades silvestres (International Potato Center, 2019). La variedad ‘Negra yema huevo’ pertenece a las Papas Antiguas de Canarias, que son desde el año 2012, Denominación de Origen Protegida (DOP) (Papas Antiguas de Canarias, 2019) máximo reconocimiento que otorga la Unión Europea (UE) a los productos agroalimentarios de calidad diferenciada. Hay que tener en cuenta que solo hay 2 DOP de papa en toda Europa, lo cual aumenta el interés sobre el estudio de estas variedades, y la importancia de conservarlas por su singularidad, para lo cual el cultivo *in vitro* puede ser un gran aliado. Además, son pocos los estudios que se han hecho en estas variedades, pertenecientes a las especies *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum* Hawkes, *Solanum tuberosum* L. ssp. *andigena* Hawkes y *Solanum chaucha* Juz. & Buk.

En este trabajo, aunque se inició con el establecimiento de las variedades ‘Borralla’, ‘Bonita blanca’, ‘Negra yema huevo’ y ‘Colorada de бага’, finalmente se centró sólo en la variedad ‘Negra yema huevo’ (*Solanum chaucha*). Entre sus características genómicas destaca que es una especie triploide con 12 tríos de cromosomas, a diferencia del resto de variedades pertenecientes a *Solanum tuberosum* que son tetraploides. En cuanto a sus características morfológicas destaca por tener un porte más postrado que otras variedades de Papas Antiguas de Canarias y en las hojas la base del foliolo terminal es desigual. Su inflorescencia es escasa y a diferencia del resto de variedades no produce fruto. En cuanto al tubérculo que produce

presenta una piel morada, en ocasiones con manchas claras, y una carne amarilla, por la que se le da el nombre a la variedad. Tiene una forma redondeada, oval o alargada según tenga un tamaño pequeño, mediano o grande respectivamente, y produce grelos violetas de manchas blancas. Se siembra a lo largo de todo el año, pero requiere mayor humedad que el resto de variedades, y es muy apreciada en su uso culinario por su textura cremosa y sabor dulce (Ficha técnica sobre semillas de la Revista Ae. 2015: papa negra, 2019).

Cultivo in vitro frente a métodos tradicionales.

Con motivo de este estudio, planteamos el cultivo *in vitro* como alternativa a la propagación convencional de la papa, puesto que esta metodología conlleva muchas ventajas, como son la obtención de un mayor número de semilla en menor tiempo, sin esfuerzo físico y sin depender de las condiciones meteorológicas. Aunque requiere mayor tecnificación, compensa también, el valor que tiene la posibilidad de obtener semillas saneadas sin patógenos (Aslam, *et al.*, 2011), lo cual es de gran importancia para poder cultivar cualquier variedad en cualquier parte del mundo, sin que ésta presente los microorganismos o parásitos de su lugar de origen. Además, al ser un método en el que a partir del material de partida se obtienen clones de él, se puede obtener una gran cantidad de individuos con un genotipo de interés, lo cual sería provechoso para conservar el acervo genético de las Papas Antiguas de Canarias.

Una de las desventajas que presenta este método es la posibilidad de aparición de problemas de variación somaclonal, la cual aumenta cuanto mayor es el número de subcultivos, aunque también influye el método de cultivo utilizado, el material vegetal y las condiciones de cultivo, entre otras. Esto implica que a la hora de realizar un protocolo se han de estudiar todos estos factores para reducir al mínimo las variaciones genéticas que se puedan producir, lo cual puede llevar una gran inversión (George & Debergh, 2008).

Una vez optimizado el establecimiento *in vitro* se obtienen vitroplantas que pueden ser trasplantadas directamente a condiciones *ex vitro*, o utilizarse como explantes primarios para la obtención de microtubérculos. Diversos autores (Wang & Hu, 1982, Mashhadi & Moeini, 2015), destacan una mayor idoneidad de los microtubérculos a la hora de enfrentarse a los problemas de trasplante a condiciones *in vivo* o *ex vitro*. Además, los microtubérculos se pueden almacenar durante mayor tiempo que los explantes *in vitro* (Wang & Hu, 1982, Mashhadi & Moeini, 2015), y ésta es una razón más, por la que nos hemos centrado en la optimización de un protocolo en el cual se maximice su obtención.

Microtuberización.

La microtuberización es el proceso natural propio de las plantas formadoras de tubérculos trasladado al laboratorio a condiciones *in vitro*, donde se optimizan tanto las condiciones ambientales, como las concentraciones nutricionales, hormonales, etc. para la obtención de semillas asexuales y estériles de pequeño tamaño. Estas semillas son ideales para conservar su germoplasma o para transportarlas y sembrarlas sin contagiar enfermedades (saneadas), al poder someter las plantas *in vitro* a diferentes tratamientos microbicidas más específicos.

Para la correcta microtuberización de la papa se necesita la interacción adecuada entre varios factores, donde altas concentraciones de sacarosa y citoquinina son esenciales (Wang & Hu, 1982, Al-Hussaini *et al.*, 2015). Otro compuesto citado frecuentemente en la bibliografía para la obtención de microtubérculos en papa es el cloruro de clorocolina (CCC). Sharma *et al.* (1999) demostraron que la presencia de este retardante del crecimiento inducía un mayor almacenamiento de almidón en los microtubérculos, y con lo cual un mayor tamaño. Estudios como el de Wang *et al.* (2008), sugieren que la aplicación de CCC podría ser prometedora para mejorar la productividad de la papa en el campo. Esto es debido a que induce un mayor contenido en clorofila y en carotenoides en las hojas, que producen un aumento en la capacidad fotosintética, de este modo habría más fotoasimilados disponibles para apoyar el crecimiento del tubérculo.

El principal efecto del CCC es la inhibición de la síntesis de giberelinas, las cuales son inhibitoras de la tuberización. Al reducirse la síntesis de giberelinas disminuye el crecimiento y elongación de los tallos, y se estimula como prioridad el almacenamiento (Sharma *et al.*, 1999), favoreciendo la producción de microtubérculos. Además, altas concentraciones de sacarosa en los medios de microtuberización, hacen que haya más nutrientes que se puedan almacenar, favoreciendo también la microtuberización. Por último, las citoquininas favorecen la inducción y proliferación de tubérculos *in vitro* en menor tiempo, incrementando su tamaño (LLanco, 2013), puesto que estimulan las enzimas metabolizadoras del almidón, creando así un fuerte sumidero metabólico.

En base a la bibliografía consultada, en este trabajo se estudió el efecto de la presencia de sacarosa (3% y 8%), BA (0, 2,5 y 5 mg/L) y CCC (0 y 0,5 g/L) en los medios de cultivo, sobre la microtuberización *in vitro* de la variedad 'Negra yema huevo'. Además, se han comparado también los resultados de microtuberización en un fotoperiodo de 16 h luz/8 h

oscuridad, frente a los resultados obtenidos en oscuridad permanente, para cada uno de los medios de cultivo.

Objetivos

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado es la obtención de microtubérculos de *Solanum chaucha* var. ‘Negra yema huevo’. Para alcanzar este objetivo se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Estudio de un protocolo adecuado para la esterilización de grelos de *Solanum chaucha* var. ‘Negra yema huevo’.
- Estudio del efecto del protocolo de esterilización sobre la supervivencia de las plántulas de *Solanum chaucha* var. ‘Negra yema huevo’ *in vitro*.
- Estudio del efecto de la sacarosa, benciladenina, cloruro de clorocolina y la luz sobre la microtuberización *in vitro* de *Solanum chaucha* var. ‘Negra yema huevo’.

Material y Métodos

Material vegetal.

Las papas de la variedad ‘Negra yema de huevo’ se seleccionaron en campo, las cuales se desarrollaron en medianías del norte de la isla de Tenerife y se trasladaron al Área de Fisiología Vegetal (Dpto. Biología, Ecología y Fisiología Vegetal, Universidad de La Laguna), donde se almacenaron en una cámara en oscuridad a $22^{\circ}\text{C}\pm 1$ (Fig. 1), con el propósito de que formaran suficientes grelos para utilizarlos como explantes primarios.



Figura 1. Papas de la variedad ‘Negra yema huevo’ (*Solanum chaucha*) de las que se obtuvieron los grelos (yemas adventicias) para la posterior esterilización y el cultivo *in vitro*. Procedentes de agricultores de Taganana (Tenerife, Islas Canarias, España).

Esterilización del material vegetal.

Análisis preliminares:

La esterilización y establecimiento del material vegetal en los medios de cultivo *in vitro* se realizó a partir de grelos, que corresponden a yemas adventicias (Fig. 2). Inicialmente se sembraron grelos de diferentes variedades de papa procedentes de tres localizaciones de la isla de Tenerife: Taganana (‘Borralla’ y ‘Negra yema huevo’), Taborno (‘Colorada de бага’) e Icod del Alto (Bonita blanca). Debido a la elevada contaminación



Figura 2. Papas de la variedad ‘Negra yema huevo’ con grelos formados.

microbiológica obtenida se decidió desarrollar y optimizar un protocolo de esterilización para la variedad ‘Negra yema huevo’.

Se diseñaron diferentes protocolos de esterilización basados principalmente en el fungicida Duaxo® (COMPO®), cuyo principio activo es el difenoconazol (16,7 g/L), y en el hipoclorito sódico (MAMBO®), con una concentración de cloro activo menor del 5%.

Para la esterilización de los grelos se siguieron los siguientes pasos:

1. Se quitaron los grelos a las papas y después de un primer lavado con agua, se introdujeron en un recipiente con agua y Tween 80 (10 gotas/L) durante 15 min en agitación y vacío.
2. Se pasaron los grelos, previo enjuague con agua, a otro recipiente con agua destilada, en donde se añadió el fungicida a razón de 10 ml/L o 20 ml/L (Tabla 1), junto con Tween 80 (10 gotas/L), y permanecieron en agitación y vacío durante una hora. Transcurrido el tiempo se aclararon con agua los restos de fungicida.
3. A continuación, se sumergieron los grelos en etanol al 70% durante 10 segundos, y seguidamente se lavaron con agua.
4. En este paso, se procedió a la inmersión de los grelos en lejía al 30% o 50% (Tabla 1), en disolución con agua destilada w/w, junto con Tween 80 (10 gotas/L), durante un tiempo de 15 minutos en agitación y vacío.
5. Dentro de la cámara de flujo laminar se sacaron los grelos de la disolución de lejía y se les realizó tres lavados con agua destilada estéril. Uno rápido, y dos de 15 minutos.
6. En el último lavado se dejaron los grelos en el agua, y se sacaron posteriormente para ser cortados en segmentos nodales, lo cual, se realizó sobre placas de Petri o papel de filtro, previamente autoclavados. Por último, los segmentos nodales se sembraron en el medio de establecimiento.

La Tabla 1 muestra las variaciones en la concentración de lejía y fungicida de los cuatro protocolos de esterilización empleados.

Tabla 1. Concentración de lejía y fungicida empleada en los diferentes protocolos ensayados para la esterilización de los grelos de *Solanum chaucha* var. ‘Negra yema huevo’.

PROTOCOLOS	LEJÍA (%)	FUNGICIDA (ml/L)
1	30	10
2	30	20
3	50	10
4	50	20

Diseño de los medios empleados.

En todos los casos se empleó como medio basal el medio propuesto por Murashige & Skoog (1962) (MS).

Tabla 2. Composición de las soluciones concentradas realizadas para la elaboración del medio de Murashige & Skoog (1962) (MS):

MACRONUTRIENTES I: (g/L)		MACRONUTRIENTES II: (g/L)	
KNO ₃	19,0	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4,4
NH ₄ NO ₃	16,5		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,7		
H ₂ KPO ₄	1,7		
MICRONUTRIENTES I:(mg/L)		MICRONUTRIENTES II: (mg/L)	
H ₃ BO ₃	620	EDTA-Na ₂	3730
KI	83	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2780
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2230		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	860		
MoO ₄ Na ₂ ·2H ₂ O	25		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,5		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,5		
VITAMINAS Y AMINOÁCIDOS: (mg/L)			
Ácido nicotínico			50
Tiamina (vit. B1)			10
Piridoxina (vit. B6)			50
Glicina			200

Una vez preparadas las soluciones concentradas de la Tabla 2 se almacenaron en la nevera. Para elaborar los medios de cultivo se utilizaron 100 ml/L de solución de macronutrientes I y II y 10 ml/L de solución madre de micronutrientes I y II y de vitaminas y aminoácidos. Además, para completar las vitaminas del medio MS se añadió meso-inositol (100 mg/L), vitamina esencial para el correcto desarrollo vegetal.

Fase de establecimiento.

Para la elaboración de los medios de cultivo para el establecimiento del material vegetal se utilizó el medio MS nombrado anteriormente, al que denominaremos MS0 (medio MS sin hormonas). Se añadió también sacarosa (3%), como fuente de carbono, y agar (0,9%), como agente gelificante. Finalmente se ajustó el pH en torno a 5,9-6,2 y se distribuyeron los medios en tubos de ensayo, a razón de 12 ml aproximadamente por tubo. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1 atm de presión durante 20 minutos.

En esta fase, los grelos previamente esterilizados se cortaron utilizando bisturí, con un tamaño aproximado de 1 cm, y se sembraron en contacto con el medio, pero sin enterrarlos demasiado.

Se sembraron entre 28-57 segmentos nodales por tratamiento de esterilización y se realizaron dos repeticiones (en total hubo entre 82 y 90 segmentos nodales sembrados por tratamiento). Los parámetros estudiados en esta fase fueron el porcentaje de contaminación, el porcentaje de viabilidad (explantes vivos y funcionales, con crecimiento), porcentaje de explantes sin crecimiento y la longitud de las plántulas a las 4 semanas de cultivo.

Fase de microtuberización.

Para el desarrollo de microtubérculos se empleó también el medio MS, pero variando y añadiendo diferentes componentes. En la Tabla 3 se desglosan todos los tratamientos empleados.

Tabla 3. Tratamientos empleados para la fase de microtuberización de *Solanum chaucha* var. 'Negra yema huevo'.

Tratamientos	Sacarosa (%)	BA (mg/L)	CCC (g/L)	Condiciones de cultivo
1	3	---	---	Oscuridad
2	3	---	---	Luz
3	3	---	0,5	Oscuridad
4	3	---	0,5	Luz
5	8	---	---	Oscuridad
6	8	---	---	Luz
7	8	---	0,5	Oscuridad
8	8	---	0,5	Luz
9	3	2,5	---	Oscuridad
10	3	2,5	---	Luz
11	3	2,5	0,5	Oscuridad
12	3	2,5	0,5	Luz
13	8	2,5	---	Oscuridad
14	8	2,5	---	Luz
15	8	2,5	0,5	Oscuridad
16	8	2,5	0,5	Luz
17	3	5	---	Oscuridad
18	3	5	---	Luz
19	3	5	0,5	Oscuridad
20	3	5	0,5	Luz
21	8	5	---	Oscuridad
22	8	5	---	Luz
23	8	5	0,5	Oscuridad
24	8	5	0,5	Luz

Como se puede observar en la Tabla 3, los parámetros variables del estudio son las concentraciones de sacarosa, BA y CCC, además de la presencia o no de luz en las condiciones de cultivo.

Se empleó como material vegetal las plántulas obtenidas en la fase de establecimiento. En este caso se sembraron 24 segmentos uninodales por medio de cultivo. En cada medio se colocó la mitad de los tubos de ensayo en total oscuridad, y la otra mitad con fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad y se mantuvieron en estas condiciones durante 84 días. Al finalizar este periodo se contabilizó el número de microtubérculos por explante, su calibre, su peso fresco y el número de ojos.

Todos los medios antes de la siembra fueron esterilizados en el Autoclave Presoclave 75L de la marca P-Selecta®, además de los utensilios de trabajo. Este aparato es de suma importancia para eliminar toda clase de contaminación microbiológica, así como de posibles esporas, puesto que durante 20 minutos alcanza una temperatura de 121°C y 1 atm de presión. Por todo esto, es esencial para el correcto desarrollo del cultivo *in vitro*.

Siembra.

La siembra se realizó en una cámara de flujo laminar de la marca ADS LAMINAIRE, la cual está dentro de un pequeño cuarto que en ausencia de personas permanece con una luz ultravioleta encendida en lo alto y otra luz ultravioleta dentro de la cámara de flujo laminar, con el fin de mantener las condiciones asépticas a la hora de sembrar. También, pinzas y bisturís se esterilizaron frecuentemente durante la siembra, con un esterilizador eléctrico de bolas de cuarzo que alcanza hasta 254°C.

Condiciones de cultivo.

Las vitroplantas permanecieron en la cámara de cultivo en unas condiciones estables que consistían en un 70% de humedad relativa, 21°C de temperatura, con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, proporcionado por unos fluorescentes con luz blanca con una intensidad lumínica de $110 \mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$. Los cultivos que durante la fase de microtuberización permanecieron en oscuridad se forraron con papel de platina.

Análisis estadístico.

El análisis de los datos de todos los parámetros evaluados se llevó a cabo con el programa informático IBM SPSS Statistics Base (versión 22.0) con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$). Para los porcentajes de viabilidad, contaminación y explantes sin crecimiento y para el tamaño de las plantas, una vez verificada la normalidad y la homocedasticidad, se realizó el análisis de varianza (ANOVA una vía) de los datos, llevando a cabo comparaciones múltiples con el test de Duncan como prueba Post hoc.

Las medias del número de microtubérculos por planta, calibre, peso fresco, y número de ojos por microtubérculo se analizaron mediante la prueba T-Student.

Resultados y discusión

Estudio de diferentes protocolos de esterilización.

La esterilización de los grelos de las variedades ‘Borralla’, ‘Bonita blanca’ y ‘Colorada de бага’ se realizó empleando hipoclorito sódico 1% en base a los protocolos establecidos por Miller & Lipschutz (1984), Naik & Chandra (1993) y Villafranca *et al.* (1998). Sin embargo, en nuestro caso se obtuvieron elevados porcentajes de contaminación, por lo que se decidió optimizar el protocolo centrándonos solamente en la variedad ‘Negra yema huevo’. En base a artículos como el de Hernández-Castillo *et al.* (2008) se decidió aumentar las concentraciones de hipoclorito sódico hasta 2,5% (lejía 50%, con 5% de cloro activo), combinado con un incremento de las concentraciones de fungicida.

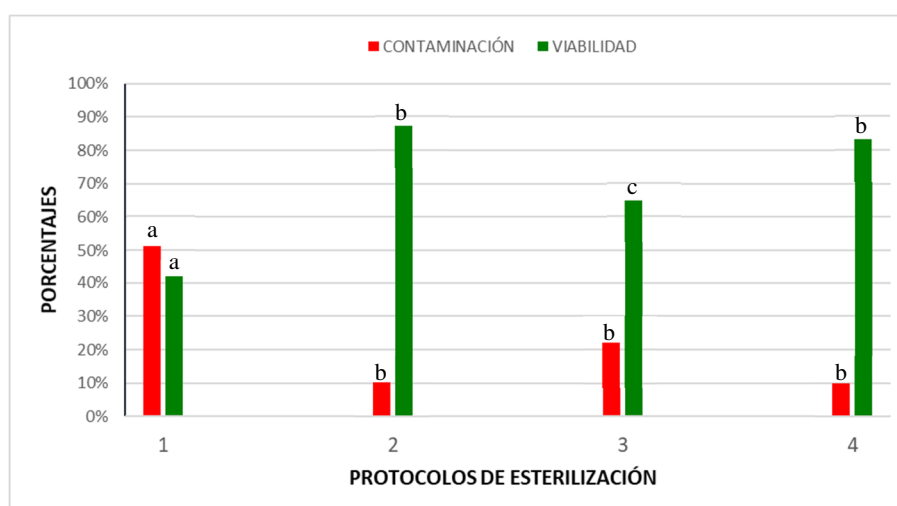


Figura 3. Porcentajes de viabilidad y de contaminación de cada tratamiento de esterilización obtenidos para la var. ‘Negra yema huevo’ a las 4 semanas de la siembra de los explantes. Los explantes que se consideraron viables fueron aquellos que desarrollaron crecimiento vegetativo y no presentaron contaminación. 1: 30% lejía y 10 ml/L de fungicida; 2: 30% lejía y 20 ml/L de fungicida; 3: 50% de lejía y 10 ml/L de fungicida; 4: 50% de lejía y 20 ml/L de fungicida en referencia a la Tabla 1. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Si analizamos la eficacia de los tratamientos (Fig. 3) respecto a la contaminación, vemos que los protocolos 2-4 son igual de adecuados estadísticamente, y que el protocolo 1 es significativamente peor que éstos a la hora de esterilizar los explantes, debido a las menores concentraciones de esterilizantes. Pero hay que tener en cuenta que la eficiencia del tratamiento de esterilización no solo influye en que los explantes no se contaminen, sino que tampoco resulten dañados por los agentes esterilizantes (Tabla 4), por ello no solo hemos incluido el dato de contaminación, sino también el de viabilidad (Fig. 3). Se obtuvieron en este caso unos resultados ligeramente diferentes, ya que los protocolos 2 y 4 (los de mayor concentración de

fungicida) son significativamente mejores que los protocolos 1 y 3 (los de menor concentración de fungicida), mostrando una mejor viabilidad al aumentarse el fungicida, independientemente de la concentración de hipoclorito sódico.

Este dato es interesante, puesto que, en muchos protocolos de esterilización, como en Miller & Lipschutz (1984), Naik & Chandra (1983) y Villafranca *et al.* (1998) solo se centran en un compuesto clorado y en ocasiones también etanol, y en casos en los que el material de campo tenga mucha contaminación microbiológica, como por ejemplo en muestras vegetales que crecen bajo tierra, como es nuestro caso, se hace necesario utilizar un protocolo de esterilización más agresivo. Pero muchos se centran en un compuesto clorado, por ejemplo, determinando si es más efectivo el hipoclorito de sodio o el dicloruro de mercurio (Badoni & Chauhan, 2010). Sin embargo, observando nuestros datos quizás sería más efectivo centrar la esterilización en el fungicida. Así que queda mucho por avanzar en el estudio de los agentes esterilizantes, ya que de su correcto uso dependen muchas investigaciones. También hay que tener en cuenta que la toxicidad de los fungicidas es alta, así que su uso se ha de hacer con responsabilidad y por necesidad. Por ello también podría ser provechoso la investigación en fungicidas, para encontrar compuestos menos tóxicos y que se puedan adaptar a este tipo de protocolos y así contribuir con el medio ambiente.

Hay que tener en cuenta también, que aumentando la concentración de esterilizantes se corre el riesgo de dañar los tejidos vegetales. Encontrar el equilibrio entre la correcta esterilización del material vegetal y la muerte celular, puede ser en ocasiones complejo, y la línea que separa un protocolo óptimo de uno que no lo es, puede ser muy delgada. En nuestro caso como se ve en la Tabla 4 los protocolos en los que se emplearon 20 ml/L de fungicida no solo disminuyeron los porcentajes de contaminación, sino que parece que además conllevaron menor muerte celular.

Tabla 4: Comparativa entre protocolos de esterilización sobre el número explantes sin crecimiento y el porcentaje sobre el total de no contaminados, asociándolo al posible daño celular causado por los agentes esterilizantes.

PROTOCOLOS	LEJÍA (%)	FUNGICIDA (ml/L)	Nº (%) DE EXPLANTES SIN CRECIMIENTO
1	30	10	6 (13,95%) ^{ab}
2	30	20	2 (2,56%) ^b
3	50	10	11 (17,19%) ^a
4	50	20	6 (7,41%) ^{ab}

Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Nuestros datos (Tabla 4) parecen indicar que los valores más altos de lejía producen un mayor daño en los tejidos que los de fungicida, puesto que el número de explantes muertos o sin crecimiento es mayor en los protocolos con 50% de lejía que en los de 30%, y aunque no se observe diferencias significativas entre los protocolos 1 y 3 y entre los protocolos 2 y 4, sí que hay diferencias significativas entre el protocolo que presentó más explantes sin crecimiento (Protocolo 3 - 50% lejía) y el que menos (Protocolo 2 - 30% lejía). Sin embargo, esta correlación no se observa con el aumento de la concentración de fungicida, es más ocurre todo lo contrario, al aumentar el fungicida hay menos explantes sin crecimiento, pero seguramente no haya una correlación directa de a mayor fungicida menor muerte celular. Aunque sí se podría decir, que, a la hora de abordar la esterilización de un material vegetal con gran contaminación fúngica, podría ser más efectivo aumentar la concentración de fungicida, que la de hipoclorito sódico.

Establecimiento in vitro de Solanum chaucha variedad 'Negra yema huevo'. Relación entre los protocolos de esterilización y el crecimiento de los explantes.

La medida de la longitud de las plántulas se realizó para comprobar si los agentes esterilizantes podrían afectar al desarrollo y crecimiento de nuestros explantes vegetales, lo cual normalmente no se suele someter a estudio. Hay que tener en cuenta, que el número de explantes que se midieron por tratamiento esta vez dependía del protocolo de esterilización, con lo cual, la *n* será mayor en los protocolos que fueron más exitosos (38 explantes en el protocolo 1, 53 en el 3, y 76 en los protocolos 2 y 4).

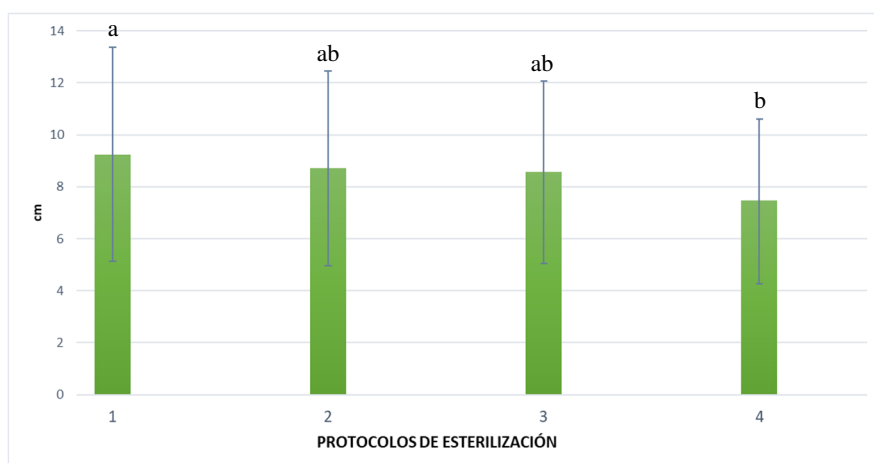


Figura 4. Tamaño de las plántulas de cada tratamiento de esterilización con la desviación estándar correspondiente a cada uno de ellos. 1: 30% lejía y 10 ml/L de fungicida; 2: 30% lejía y 20 ml/L de fungicida; 3: 50% de lejía y 10 ml/L de fungicida; 4: 50% de lejía y 20 ml/L de fungicida en referencia a la Tabla 1. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Se observó (Fig. 4) que en el protocolo con las concentraciones más bajas de ambos agentes esterilizantes (1) se obtuvieron las plántulas de mayor tamaño y en el protocolo con las concentraciones más altas de ambos (4) las de menor tamaño, observándose diferencias

significativas entre ambos. En los protocolos intermedios (2 y 3) no se observaron diferencias significativas con respecto a los demás, pero los tamaños registraron valores que se situaron entre los protocolos 1 y 4. Esto podría indicar una correlación entre la exposición a los agentes esterilizantes y el crecimiento vegetativo, disminuyendo el tamaño cuanto mayor sea la concentración de los agentes esterilizantes o el tiempo de exposición a los mismos.

Si en un estudio interesa un mayor tamaño de explantes esto podría indicar que sería más conveniente utilizar un protocolo de esterilización más suave. Pero para poder tener datos más certeros harían falta más investigaciones al respecto.

Microtuberización in vitro de Solanum chaucha var. 'Negra yema huevo'.

En este protocolo de microtuberización fueron muchos los datos que se tomaron, primeramente hemos presentado los datos más generales en una tabla, y posteriormente analizaremos cada parámetro estudiado en diferentes gráficas. Cabe destacar que la contaminación en todo el proceso fue del 0%, lo cual era de esperar ya que el material vegetal utilizado provenía de *in vitro*, y, por lo tanto, ya estaba estéril.

Tabla 5. Porcentajes de viabilidad y microtuberización obtenidos en cada uno de los tratamientos establecidos en la fase de microtuberización. El conteo de los parámetros se realizó a los 84 días de la siembra de los segmentos nodales en el medio de microtuberización. Sac.: sacarosa. Osc.: oscuridad.

TRATAMIENTOS	Viabilidad (%)	Microtuberización (%)
1 (3% Sac. y osc.)	100	0
2 (3% Sac. y luz)	100	0
3 (3% Sac., 0,5 g/L CCC y osc.)	100	0
4 (3% Sac., 0,5 g/L CCC y luz)	100	0
5 (8% Sac. y osc.)	100	16,67
6 (8% Sac. y luz)	100	8,33
7 (8% Sac., 0,5 g/L CCC y osc.)	100	58,3
8 (8% Sac., 0,5 g/L CCC y luz)	100	41,67
9 (2,5 ml/L BA, 3% Sac. y osc.)	100	0
10 (2,5 ml/L BA, 3% Sac. y luz)	91,67	0
11 (2,5 ml/L BA, 3% Sac., 0,5 g/L CCC y osc.)	100	75
12 (2,5 ml/L BA, 3% Sac., 0,5 g/L CCC y luz)	100	91,67
13 (2,5 ml/L BA, 8% Sac. y osc.)	91,67	81,82
14 (2,5 ml/L BA, 8% Sac. y luz)	91,67	90,91
15 (2,5 ml/L BA, 8% Sac., 0,5 g/L CCC y osc.)	100	91,67
16 (2,5 ml/L BA, 8% Sac., 0,5 g/L, CCC y luz)	100	100
17 (5 ml/L BA, 3% Sac. y osc.)	100	0
18 (5 ml/L BA, 3% Sac. y luz)	100	25
19 (5 ml/L BA, 3% Sac., 0,5 g/L CCC y osc.)	100	0
20 (5 ml/L BA, 3% Sac., 0,5 g/L CCC y luz)	100	50
21 (5 ml/L BA, 8% Sac. y osc.)	100	58,33
22 (5 ml/L BA, 8% Sac. y luz)	100	91,67
23 (5 ml/L BA, 8% Sac., 0,5 g/L CCC y osc.)	100	75
24 (5 ml/L BA, 8% Sac., 0,5 g/L CCC y luz)	100	83,33

En la tabla 5 se muestran los porcentajes de viabilidad (segmentos uninodales que desarrollaron crecimiento), y microtuberización (porcentaje de explantes que desarrollaron al menos un microtubérculo). Se puede observar que las condiciones y características de los explantes eran buenas, ya que la viabilidad fue casi del 100%, solo 3 segmentos uninodales de los 288 sembrados no desarrollaron crecimiento alguno. En cuanto a la microtuberización, 16 de los 24 tratamientos produjeron al menos un microtubérculo (Fig. 5).



Figura 5. Microtubérculos obtenidos de cada uno de los medios donde se produjo microtuberización y la suma del peso fresco de todos ellos en cada tratamiento (mg). T5: 8% sacarosa+oscuridad; T6: 8% sacarosa+luz; T7: 8% sacarosa+CCC+oscuridad; T8: 8% sacarosa+CCC+luz; T11: 2,5 mg/L BA+CCC+oscuridad; T12: 2,5 mg/L BA+CCC+luz; T13: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+oscuridad; T14: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+luz; T15: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+oscuridad; T16: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+luz; T18: 5 mg/L BA+luz; T20: 5 mg/L BA+CCC+luz; T21: 8% sacarosa+5 mg/L BA+oscuridad; T22: 8% sacarosa+5 mg/L BA+luz; T23: 8% sacarosa+5 mg/L BA+CCC+oscuridad; T24: 8% sacarosa+5 mg/L BA+CCC+luz.

La microtuberización desarrollada en los explantes de cada tratamiento, se analizó según cada una de las variables del estudio. En cuanto a la concentración de BA, la diferencia entre los medios donde había presencia de BA y donde no había, fue muy grande. En los medios sin hormona (tratamientos 1-8) la microtuberización fue mucho menor que en los que sí estaba presente. Con esto se demuestra que también en nuestra variedad, como en otros estudios, (LLanco (2013), Rivera *et al.* (2008), Montoya *et al.* (2008), Aslam *et al.* (2011)) la BA es muy importante para inducir la microtuberización. Aun así, también se produjo microtuberización

en los medios sin hormona, aunque con valores bajos (58,3% el más alto). Donde mayor fue, es en los medios con 2,5 mg/L, pero casi a la par en comparación con los medios de 5 mg/L.

Con respecto al CCC, en todos los medios el porcentaje de microtuberización fue mayor al añadir CCC, salvo en la comparación entre el tratamiento 22 y 24, donde el porcentaje de microtuberización disminuyó con la presencia de CCC, pero dado que solo ocurrió en uno de todos los casos, se podría decir que el CCC es propicio a la hora de inducir la microtuberización en nuestra variedad, al igual que en el estudio de Sharma *et al.* (1999). Un dato curioso ocurre en los tratamientos 10 y 12, donde la única diferencia entre ambos medios es la presencia o no de CCC, y se pasa de un 0% de microtuberización en el tratamiento 10, a un 91,67% en el tratamiento 12, que sí tenía el retardante del crecimiento. Este sería un claro ejemplo de que en ciertas condiciones el CCC es esencial para inducir la microtuberización.



Figura 6. Explantes creciendo en medio MS en las mismas condiciones y durante el mismo periodo de tiempo, pero con la diferencia de que en la imagen A los medios tienen CCC y los de la imagen B no.

Además, el CCC no solo tiene efectos en la microtuberización, sino que también afecta en el crecimiento de las plántulas al disminuirse la síntesis de giberelinas, como nombramos anteriormente. Esto se puede observar de manera más visible comparando los tratamientos 2 y 4 como se ve en la Figura 6A y Figura 6B.

Si nos centramos en el porcentaje de sacarosa, como era de esperar, la microtuberización fue mayor siempre a una concentración mayor de sacarosa. Es de reseñar lo que ocurrió en los tratamientos 11 y 12, con una concentración baja de sacarosa (3%), se consiguieron valores de microtuberización del 75% y 91,67%, respectivamente, valores bastante altos para una concentración tan baja de sacarosa, esto obviamente se consiguió junto con la combinación de BA (2,5 mg/L) y el cloruro de clorocolina (0,5 g/L), como ya mencionamos anteriormente. Y, por último, respecto a la luz, se da el dato de que con presencia de hormona el porcentaje de

microtuberización es siempre mayor en los medios expuestos a la luz, pero en ausencia de la hormona, el porcentaje es mayor en los medios sometidos a oscuridad.

Son pocos los estudios realizados en *Solanum chaucha*, lo cual nos hace difícil hablar de certezas a la hora de interpretar los resultados, pero los estudios en *Solanum tuberosum* nos sirven para hacer una comparación. Autores como Sakha *et al.* (2005), Hoque (2010), Liljana *et al.* (2012) y Mashhadi & Moeini (2015) defienden, como ya habíamos nombrado anteriormente, que una concentración alta de una citoquinina, como por ejemplo BA, junto con una concentración alta de sacarosa (8%) son factores básicos a la hora de producir la microtuberización de la papa. Incluso Rivera *et al.* (2008) consideran indispensable esa alta concentración de sacarosa. En base a esto, nuestro estudio fue mejor de lo esperado, puesto que se observaron valores altos en la producción de microtubérculos con concentraciones más bajas de sacarosa (3%), en los tratamientos 11 y 12, y valores más bajos en los tratamientos 18 y 20 (Tabla 5). De resto, los mayores tamaños y donde hubo mayor producción, efectivamente, fue en los medios donde había una concentración alta de sacarosa (8%).

En cuanto a la concentración de BA para producir la microtuberización el consenso es nulo, numerosos estudios como los de Rivera *et al.* (2008), Salem & Hassanein (2017) y Aslam *et al.* (2011) defienden una alta concentración de BA para la microtuberización, superior a 3 y 4 mg/L, llegando incluso a concentraciones de 10 mg/L (Hossain *et al.*, 2017), aunque en un sistema de inmersión temporal (SIT). Además, en el estudio de Aslam *et al.* (2011) concentraciones entre 1-3 mg/L no produjeron un efecto en la microtuberización, sin embargo, en nuestro estudio las mejores tasas de microtuberización (Tabla 5) se produjeron con una concentración de 2,5 mg/L de BA, de igual manera que en el estudio de Araque *et al.* (2018). Incluso hay investigaciones donde se dan concentraciones óptimas menores; como en el estudio de Montoya *et al.* (2008), donde el óptimo se produjo con una concentración de 1 mg/L de BA, pero en un SIT. Todo esto hace indicar que la respuesta a la concentración de BA depende mucho de la variedad de papa estudiada. En nuestro caso los medios que contenían 2,5 mg/L de BA fueron ligeramente más productivos que con 5 mg/L, lo que parece indicar que el óptimo de concentración de BA para la producción de la variedad 'Negra yema huevo' podría ser un valor por debajo de 5 mg/L.

Los datos relativos a las características de los microtubérculos desarrollados en cada medio se han dividido en función de la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo. En ambas gráficas, los datos se analizaron estadísticamente de manera independiente,

con lo cual, los análisis estadísticos no compararon las diferencias de sacarosa, ya que no todos los medios con 3% de sacarosa formaron microtubérculos y el análisis con respecto a los tratamientos con 8% de sacarosa no se podía realizar por completo. Aun así, las diferencias respecto a la concentración de sacarosa también fueron estudiadas. Las comparaciones se hicieron siempre 1 vs. 1 teniendo en cuenta tratamientos en los que solo cambiaba un factor, para poder ver como afectaba ese factor aislado.

Promedio de microtubérculos por explante:

Esta medida nos permite conocer la capacidad de los explantes para producir microtubérculos, considerando 1 el mínimo de microtubérculos que un explante puede producir.

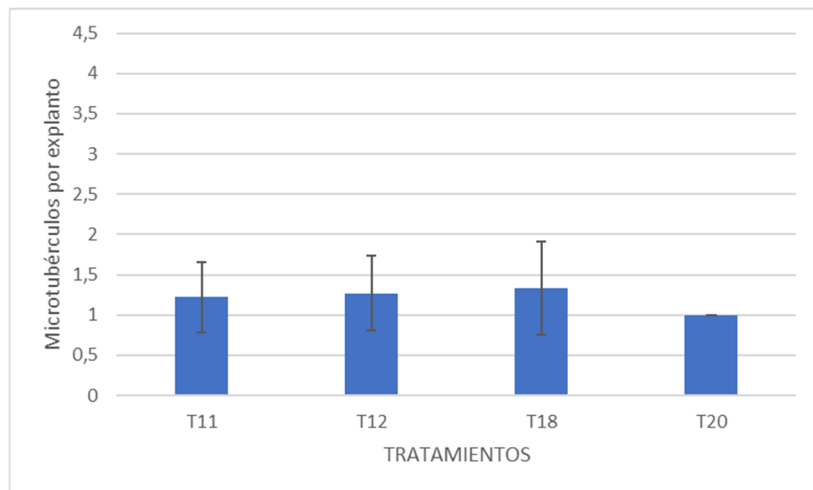


Figura 7. Promedio de microtubérculos obtenidos por explante en los medios con sacarosa al 3% durante la fase de microtuberización. T11: 3% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+oscuridad; T12: 3% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+luz; T18: 3% sacarosa+5 mg/L BA+luz; T20: 3% sacarosa+5 mg/L BA+CCC+luz. Solo han sido representados los medios que formaron microtubérculos.

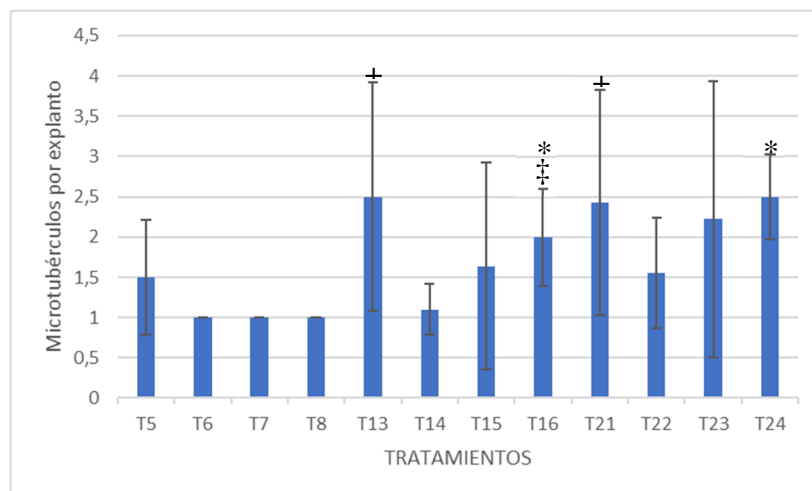


Figura 8. Promedio de microtubérculos obtenidos por explante en los medios con sacarosa al 8% durante la fase de microtuberización. T5: 8% sacarosa+oscuridad; T6: 8% sacarosa+luz; T7: 8% sacarosa+CCC+oscuridad; T8: 8% sacarosa+CCC+luz; T13: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+oscuridad; T14: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+luz; T15: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+oscuridad; T16: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+luz; T21: 8% sacarosa+5 mg/L BA+oscuridad; T22: 8% sacarosa+5 mg/L BA+luz; T23: 8% sacarosa+5 mg/L BA+CCC+oscuridad; T24: 8% sacarosa+5 mg/L BA+CCC+luz.

T6 no formó parte del estudio estadístico porque solo se desarrolló un microtubérculo en dicho tratamiento.

+ Diferencia significativa con respecto a T5 (mismo tratamiento, pero sin BA) con un $p < 0,05$.

* Diferencia significativa con respecto a T8 (mismo tratamiento, pero sin BA) con un $p < 0,05$.

‡ Diferencia significativa con respecto a T14 (mismo tratamiento, pero sin CCC) con un $p < 0,05$.

Los valores medios variaron entre 1 (T6, T7, T8 y T20) y 2,5 microtubérculos por explante (T13 y T24) (Fig. 7 y Fig. 8). Pérez-Alonso *et al.* (2001) obtuvieron de media 2,6 microtubérculos por plántula, pero teniendo en cuenta que se realizó en SIT y que era buscando una producción a gran escala, nuestros datos se pueden considerar como buenos, al menos en los tratamientos de 8% de sacarosa. En cuanto a los tratamientos con 3% de sacarosa (Fig. 7) no hubo diferencias significativas entre ninguno de ellos, aunque aparentemente los valores podrían ser menores que los tratamientos con 8% de sacarosa (Fig. 8), lo que podría indicar que la sacarosa favorece la aparición de más microtubérculos por explante. Los datos analizados en la Figura 8, muestran la posible incidencia de la BA en la formación de un mayor número de microtubérculos por explante, dado que aumenta el número en los medios donde está presente la fitohormona. Comparando los tratamientos idénticos en donde solo varía la concentración de BA, se registraron diferencias significativas en T13 (2,5 mg/L BA) y T21 (5 mg/L BA) con respecto a T5 (sin BA), y de igual manera con T16 (2,5 mg/L BA) y T24 (5 mg/L BA) con respecto a T8 (sin BA). Con T6 no se pudo realizar el análisis estadístico, porque solo se desarrolló un microtubérculo en dicho tratamiento y con respecto a T7 (sin BA) no se registraron diferencias significativas, pero aun así en ambos casos los valores medios eran mayores en los tratamientos que contenían la hormona, eso sí, no se observa diferencia entre la concentración de 2,5 mg/L y 5 mg/L de BA.

En cuanto al CCC los datos no parecen del todo concluyentes, solo en un caso se observa una diferencia significativa que denota que la presencia de CCC aumenta el número de microtubérculos por explante (T14 con respecto a T16, en condiciones de luz), pero dado que no sigue un patrón y que en muchas ocasiones el valor medio disminuye en vez de aumentar parece que el CCC, en principio no afecta al número de microtubérculos por explante, y lo mismo sucede al comparar las condiciones de luz y oscuridad.

Tamaño:

En referencia al tamaño de los microtubérculos, además del peso fresco, también se midió el calibre de los microtubérculos, puesto que muchos autores como Pérez-Alonso *et al.* (2001) e Igarza *et al.* (2014) se basan en ello para realizar sus estudios. Pero dado que el calibre y el peso hacen ambos referencia al tamaño, nos podemos centrar en el análisis hablando de uno o de otro, y puesto que nuestros microtubérculos poseen formas muy diferentes, creímos que la unidad más representativa para describir el tamaño de los microtubérculos sería el peso. Si nuestros microtubérculos tuvieran formas más redondeadas el calibre hubiera sido igual de representativo. Diversos estudios (Montoya *et al.*, 2008, Pérez-Alonso *et al.*, 2001 e Igarza *et*

al., 2014) demuestran que a mayor peso o calibre mejor comportamiento en campo. Por ello es interesante determinar el tamaño (peso y calibre) de los microtubérculos, para evaluar cuan efectivo puede ser un protocolo a la hora de sembrar la semilla en campo.

Primeramente, analizaremos los datos de los calibres medios, y posteriormente los de peso fresco medio.

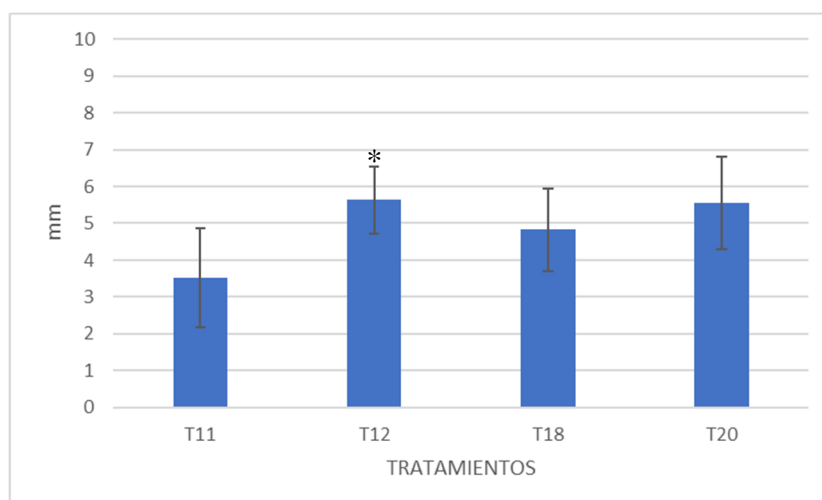


Figura 9. Calibre medio de los microtubérculos obtenidos en los medios con sacarosa al 3% durante la fase de microtuberización. T11: 3% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+oscuridad; T12: 3% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+luz; T18: 3% sacarosa+5 mg/L BA+luz; T20: 3% sacarosa+5 mg/L BA+CCC+luz.

* Diferencia significativa con respecto a T11 (mismo medio, pero en oscuridad) con un $p < 0,05$.

Solo han sido representados los medios que formaron microtubérculos.

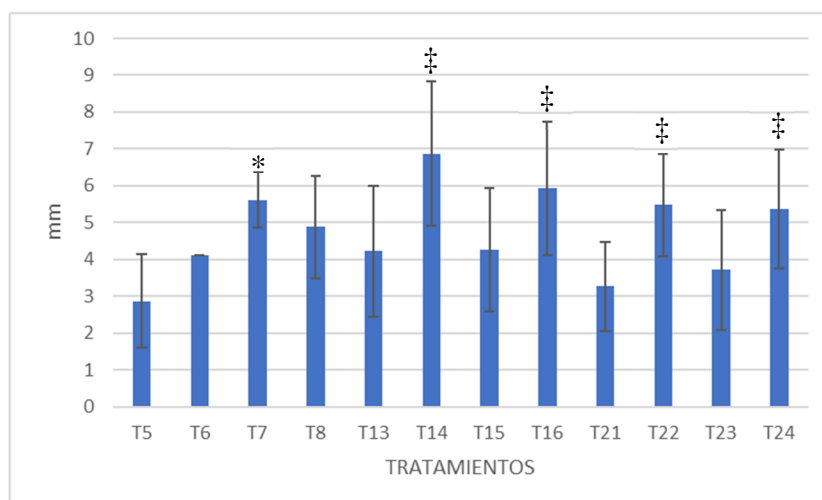


Figura 10. Calibre medio de los microtubérculos obtenidos en los medios con sacarosa al 8% durante la fase de microtuberización. T5: 8% sacarosa+oscuridad; T6: 8% sacarosa+luz; T7: 8% sacarosa+CCC+oscuridad; T8: 8% sacarosa+CCC+luz; T13: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+oscuridad; T14: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+luz; T15: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+oscuridad; T16: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+luz; T21: 8% sacarosa+5 mg/L BA+oscuridad; T22: 8% sacarosa+5 mg/L BA+luz; T23: 8% sacarosa+5 mg/L BA+CCC+oscuridad; T24: 8% sacarosa+5 mg/L BA+CCC+luz.

T6 no formó parte del estudio estadístico porque solo se desarrolló un microtubérculo en dicho tratamiento.

* Diferencia significativa con respecto a T5 (mismo tratamiento, pero sin CCC) con un $p < 0,05$.

‡ Diferencia significativa con respecto a la misma concentración de BA y CCC en oscuridad con un $p < 0,05$.

Los valores medios obtenidos respecto al calibre (Fig. 9 y Fig. 10), se situaron entre 2,87 mm (T5) y 6,87mm (T14). En estudios como el de Pérez-Alonso *et al.* (2001) solo el 21,9% de los explantes tuvo un calibre menor a 7 mm, pero en un SIT, aunque Igarza *et al.* (2014)

obtuvieron un 63,3% de supervivencia en campo para microtubérculos con diámetros comprendidos entre 4,0-6,9 mm. Con lo cual los mejores tratamientos (T12, T14, T16) podrían tener un buen comportamiento en campo, aunque habría que optimizar aún más las condiciones y los medios de cultivo para mejorar la producción a partir de esos medios de cultivo que han dado los mejores resultados, o utilizar sistemas más sofisticados como biorreactores o SIT.

Comparando los tratamientos en luz con los de oscuridad, para el mismo medio de cultivo, se observa que los calibres son mayores en condiciones de luz en todos los tratamientos que tienen BA, obteniéndose diferencias significativas en todos ellos, tanto con 8% de sacarosa como con 3% (aunque en este caso solo hay una comparación posible), lo que parece indicar que los mejores tratamientos para la producción de microtubérculos son los que están en fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad, siempre y cuando sea en combinación con BA.

También se registró un mayor diámetro de manera significativa con la presencia de CCC solamente en T7 (8% sacarosa y CCC en oscuridad) con respecto a T5 (mismo tratamiento, pero sin CCC), aunque no se observa una tendencia homogénea en el resto de tratamientos, incluso disminuye el calibre medio al estar presente el CCC (con el resto de condiciones iguales) en algunos casos.

En cuanto a la sacarosa, a pesar de no haberse comparado estadísticamente los tratamientos de 8% de sacarosa con los de 3%, se pueden observar datos curiosos. Como ya habíamos nombrado anteriormente, los medios más óptimos para producir microtubérculos son los que contenían 8% de sacarosa, y efectivamente, es en éstos donde se encuentran los tamaños más grandes, pero los resultados en los medios con 3% de sacarosa fueron mejores de lo esperado, y es que en T12 (2,5 mg/L BA y CCC en luz) se registró el tercer calibre medio más grande y en T20 (5 mg/L BA y CCC en luz) el quinto más grande. Lo cual podría hacer pensar que, con los componentes adecuados en el medio y en las condiciones correctas, concentraciones menores de 8% de sacarosa podrían ser óptimas para la microtuberización.

Y, por último, aunque no se hayan registrado diferencias significativas en cuanto a la concentración de BA, sí que se observa una pequeña disminución del tamaño en todos los medios al pasar de 2,5 mg/L a 5 mg/L (T12>T20, T13>T21, T14>T22, T15>T23 y T16>T24). Esto parece indicar que el óptimo de BA para la variedad 'Negra yema huevo' no va a estar por encima de 5 mg/L, sino a una concentración inferior a este valor. Esto se aprecia también en el porcentaje de microtuberización (Tabla 5), excepto al comparar T14 con T22, ya que el porcentaje de microtuberización es ligeramente superior en T22.

En cuanto al peso fresco, al ser una medida directamente proporcional al calibre los datos obtenidos son casi idénticos, pero al tener algunos microtubérculos formas no redondeadas e irregulares, nos centraremos más profundamente en esta medida para hacer el análisis del tamaño. Aun así, estadísticamente se obtuvieron los mismos resultados con ambas medidas.

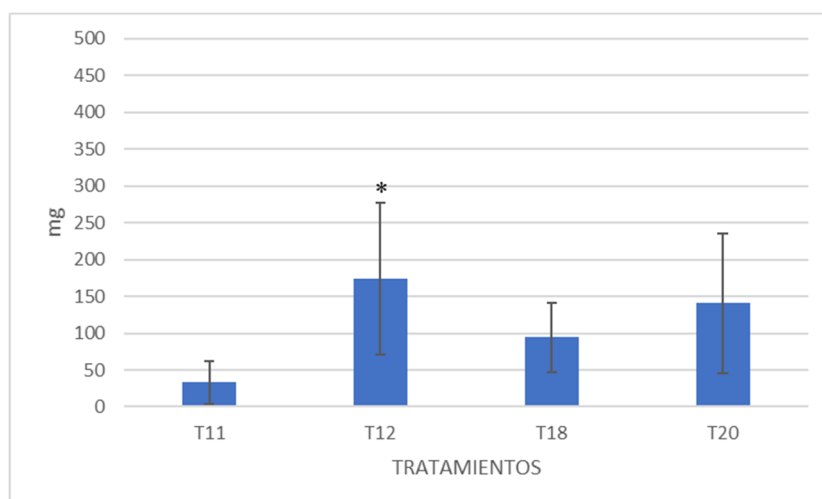


Figura 11. Peso fresco medio de los microtubérculos obtenidos en los medios con sacarosa al 3% que permanecieron durante la fase de microtuberización. T11: 3% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+oscuridad; T12: 3% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+luz; T18: 3% sacarosa+5 mg/L BA+luz; T20: 3% sacarosa+5 mg/L BA+CCC+luz.

* Diferencia significativa con respecto a la misma concentración de BA y CCC en oscuridad con un $p < 0,05$. Solo han sido representados los medios que formaron microtubérculos.

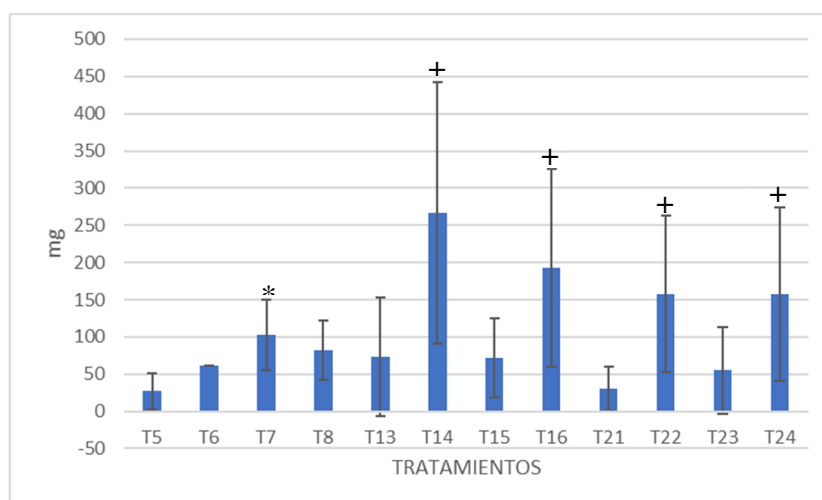


Figura 12. Peso fresco medio de los microtubérculos obtenidos en los medios con sacarosa al 8% que permanecieron durante la fase de microtuberización. T5: 8% sacarosa+oscuridad; T6: 8% sacarosa+luz; T7: 8% sacarosa+CCC+oscuridad; T8: 8% sacarosa+CCC+luz; T13: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+oscuridad; T14: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+luz; T15: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+oscuridad; T16: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+luz; T21: 8% sacarosa+5 mg/L BA+oscuridad; T22: 8% sacarosa+5 mg/L BA+luz; T23: 8% sacarosa+5 mg/L BA+CCC+oscuridad; T24: 8% sacarosa+5 mg/L BA+CCC+luz.

T6 no formó parte del estudio estadístico porque solo se desarrolló un microtubérculo en dicho tratamiento.

* Diferencia significativa con respecto a T5 (mismo tratamiento, pero sin CCC) con un $p < 0,05$.

+ Diferencia significativa con respecto a la misma concentración de BA y CCC en oscuridad con un $p < 0,05$.

Los valores medios de peso fresco (Fig. 11 y Fig. 12) de nuestros tratamientos se situaron entre 27 mg (T5) y 266,73 mg (T14), valores considerados normales en estudios como el de Ranalli (2007), el cual considera que los microtubérculos generalmente tienen una masa

fresca que oscila entre 24 y 273 mg, datos casi idénticos a los obtenidos en este trabajo. Si bien hay que tener en cuenta que a mayor tamaño mayor supervivencia (Montoya *et al.*, 2008, Igarza *et al.*, 2014). También, Al-Safadi *et al.* (2000) recomiendan para sembrar *in vivo* utilizar microtubérculos de más de 250 mg. Sin embargo, en el estudio de Montoya *et al.* (2008) los microtubérculos con una masa de 0,1 g registraron una supervivencia del 88% en campo, así que tallas menores a 250 mg podrían desarrollar crecimientos óptimos en campo. Si hacemos hincapié en los mayores pesos frescos individuales, éstos se obtuvieron en el medio de cultivo que contenía 8% sacarosa + 2,5 mg/L BA, tanto en condiciones de luz (T14, Fig. 13), como en condiciones de oscuridad (T13), 605 mg (microtubérculo más grande pesado en el estudio), y 245 mg (microtubérculo más grande en oscuridad) respectivamente. Lo cual podría indicar que este medio sería el más propicio para obtener los mayores tamaños de microtubérculos.



Figura 13. Microtubérculos correspondientes al tratamiento que desarrolló mayor tamaño (T14).

Al igual que ocurría con los datos de calibre, comparando los tratamientos en luz con los de oscuridad, para el mismo medio de cultivo, se observa que el valor de peso fresco obtenido es mayor y estadísticamente significativo en condiciones de luz respecto a oscuridad en todos los tratamientos que tienen BA, tanto con 8% de sacarosa como con 3% (aunque en este caso solo hay una comparación posible, T11-T12). Estos datos se diferencian incluso más que los de calibre, aunque presentan también una mayor desviación estándar. Todo esto termina de indicar que los mejores tratamientos para la producción de microtubérculos son los que están en condiciones lumínicas, siempre y cuando sea en combinación con BA. Esto puede ser debido a la inducción de la microtuberización por la BA sumado a poder hacer la fotosíntesis gracias a la luz. De esta manera hemos visto como el fotoperiodo afecta notablemente al desarrollo de las plántulas de ‘Negra yema huevo’, aunque quedaría por estudiar un fotoperiodo de días cortos y uno neutro.

El crecimiento en ambas condiciones fue diferente. En oscuridad el tallo crecía hialino (Figura 14A, plántula con una longitud de 5cm), de mayor o menor tamaño, dependiendo del tratamiento, pero siempre con una longitud mayor que los explantes correspondientes al medio homólogo en condiciones de luz (Figura 14B, plántula con una longitud de 3,7 cm). Uno de los

motivos que explica por qué los medios en oscuridad fueron menos productivos es que a partir de la sexta semana los microtubérculos no dieron la sensación de que siguieran creciendo y de hacerlo no se observó a simple vista. Incluso en algunos tubos de ensayo, al final del tiempo de cultivo se encontró el microtubérculo con el tallo ya seco, mientras que los microtubérculos de los explantes que permanecieron en luz aparentemente nunca dejaron de crecer, incluso en algunos de esos medios las plántulas formaron nuevos microtubérculos una vez finalizado el período establecido de 12 semanas.



Figura 14. Comparativa del crecimiento en oscuridad (A) y en fotoperiodo 16/8 (luz/oscuridad) (B). Plántulas correspondientes al medio más productivo (8% de sacarosa, 2,5 mg/L de BA y 0,5 g/L de CCC), T15 y T16 respectivamente. El callo de color amarillo situado en la base del segmento nodal estuvo presente en todos los medios con BA, siendo de mayor tamaño en los medios donde la concentración de BA fue de 5 mg/L.

Entonces, el crecimiento en oscuridad, como defienden algunos autores (Sakha *et al.*, 2005), para esta variedad no es óptimo, pero la solución podría estar en un crecimiento en condiciones mixtas, primero luz y después oscuridad (Salem & Hassanein, 2017) o a la inversa (Hossain *et al.*, 2017). Opciones como éstas podrían tener beneficios en la producción de microtubérculos en la variedad ‘Negra yema huevo’, pero habría que realizar los estudios pertinentes para comprobar si son protocolos más propicios que el empleado en este trabajo.

Respecto al CCC, al igual nuevamente que en los datos de calibre se registró un mayor peso fresco de manera significativa con la presencia de CCC solamente en T7 (8% sacarosa y CCC en oscuridad) con respecto a T5 (mismo tratamiento, pero sin CCC), aunque no se observa una tendencia homogénea en el resto de tratamientos, incluso disminuye el peso fresco medio al estar presente el CCC (con el resto de condiciones iguales) en algunos casos. Pero, como ya se mencionó, en determinadas condiciones su aplicación puede resultar fundamental (T12, por ejemplo).

En cuanto a los efectos de la sacarosa y la BA en el peso fresco (Fig. 11 y Fig. 12), los datos obtenidos también explican exactamente lo mismo que los resultados de calibre en referencia al tamaño de los microtubérculos.

Promedio de ojos por microtubérculo:

La media de ojos por microtubérculo en nuestro estudio (Fig. 15 y Fig. 16), tuvo un mínimo de 2 en T6, pero dado que en ese medio solo se desarrolló un microtubérculo, se podría excluir ese dato y decir que de media los microtubérculos presentan como mínimo 2,82 ojos por microtubérculo (T11) y 6,43 ojos por microtubérculo como máximo (T12).

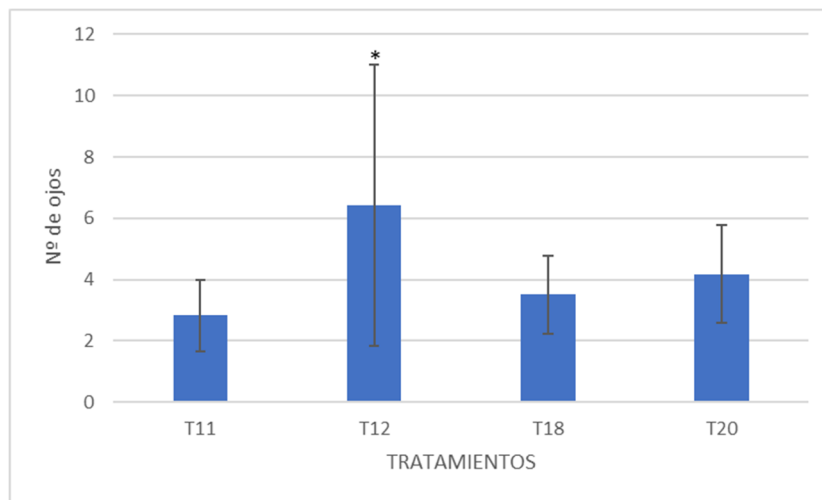


Figura 15. Promedio de ojos de los microtubérculos obtenidos en los medios con sacarosa al 3% durante la fase de microtuberización. T11: 3% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+oscuridad; T12: 3% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+luz; T18: 3% sacarosa+5 mg/L BA+luz; T20: 3% sacarosa+5 mg/L BA+CCC+luz.

* Diferencia significativa con respecto a T11 (mismo tratamiento, pero en oscuridad) con un $p < 0,05$
Solo han sido representados los tratamientos que formaron microtubérculos.

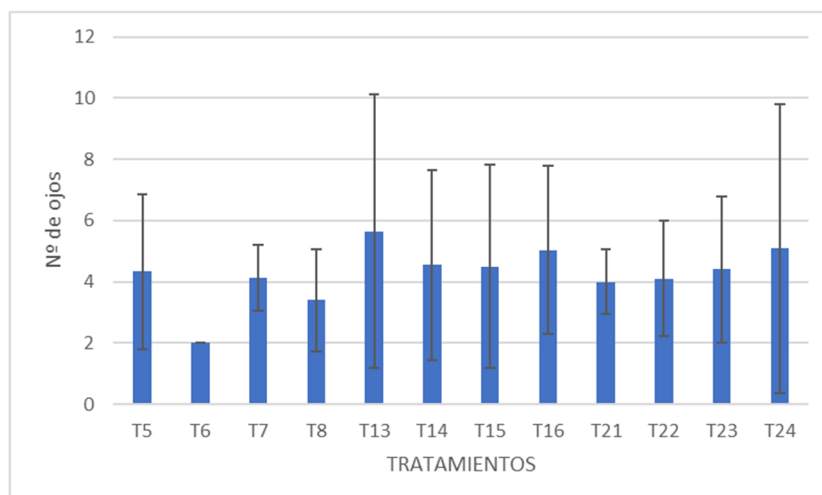


Figura 16. Promedio de ojos de los microtubérculos obtenidos en los medios con sacarosa al 8% durante la fase de microtuberización. T5: 8% sacarosa+oscuridad; T6: 8% sacarosa+luz; T7: 8% sacarosa+CCC+oscuridad; T8: 8% sacarosa+CCC+luz; T13: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+oscuridad; T14: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+luz; T15: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+oscuridad; T16: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+CCC+luz; T21: 8% sacarosa+5 mg/L BA+oscuridad; T22: 8% sacarosa+5 mg/L BA+luz; T23: 8% sacarosa+5 mg/L BA+CCC+oscuridad; T24: 8% sacarosa+5 mg/L BA+CCC+luz.

T6 no formó parte del estudio estadístico porque solo se desarrolló un microtubérculo en dicho tratamiento.

Con relación al análisis estadístico no se observan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, salvo en T12 con respecto a T11 (igual que T12, pero en oscuridad), pero seguramente sea un hecho aislado, porque no hay una tendencia que sugiera que los microtubérculos tengan más ojos en condiciones lumínicas. Así que no parece que ningún factor de estudio influya en su aumento o disminución, aunque, quizás en los medios con 2,5 mg/L de BA su número sea algo mayor, seguido de los medios con 5 mg/L de BA y en último lugar los medios sin hormona. Esto podría ser debido al tamaño de los microtubérculos, que de media es mayor en los tratamientos de 2,5 mg/L de BA.

Conclusiones

1. El tratamiento de los grelos con 20 ml/L de difenoconazol (16,7 g/L) combinado con hipoclorito sódico (30% o 50%) fue el más efectivo para la esterilización de los grelos de *Solanum chaucha* variedad 'Negra yema huevo'.
2. El posible daño celular asociado a los explantes sin crecimiento está mayormente producido por el hipoclorito sódico y no por el fungicida.
3. Los grelos esterilizados con una combinación de 30% hipoclorito sódico y 10 ml/L difenoconazol (16,7 g/L) desarrollaron, durante la fase establecimiento, plántulas de mayor tamaño.
4. La presencia de BA en el medio de microtuberización junto con una concentración alta de sacarosa (8%) resultó indispensable para inducir el desarrollo de microtubérculos de una manera notoria. El retardante del crecimiento cloruro de clorocolina, aunque no fue necesario para inducir la microtuberización sí resultó ser un potenciador de la misma.
5. El mayor número de microtubérculos por explante se obtuvo en los medios enriquecidos con la mayor concentración de sacarosa (8%) y la presencia de BA, registrándose 2,5 microtubérculos por explante en los tratamientos T13: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+oscuridad y T24: 8% sacarosa+5 mg/L BA+CCC+luz.
6. Los mayores tamaños (tanto en calibre como en peso fresco) se registraron en los medios de cultivo que contenían 2,5 mg/L de BA con fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad. Obteniéndose el valor máximo en el tratamiento T14: 8% sacarosa+2,5 mg/L BA+luz. Con un peso fresco medio de 266,73 mg y un calibre medio de 6,87 mm.
7. El número de ojos (yemas adventicias) en los microtubérculos no se vio afectado por ninguna de las variables del estudio.

Conclusions

1. Treatment of potato sprouts with 20 ml/L of diphenconazole (16.7 g/L) combined with sodium hypochlorite (30% or 50%) was the most effective for sterilization of sprouts tops of *Solanum chaucha* variety 'Negra yema huevo'.
2. The possible cellular damage associated with explants without growth is mainly caused by sodium hypochlorite and not by the fungicide.
3. Sterilized potato sprouts with a combination of 30% sodium hypochlorite and 10 ml/L diphenconazole (16.7 g/L) developed, during the establishment phase, larger seedlings.
4. The presence of BA in the microtuberization medium together with a high concentration of sucrose (8%) was essential to induce the development of microtubers in a notorious way. The growth retarder chlorocholine chloride, although it was not necessary to induce microtuberization, did prove to be a potentiator of it.
5. The highest number of microtubers per explant was obtained in the media enriched with the highest concentration of sucrose (8%) and the presence of BA, registering 2.5 microtubers per explant in treatments T13: 8% sucrose+2.5 mg/L BA+darkness and T24: 8% sucrose+5 mg/L BA+CCC+light.
6. The largest sizes (both in caliber and in fresh weight) were recorded in culture media containing 2.5 mg/L BA with photoperiod 16 h light/8 h darkness. Obtaining the maximum value in the treatment T14: 8% sucrose+2.5 mg/L BA+light. With an average fresh weight of 266.73 mg and an average caliber of 6.87 mm.
7. The number of eyes (adventitious buds) in the microtubers was not affected by any of the study variables.

Bibliografía

ABC. Papas canarias en Madrid a casi 20 euros el kilo. Consultado 29/12/19. https://www.abc.es/espana/canarias/abci-papas-canarias-madrid-casi-20-euros-kilo-201903140615_noticia.html?ref=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

Al-Hussaini, Z. A., Yousif, S. H. A. & Al-Ajeely, S. A. 2015. The role of sucrose and light duration on *in vitro* tuberization for two cultivars of potato *Solanum tuberosum* L. *Int. J. Curr. Microbiol. appl. Sci.* 4(2):277-83.

Al-Safadi, B., Ayyoubi, Z. & Jawdat, D. 2000. The effect of gamma irradiation on potato microtuber production *in vitro*. *Plant Cell, Tissue Org. Cult.* 61(3): 183-7.

Aslam, A., Ali, A., Huma, N., Saleem, A. & Iqbal, J. 2011. Effect of interaction of 6-benzyl aminopurine (BA) and sucrose for efficient microtuberization of two elite potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars, Desiree and Cardinal. *Afr. J. Biotechnol.* 10(59):12738-44.

Araque, E. J., Bohórquez, M. A., Pacheco, J. E., Correa, L. Y., Urquijo, J. S et al. 2018. Propagación y tuberización *in vitro* de dos variedades de papa. *Ciencia en Desarrollo.* 9(1):21-31.

Badoni A. & Chauhan J. S. 2010. *In vitro* sterilization protocol for micropropagation of *Solanum tuberosum* cv. 'Kufri Himalini'. Academia Arena. 2(4): 24-27.

Centro de Conservación de la Biodiversidad Agrícola de Tenerife (CCBAT). Consultado el 03/01/20. <http://www.ccbat.es/coleccionpapa.php>

Ficha técnica sobre semillas de la Revista Ae. 2015: PAPA NEGRA, elaborada por María Panizo y Antonio Perdomo de la Red Canaria de Semillas. Consultado el 20/12/19. <http://www.redsemillas.info/wp-content/uploads/2015/03/Ficha-Papa-Negra-canarias-Revista-AE-primaver-2015.pdf>

George, E. F. & Debergh, P. C. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. *Plant Propagation by Tissue Culture*.1:29-64.

Hernández-Castillo, F. D., Lira-Saldivar, R. H., Cruz-Chávez, L., Gallegos-Morales, G., Galindo-Cepeda, M. E. et al. 2008. Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Phyton*.77:241-52.

Hoque, M. E. 2010. *In vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Omics*. 3(1):7-11.

Hossain, S., Hossain, M., Hossain, T., Haque, M., Zakaria, M., Sarkar, D. 2017. Varietal performance of potato on induction and development of microtuber in response to sucrose. *Ann. Agric. Sci.* 62(1):75-81

Igarza, J., de Feria, M., Alvarado-Capó, Y., Pugh, T., Pérez M. et al. 2014. Caracterización morfo-agronómica de plantas de papa cv. 'Andinita' a partir de la siembra en campo de microtubérculos obtenidos en sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal*. Cuba. 14(2):81-9.

International Potato Center (CIP). Consultado el 25/08/19. <https://cipotato.org/es/potato/>

Liljana, K. G., Mitrev, S., Fidanka, T. & Mite, I. 2012. Micropropagation of potato *Solanum tuberosum* L. *Electronic. J. Biol.* 8(3): 45-9.

Llanco M. C. 2013. Efecto de la concentración de sacarosa y del regulador de crecimiento BAP en la multiplicación y tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* ssp. andigena). Tesis de grado. Universidad Mayor de San Andrés Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia.

Mashhadi, S. & Moeini, M.J. 2015. The effect of cytokinin and coumarin on *in vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Marfona. *Ludus Vitalis* 11: 165-170.

Miller, S. A. & Lipschutz L. 1984. Potato in: Ammirato P.V., Evans, D., Sharp W. R. and Yamada Yasuguki (eds.), Handbook of plant tissue culture, New York. McMillan publishing company Vol. 3: 291-293

Montoya, N., Castro, D., Díaz, J. & Ríos, D. 2008. Tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Diacol Capiro en biorreactores de inmersión temporal y evaluación de su comportamiento en campo. *Ciencia (Maracaibo)*. 16(3):288-95.

Moreno, P. 2012. Efecto de la composición del medio de cultivo y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Escuela de Biología. Caracas, Venezuela.

Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:473-97.

Naik, P. S. & Chandra R. 1993. Use of tissue culture technique in crop improvement with special reference to potato. CPRI, Shimla.

Papas Antiguas de Canarias. Consultado el 25/08/19. <https://www.papasantiguasdecanarias.org>

Pérez-Alonso, N., de Feria, M., Jiménez, E., Capote, A., Chávez, M. et al. 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*. Cuba. 1:17-21.

Ranalli, P. 2007. The Canon of Potato Science: 24. Microtubers. *Potato Research*. 50:301-4.

- Rivera, A., Valbuena, R., Hidalgo, R. & Moreno, J.** 2008. Microtuberización *in vitro* de siete accesiones de papa de la colección central colombiana. *Acta Agron.* 57(3):175-80.
- Sakha, B., Bhatia, A. K., Batra, V. K., Chaudhary, V. K., Batra, P. et al.** 2005. *In vitro* microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. *Indian J. exp. Biol.* 42(12):1245-7.
- Salem, J. & Hassanein, A. M.** 2017. *In vitro* propagation, microtuberization, and molecular characterization of three potato cultivars. *Biol, Plant.* 61(3):427-37.
- Sharma, N., Kaur, N. & Gupta, A. K.** 1999. Effects of gibberellic acid and chlorocholine chloride on tuberisation and growth of potato (*Solanum tuberosum* L.). *J. Sci. Food Agric.* 78(4):466-70.
- Villafranca, M. J., Veramendi J., Sota, V. & Mingo-Castel, A. M.** 1998. Effect of physiological age of mother tuber and number of subcultures on *in vitro* tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant. Cell. Rep.* 17:787-90.
- Wang, H., Li, H., Liu, F. & Xiao, L.** 2008. Chlorocholine chloride application effects on photosynthetic capacity and photoassimilates partitioning in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Sci. Hortic.* 119(2):113-6.
- Wang, P. & Hu, C.** 1982. *In vitro* mass tuberization and virus-free seedpotato production in Taiwan. *Amer. Potato J.* 59:33-7.