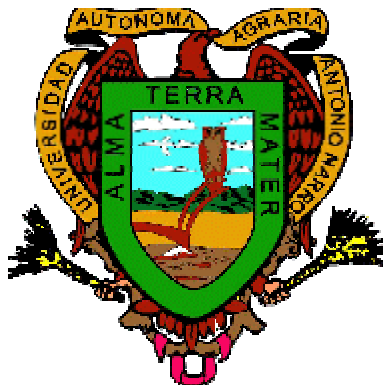


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



**Producción de Microtuberculos de Papa In Vitro. Efecto del ABA +
Citocininas y del ácido p-cumarico.**

POR:

JUAN GONZÁLEZ REYES

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO

DE:

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México.

Abril del 2002

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA

Producción de Microtuberculos de Papa In Vitro. Efecto de ABA +
Citocininas y del ácido p-cumarico.

POR:

JUAN GONZALEZ REYES

TESIS

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito
parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA
APROBADA POR:

Dr. Marco Antonio Bustamante García

ASESOR PRINCIPAL

M.C. Emilio Padrón Corral

Ing. Fidel Oyervides Martínez

SINODAL

SINODAL

M.C. Leticia Bustamante García

SUPLENTE

M.C. Reynaldo Alonso Velasco

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Abril del 2002

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
INDICE DE FIGURAS	i
RESUMEN	ii
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Origen e historia de la papa.....	4
2.2 Clasificación botánica.....	4
2.3 Descripción botánica.....	5
2.4 Condiciones climáticas.....	6
2.4.1 Fotoperiodo.....	6
2.4.2 Temperatura.....	7
2.5 Producción de semilla –tubérculo de papa.....	7
2.5.1 Categorías de certificación.....	8
2.5.1.1 Original.....	9
2.5.1.2 Básica.....	9
2.5.1.3 Registrada.....	10
2.5.1.4 Certificada.....	10
2.6 Cultivo de tejidos.....	10
2.6.1 Multiplicación rápida in vitro.....	11
2.6.2 Mantenimiento de germoplasma de papa in vitro.....	11
2.6.3 Cultivo de meristemos.....	12
2.6.4 Cultivo de segmentos nodales.....	13
2.6.5 Cultivo de callo.....	13
2.6.6 Cultivo de anteras.....	13
2.6.7 Cultivo de protoplastos.....	14
2.6.8 Microtuberculos.....	14
2.7 Ingredientes del medio de cultivo.....	15
2.7.1 Sales inorgánicas.....	15
2.7.2 Compuestos orgánicos.....	15
2.7.3 Sostenes inertes.....	15
2.7.4 Reguladores del crecimiento.....	15
2.7.4.1 Citocininas.....	17
2.7.4.2 Inhibidores del crecimiento.....	18
2.7.4.2.1 Ácido abscisico(ABA).....	18
2.7.4.2.2 Compuestos fenolicos.....	20
2.8 Tuberización in vitro.....	21
2.8.1 Factores que afectan la tuberización in Vitro.....	21
2.8.1.1 Sacarosa.....	22
2.8.1.2 Fotoperiodo y Temperatura.....	22
2.8.1.3 Reguladores del crecimiento.....	23
III.- MATERIALES Y METODOS	26

3.1 Ubicación del lugar.....	26
3.2 Material vegetativo.....	26
3.3 Esterilización.....	26
3.4 Siembra.....	26
3.5 Experimentos.....	27
3.5.1 Experimento 1.....	27
Etapa 1.....	27
Etapa 2.....	27
3.5.2 Experimento 2.....	28
3.5.3 Experimento 3.....	28
3.6 Diseño experimental.....	28
3.7 Parámetros evaluados.....	28
IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
4.1 Experimento 1.....	30
4.1.1 Numero de microtuberculos por cultivo.....	30
4.1.2 Diámetro de microtuberculos (mm).....	30
4.1.3 Peso de microtuberculos (mg).....	31
4.2 Experimento 2.....	35
4.2.2 Numero de microtuberculos por cultivo.....	35
4.2.3 Diámetro de microtuberculos (mm).....	35
4.2.4 Peso de microtuberculos (mg).....	35
4.3 Experimento 3.....	36
4.3.1 Numero de microtuberculos por cultivo.....	36
4.3.2 Diámetro de microtuberculos (mm).....	41
4.3.3 Peso de microtuberculos (mg).....	41
V.- CONCLUSIONES.....	48
VI.- RECOMENDACIONES.....	49
VII.- LITERATURA CITADA.....	50
VIII.- APÉNDICE.....	56

INDICE DE FIGURAS

Fig.	Pag.
1.- Efecto del ABA 0.2 mg/l + Kinetina (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el numero de microtuberculos, por cultivo, evaluándose a los 140 días.....	32
2.- Efecto del ABA 0.2 mg/l + Kinetina (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el diámetro de microtuberculos, evaluándose a los 140 días.....	33
3.- Efecto del ABA 0.2 mg/l + Kinetina (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el peso de microtuberculos, evaluándose a los 140 días.....	34
4.- Efecto del ABA 0.2 mg/l + BA (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el numero de microtuberculos, evaluándose a los 140 días.....	37
5.- Efecto del ABA 0.2 mg/l + BA (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el diámetro de microtuberculos, evaluándose a los 140 días.....	38
6.- Efecto del ABA 0.2 mg/l + BA (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el peso de microtuberculos, evaluándose a los 140 días.....	39
7.- Efecto del ácido p-cumarico (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el numero de microtuberculos, por cultivo, evaluándose a los 140 días.....	40
8.- Efecto del ácido p-cumarico (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el diámetro de microtuberculos, evaluándose a los 140 días.....	43
9.- Efecto del ácido p-cumarico (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el peso de microtuberculos, evaluándose a los 140 días.....	44
10.- Estado de plántulas de papa a los 30 días después de la siembra.....	45
11.-Efecto del ácido p-cumarico(0.8 mg/l), sobre la producción de microtuberculos, vista a los 140 días después de la siembra.....	46
12.- Microtuberculos obtenidos en el experimento con ácido p-cumarico (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l), evaluándose a los 140 días después de la siembra.....	47

RESUMEN

Segmentos nodales de 1cm. de longitud fueron tomados de plántulas de papa cultivadas in vitro, quitando la hoja de la yema axilar. Se sembraron 10 nudos por frasco "gerber" con 30 ml de medio MS, mas 30 gr/l de sacarosa + 8 gr/l de agar. Estos se desarrollaron por un periodo de 30 días en condiciones de 25⁰ C/ 18⁰ C (día/noche), con un fotoperiodo de 16 hrs. Transcurridos los 30 días se le aplico a cada frasco 5 ml de medio MS liquido, conteniendo 90 gr/l de sacarosa y ABA 0.2 mg/l + Kinetina (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l).

En un segundo experimento se aplico la misma cantidad de medio MS y ABA 0.2 mg/l + BA (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l).

En otro experimento se le aplico el medio MS, con la adición de ácido p-cumarico (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l). Los cultivos se incubaron a temperatura constante de 19⁰C y un fotoperiodo de 8 hrs, por un tiempo de 110 días.

La combinación de 0.2 mg/l de ABA + 0.1 mg/l de Kinetina produjo 5.8 microtuberculos por frasco, mientras que la concentración de 0.2 mg/l de ABA indujo microtuberculos con diámetro de 5.75 mm y peso de 151.46 mg. Con la combinación de ABA 0.2 mg/l + 0.1 mg/l de BA se obtuvieron 8.8 microtuberculos por frasco, mientras que la combinación de 0.2 mg/l de ABA + 1.6 mg/l de BA, genero microtuberculos con un diámetro de 5.9 mm y un peso de 166.77 mg, aunque con esta combinación él numero de microtuberculos fue menor. El ácido p-cumarico a una concentración de 0.2 mg/l, genero 13.2 microtuberculos por frasco, el mayor diámetro de los microtuberculos de 3.74 mm se presento en la concentración de 1.6 mg/l y en cuanto al peso la concentración de 0.4 mg/l presento 45.348 mg.

La mejor respuesta se obtuvo con 0.2 mg/l de ABA + 0.1 mg/l de BA, así como con el ácido p-cumarico a dosis de 0.4 mg/l, ya que con estos se indujo un mayor numero de microtuberculos, manteniéndose un buen diámetro y peso de estos.

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Profr. Cruz González García
Sra. Estela Reyes Lucio

Por ser los seres que me dieron la vida y me orientaron, educaron, para poder ser alguien de provecho, que siempre estuvieron conmigo en las buenas y las malas, ustedes son los seres que, siempre les guardare respeto por haberme ayudado a edificar mi trayectoria en este mundo y mi vida profesional. Los quiero mucho y les prometo que no los defraudare.

A MIS HERMANOS:

Alfonso, José Cruz, Andrés, Marcos, Carlos, Yolanda, Estela y María.

Por ser las personas más sencillas y queridas, con las cuales he convivido los momentos más felices de nuestras vidas, en los cuales aprendimos a respetarnos unos a otros y a las personas que nos rodean y que con su apoyo de aliento a siempre ser mejores conforme pasa el tiempo, me han dado esa fuerza mental y los consejos suficientes para poder sobresalir sobre todas las cosas con bien.

Siempre sean así y nunca claudican, por los golpes que da la vida.

A MIS SOBRINOS:

Yeiny, Víctor Alfonso, Andrés, Erick y Lili

Con mucho cariño para ellos, por ser tan alegres y tener esa chispa que mueve montañas.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por haberme dado la oportunidad, de estar en este momento disfrutando de todas las cosas que nos ofrece este mundo.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por haberme formado con bien, para ejercer profesionalmente, se que la pondré muy en alto dentro y fuera de sus instalaciones.

Mil Gracias Alma Mater.

Al Dr. Marco Antonio Bustamante García, por sus enseñanzas y apoyo en este trabajo de investigación.

A la TLQ. Laura María Duron, por su ayuda y orientación incondicional en los trabajos del laboratorio.

Al M.C. Emilio Padrón Corral, por el apoyo brindado en el diseño estadístico en este trabajo.

Al Ing. Fidel Oyervides Martínez, por su orientación y apoyo en este trabajo y por ser un buen catedrático.

Al M.C. Inocente Mata Beltrán, por ser un buen maestro y mejor amigo, por el aprendizaje adquirido dentro y fuera de las aulas de clase.

A todos los maestros, que de alguna u otra forma intervinieron en mi formación profesional. En especial a los del departamento de Horticultura.

A mis padres y hermanos, por el apoyo económico y moral, que nunca me negaron.

En especial al Ing. José Cruz González García e Ing. Marcos González Reyes.

A mis amigos: Anacleto, Baldemar, David, Angel, Olaf, Orvelin, Sergio, Toño, Jorge y a Manuel por el apoyo brindado con su computadora.

A todos los compañeros de la Generación XCII, de Horticultura.

A mis compañeros y amigos del internado en especial a los del modulo 8: Julio Cesar Cachón, Santiago Velázquez, Raúl Altuzar, por el aprendizaje cultural, social y los momentos que convivimos en las buenas y las malas.

I.-INTRODUCCION

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es la planta dicotiledónea más importante como fuente de alimentación humana; ocupa el quinto lugar entre los principales cultivos del mundo y es superada únicamente por gramíneas como trigo, arroz, maíz y cebada (Pérez et al., 1997).

Es una hortaliza muy importante, por la superficie que se destina a su cultivo, por la cantidad de carbohidratos que aporta a la dieta alimenticia. El consumo per-capita referente al periodo 1981-86 fue de 13.3 Kg. y en los años 90 se estimó en los 15 Kg (SAGAR, 1994).

En la actualidad se siembran 66,302 has. de las cuales se cosecharon 65,547 has, obteniéndose una producción de 1,272,195 toneladas (INEGI, 1999).

Los estados productores de papa en México son: Sinaloa con un 18.9%, Nuevo León 13.7 %, Guanajuato 7.9%, Puebla 7.8%, Coahuila 7.1%, Estado de México 6.7%, Chihuahua 6.2%, Sonora 5.9% y Michoacán 3.5 % (SAGAR, 1994).

El rendimiento de papa a nivel mundial es de 15 ton/ha, en México es de 17 ton/ha. Entre los países con mayor rendimiento destacan Holanda 42 ton/ha, Bélgica 42 ton/ha, EE.UU. 36 ton/ha, Francia 35 ton/ha, Alemania 33 ton/ha (INIFAP, 1997).

La demanda nacional de semilla-tubérculo de categoría certificada es de 185,000 ton, cantidad que no es suficiente para la cantidad de terreno que se siembra en el país (Villarreal,1987).

Los países que tienen el mercado mundial de producción de semilla de papa son: Holanda cubriendo un 75% de la producción mundial, Canadá en segundo lugar con 11%, y Francia con un 7%(INIFAP, 1997).

El problema fundamental de las especies que se propagan en forma vegetativa o asexual, es la transmisión de enfermedades a través de las partes de la planta. Es muy importante considerar que el cultivo de la papa desde el punto de vista fitosanitario es de los que más problemas tiene(CONPAPA, 1995).

Para obtener buenos rendimientos y menores gastos en la producción de papa, la semilla-tubérculo de papa debe estar libre de virus y de agentes patógenos(Villarreal, 1987).

Uno de los métodos utilizados para la obtención de tubérculo- semilla libre de virus es el cultivo in-vitro de meristemos apicales, para posteriormente obtener plántulas, en forma masiva y en un tiempo corto(Wright,1983).

Otro método es a través de la obtención de microtuberculos in Vitro, utilizando plántulas obtenidas del cultivo de meristemos libres de virus, con la adición de Inhibidores(ABA) del crecimiento y con los cuales se induce la tuberización(Pérez,1999).

Debido a la falta de semilla- tubérculo sano, algunos productores con recursos económicos están produciendo su propia semilla con una alta calidad sanitaria, con el uso de biotecnología y mediante el sistema laboratorio-invernadero-

campo. En la actualidad el país cuenta con 17 empresas dedicadas a la producción de semilla de papa, 10 laboratorios y 17 instalaciones de invernaderos(CONPAPA, 1995).

En el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Horticultura de la UAAAN, se han estado realizando trabajos de investigación para la obtención de microtuberculos de papa de la variedad Alpha libres de virus y patógenos, obteniéndose buenos resultados en cuanto a producción y calidad de los microtuberculos con la utilización de ABA(Pérez, 1999).

Existen reportes de que hay citocininas que pueden ayudar a la producción de microtuberculos (Le, 1993).

Por otro lado, hay evidencias de que otros inhibidores, como son algunos compuestos fenolicos, también pueden inducir a tuberización in Vitro (López, et al., 1999).

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue:

- 1) Determinar el efecto de la combinación de ABA + Citocininas en la producción y calidad de los microtuberculos.
- 2) Evaluar el efecto del ácido p-cumarico en la producción y calidad de microtuberculos.

Hipótesis:

Con la adición de una citocinina al medio que contiene ABA, se mejora la cantidad y calidad de microtuberculos.

El ácido p-cumarico estimula la producción de microtuberculos, de papa in-vitro.

II.- REVISION DE LITERATURA

2.1 Origen e Historia de la Papa

Según estudios acerca de la distribución de las primeras papas cultivadas y de las especies silvestres mas parecidas a ellas, probablemente donde primero se cultivo la papa fue en la región del lago Titicaca, al norte de Bolivia y en las altas mesetas de la Cordillera de los Andes.

Según los documentos arqueológicos y etnológicos disponibles, las poblaciones andinas al sur de Perú y al norte de Bolivia, empezaron a comer papa silvestre de 3000 a 4000 años antes de nuestra era.

En Perú se han desenterrado en cuatro excavaciones arqueológicas diferentes, papas momificadas y se encontró que uno de los tubérculos fechado entre el 1800 y el 1500 antes de cristo, presentaba una lesión producida por la sarna común. Se cita la fecha de 1570 como la de la primera entrada de papa en Europa continental a través del puerto de Sevilla(Alonso,1996)

En México se empezó a domesticar la papa 400 años a.C. por medio de las culturas indígenas, donde junto con el maíz se convirtieron en la base de su dieta(Rojas, 1976).

2.2 Clasificación Botánica.

El nombre técnico de *Solanum tuberosum* L. Se menciona por primera vez por el botánico suizo Gaspar Bahin en 1959(Ramos, 1991), actualmente tiene la siguiente clasificación Taxonómica:

Reino: **Plantae**

Subreino: **Embryophyta**

División: **Espermatophyta**

Tipo: **Angiospermae**

Clase: **Magnoliopsida**

Subclase: **Gamopetala**

Orden: **Tubiflora**

Familia: **Solanaceae**

Genero: **Solanum**

Subgénero: **Pachystemomum**

Sección: **Tuberarium**

Subsección: **Hyperbasarthrum**

Especie: **tuberosum**

Nombre Científico: ***Solanum tuberosum* L.**

Nombre común: **papa**

2.3 Descripción Botánica

La papa es una planta herbácea anual y perenne por su reproducción, debido a su propagación vegetativa. Los tallos son de dos tipos: 1.- aéreos, que son angulosos, de color verde, semierectos y/o rastreros. 2.- subterráneos, que están compuestos por rizomas (llamados también estolones) y por tubérculos(parte comestible). Cabe mencionar que cada tallo aéreo origina de dos a tres tubérculos; estos pueden ser ovoides o cilíndricos, con piel₁₄

blanca, rosa, roja, o violeta. Las hojas son compuestas, formadas por foliolos largos de forma ovoide. Las flores son perfectas, de color blanco, púrpura o veteadas de acuerdo al cultivar. El fruto es redondo, con un diámetro de 2 cm.(Valadez ,1998).

2.4 Condiciones climáticas

El cultivo de la papa se adapta bien a los climas templados-fríos, su resistencia a las heladas es media. El crecimiento de los tubérculos se ve favorecido con temperaturas de 15-18⁰C mientras que los brotes jóvenes tienen su temperatura optima a unos 24⁰C(Narro, 1986).

2.5 Fotoperiodo

La duración del día(horas diarias de luz)tiene una gran influencia en el comportamiento del cultivo de la papa.

Bajo condiciones de día corto, las plantas tuberizan pronto, los estolones son cortos y la vegetación no alcanza mucho tamaño.

Bajo condiciones de día largo por el contrario, la planta tuberiza mas tarde, los estolones que crecen son mas largos y la vegetación crece más. Incluso hay variedades que en zonas o épocas de día largo no tuberizan en absoluto(Alonso,1996).

La duración del día también influye en la formación de órganos subterráneos de almacenamiento, como bulbos, cormos y tubérculos(Salisbury,1994).

En la papa el fotoperiodo de días cortos estimula la tuberización, pero hay diferencia en la exigencia de horas luz entre variedades; las variedades más tardías son las mas estimuladas para formar tubérculos rápidamente bajo fotoperiodo de días cortos.

La papa no es termofotoperiodica respecto a la floración pero el frío determina una tuberización más rápida.

La respuesta fotoperiodica de la papa obedece al esquema del mecanismo del

fitocromo $P_{660} \rightarrow P_{730}$ al sentir él estímulo en las hojas.

El fotoperiodo determina cambios internos e induce un estímulo que va de las hojas a la raíz y estolones viajando por el floema(Rojas, 1987).

2.4.2 Temperatura

El principal factor climático que interviene en el crecimiento y los rendimientos es la temperatura. La planta de papa prospera mejor en tiempo uniformemente fresco en general, la variación de temperatura óptima se considera que esta entre $7.2-18.3^{\circ}\text{C}$, con una media de aproximadamente 15.5°C . En otras palabras los más altos rendimientos se obtienen dentro de esta variación de temperatura(Edmond, 1967).

En muchos casos las condiciones de temperatura inducirán la formación de órganos subterráneos de almacenamiento, como bulbos, cormos y tubérculos de papa.

El cultivo de la papa se desarrolla preferentemente en climas fríos y templados, en general la temperatura óptima oscila entre los $7-18^{\circ}\text{C}$ (SARH, 1994).

Con altas temperaturas, un aporte alto de N puede producir un retraso en la tuberización.

Como la temperatura y las horas luz influyen en la formación de los tubérculos, sería necesario hablar del termofotoperiodo, por lo que en general se puede establecer lo siguiente:

- Con días cortos y temperaturas bajas, la tuberización se adelanta.
- Con días cortos y temperaturas altas las variedades de ciclo corto tuberizan y desarrollan sus tubérculos mucho antes que las variedades de ciclo largo.
- Con días largos y temperaturas altas la tuberización se ve fuertemente perjudicada.
- Con temperaturas bajas o moderadas, las horas diarias de luz, en cuanto a su efecto sobre el inicio de la tuberización, tiene mas influencia sobre las

variedades de ciclo corto (Alonso, 1996).

2.5 Producción de semilla-tubérculo de papa

La producción de semilla de papa debe considerarse como prioridad, la sanidad, aun antes que el rendimiento.

En México el proceso de certificación de semilla de papa tuvo su origen en 1957, a año en el cual se produjeron 1,200 ton, que cubrieron 36 mil has; por lo que en el año de 1992 la cantidad de semilla certificada fue de alrededor de 35 mil ton, que cubrieron cerca de 11,700 has, y que representó aproximadamente el 13% del área para el cultivo de papa.

Las variedades de papa manejadas en 1992 para la producción de semilla-tubérculo certificada fueron principalmente: Alpha y Atlantic; alcanzando la primera hasta 80% del total de la producción, 15% para la segunda y el 5% restante para variedades como Michoacán, Greta, Tohoacan (SARH, 1994).

2.5.1 Categorías de Certificación

Se considera que la papa puede multiplicarse por diferentes métodos: sexual por medio de semilla verdadera o asexual por medio de plantas in-vitro, plantas en invernadero, minitubérculos y semilla-tubérculo; siendo la que asegura la identidad o pureza genética de una variedad, mientras que la sexual produce mayor variabilidad genética.

Con el desarrollo de nuevas técnicas a través de micropropagación in-vitro para la obtención de plantas libres de patógenos, se requiere la normatividad para la certificación de semilla-tubérculo, con el fin de proporcionar una semilla de calidad genética y fitosanitaria.

El objetivo principal de esta norma mexicana es: establecer los factores y niveles mínimos de calidad que garantizan que las semillas para siembra

certificada, en el cultivo de papa, aseguran la calidad genética, física, fisiológica y fitosanitaria para la propagación y reproducción de la especie y define a la semilla: el tubérculo o plántula producido vegetativamente y que será destinado a ser usado como semilla minitubérculo: tubérculo producido en condiciones de invernadero.

Semilla-tubérculo: la semilla o parte de ella sembrada como semilla para propagación de la planta en forma asexual.

Las clasifica de acuerdo a categorías a certificar que son las siguientes:

2.5.1.1 Original: es la resultante de los trabajos de investigación, desarrollo y mejoramiento de variedades que permanezcan bajo el control de su formador o el mejorador.

Pre-básica I: Los meristemas o partes vegetativas que incluye a los microtubérculos, libres de patógenos que se utilicen en la micropropagación mediante el cultivo de tejidos, realizada en un laboratorio con reconocimiento oficial, cuya validación se otorgara a aquellas personas físicas o morales que los soliciten y cumplan con las disposiciones establecidas por la Secretaria.

Pre-básica II: son aquellos minitubérculos y microtubérculos libres de patógenos, obtenidos a partir de semilla pre-básica I y que corresponde al primer ciclo de producción, en condiciones de invernadero.

Pre-básica III: son los minitubérculos libres de patógenos, obtenidos a partir de semilla pre-básica II, y/o esquejes, bajo condiciones de invernadero y provenientes de semilla pre-básica I o pre-básica II y que conserven sus características de pureza varietal. También se les considera a los tubérculos provenientes de semilla verdadera, de producción en invernaderos.

2.5.1.2 Básica(G-1): Tubérculos producidos en su primera generación de

campo a partir de semilla “ pre-básica I”, pre-básica II , o pre-básica III “.

2.5.1.3 Registrada (G-2): Tubérculos producidos a partir de semilla básica y corresponde a la segunda generación de campo.

Registrada I (G-3): tubérculos producidos a partir de semilla básica o registrada y que corresponden a su tercera generación de campo. En esta categoría se consideran los tubérculos obtenidos por selección clonal por familias del primer año, procedentes de semilla básica o registrada.

Registrada II (G-4): Tubérculos producidos a partir de semilla básica, registrada o registrada I, y que corresponde a su cuarta generación de campo.

2.5.1.4 Certificada (G-5): Tubérculos producidos a partir de semilla básica, registrada, registrada I, registrada II, y que corresponde a su quinta generación de campo. Esta es la última categoría bajo certificación.

En el caso de semillas importadas, se pueden considerar dentro de estas categorías las que corresponden al país y región de producción así como también la generación de multiplicación en laboratorio, invernadero y/o campo. Esto de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NMX-00-00-00-SAGAR-97 para la Certificación de semilla de papa (*Solanum tuberosum L.*).

2.6 Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos permite la propagación clonal rápida de un gran número de plantas y la conservación de germoplasma de papa bajo condiciones controladas, en espacios pequeños y con poca mano de obra (Dodds 1998; Roca et al., 1978; SARH, 1992).

Con la utilización de técnicas de cultivo de tejidos vegetales, bajo condiciones

de asepsia total, un tejido vegetal se siembra en un medio de cultivo que satisface sus requerimientos nutricionales. Los propósitos que se siguen al emplear estas técnicas en papa son principalmente: Obtención de plantas libres de virus, propagación vegetativa y mantenimiento de bancos de germoplasma in-vitro(SARH, 1992).

2.6.1 Multiplicación rápida in-vitro

Es el método más utilizado en la actualidad. La multiplicación in-vitro de la papa por cultivo de meristemas permite obtener fácilmente en menos de un año, aproximadamente 2,000,000 de plantas a partir de una yema o un meristemo.

La multiplicación in-vitro de la papa tiene como objetivo básico la producción rápida a gran escala de individuos genéticamente idénticos al individuo de partida y perfectamente sanos.

De hecho cuando se obtiene una planta in-vitro partiendo de una planta enferma, la planta obtenida es un individuo totalmente sano.

Este resultado ha demostrado ser especialmente interesante para especies que como la papa, se reproducen, de forma natural, por multiplicación vegetativa.

2.6.2 Mantenimiento y producción de germoplasma de papa in-vitro

Entre las nuevas técnicas que sirven como base para la producción de semilla de papa de alta calidad fitosanitaria y genética, se encuentra la de producción masiva de plantas in-vitro o vitroplantas que son totalmente sanas y de las cuales se obtienen microtubérculos in-vitro.

Mediante la utilización de fotoperiodos cortos e incremento de las concentraciones de azúcar en el medio, se ha logrado inducir la producción de microtubérculos para la conservación bajo esta modalidad.

Las plantas in-vitro que se obtienen por primera vez de tubérculo aparentemente sano proveniente también de plantas sanas y bajo la técnica descrita, se llevan a pruebas de laboratorio para identificar y seleccionar₂₀

solo aquellas totalmente libres de patógenos, las cuales serán utilizadas para multiplicarse masivamente in-vitro y a partir de ellas producir micro o mini tubérculos que garantizaran la producción de semilla de papa de alta calidad fitosanitaria y genética con un mayor potencial de rendimiento(Valdés, 1995).

2.6.3 Cultivo de meristemos

Es el cultivo in vitro del domo apical (meristemo apical que como media mide 0.1 mm) mas los primordios foliares.

El cultivo de meristemos es un método efectivo para la eliminación de infecciones vírales y es el material preferido para la conservación de germoplasma.

La razón principal por la cual las células meristemáticas son libres de virus, es que el meristemo carece de tejidos vasculares, que es por donde se translocan los virus que van contaminando a las plantas, pero existen otros factores:

- 1.- El crecimiento apical tiene una mayor velocidad de crecimiento y en consecuencia el virus "no alcanza" al meristemo.
- 2.- En una célula meristemática el virus tiene mayor dificultad de acoplamiento con los ribosomas, debido a que estas células tienen un código de trabajo muy definido.
- 3.- Existe una competencia por el uso de algunos metabolitos entre células y virus.

El tamaño optimo a utilizar se decide tomando en cuenta dos factores: Tamaño optimo para liberación del virus y tamaño optimo para facilitar el cultivo.

Existe una mayor posibilidad de obtener plantas libres de virus si solo se aísla el meristemo, pero la posibilidad de que el meristemo sobreviva sin primordios foliares es muy pequeña. Por otro lado utilizar meristemos más grandes(con mas primordios foliares) hace que la probabilidad de obtener plantas libres de virus sea pequeña.

De manera general se puede decir que los meristemos apicales tienen mas probabilidad de estar libres de virus que los meristemos axilares, y que si₂₁

los meristemos provienen de una planta en plena actividad, hay mayor probabilidad de obtener plantas libres de virus(Vázquez, et al. 1997).

2.6.4 Cultivo de segmentos nodales

El método de los segmentos nodales tiene la ventaja de que genera poca variación genética en las muestras, ya que en ningún momento se forma tejido calloso. Se inicia tomando segmentos de tallo con su correspondiente yema axilar. En el cultivo las yemas crecen y se alargan produciendo nuevos segmentos nodales susceptibles de ser a su vez segmentados. En un momento determinado los segmentos nodales producidos pueden dar origen a tallos y raíces ya sea in-vitro o en suelo, mediante una alteración de la composición hormonal del medio. Muchas plantas no pueden ser propagadas exitosamente de esta manera(Vázquez, et al., 1997).

2.6.5 Cultivo de callo

Es la regeneración in vitro de plantas a través de células somáticas que es una herramienta muy útil en el mejoramiento mutacional en papa, esto debido a que la mutación solo ocurre en una célula, al contrario de las mutaciones in vivo, donde puede mutar todo el órgano(Wang y Hu,1980).

La regeneración involucra generalmente 3 pasos:

- 1.- Diferenciación de ciertas células del explante. Donde estas células diferenciadas frecuentemente se dividen y crecen dentro del callo.
- 2.- Rediferenciación del callo de las células parenquimatosas y la organización de meristemos de tallos, raíces o embriones.
- 3.- El desarrollo de estos meristemos en plántulas (Li, 1988).

2.6.6 Cultivo de Anteras

Este cultivo con fines de mejoramiento ha sido revisado por Sopory (1978) con mayor importancia en la papa. La reducción del nivel de ploidia de los cultivares comerciales de papa de autotetraploides ($2n=4x=48$) a dihaploides ($2n=2x=24$) y de ahí a monohaploides ($2n=x=12$), abre un camino para la producción de líneas homocigotas por el doblamiento de los cromosomas. Permitiendo así que el cultivo de papa, que es propagado en forma vegetativa se convierta en un cultivo que pueda propagarse sexualmente y en el comienzo de cada temporada utilizar semilla libre de virus.

2.6.7 Cultivo de protoplastos

El protoplasto de la papa fue primeramente aislado por Lorenzini(1973) del tejido del tubérculo. La regeneración de plantas en forma exitosa fue logrado por (Shepard,1975), comenzando de aquí una explotación en forma extensiva por esta técnica de cultivo.

Los cultivares que se incluyen en la regeneración de plantas a partir de protoplastos son autotetraploides(Bokelman y Roest,1983), clones dihibridos(Schuman y Koblitz ,1983), y líneas monoploides (Roest y Bokelmann ,1983).

2.6.8 Microtuberculos

Los microtuberculos son tubérculos producidos en tubo de ensayo o en frasco de cultivo; son de la misma forma y color que los tubérculos normales de la variedad de que se trate pero su calibre es menor de un centímetro.

El sistema de producción de microtuberculos en laboratorio permite obtener tubérculos en todo tiempo, con la ventaja de garantizar la sanidad de los mismos ya que es imposible que se infecten al haber sido producidos en ambiente escéptico.

El proceso de multiplicación rápida in Vitro se complementa con la₂₃

producción de minitubérculos en invernadero bien a partir de las plántulas o los microtuberculos con un marco de plantación muy cerrado, poniendo hasta 100 pts/m², sobre sustrato orgánico. Los minitubérculos obtenidos tienen un calibre de 10-30 mm(Valdez, 1995)

2.7 Ingredientes del medio de cultivo

2.7.1 Sales inorgánicas

Estas proporcionan los macroelementos N,P,K,Ca,S Y Mg y microelementos (B,Co,Cu,Mn,I,Fe,Zn).

2.7.2 Compuestos orgánicos

Carbohidratos.En la mayoría de los cultivos se emplea sucrosa del 2-4%, pero en algunos casos se pueden usar concentraciones tan elevadas como del 12%, como en el caso de embriones jóvenes.

Vitaminas. La tiamina(de 0.1-0.5 mg/l) casi siempre es esencial y el ácido nicotínico(0.5mg/l) y la piridoxina (0.5 mg/l). En muchos cultivos resulta beneficioso el inositol, a razón de 100 mg/l y también se agrega en forma rutinaria.

2.7.3 Sostenes inertes

Agar. El Agar es él mas utilizado, es un producto en polvo que se obtiene de ciertas especies de algas rojas. Debe su valor en los sistemas de cultivo a 2 propiedades:

- a) Se derrite al calentarlo.
- b) Es en esencia biológicamente inerte(Hartmann, 1999).

2.7.4 Reguladores del crecimiento

Adicionalmente a los nutrientes, generalmente es necesario agregar una o más sustancias reguladoras; frecuentemente auxinas y/o citocininas, pero a veces también giberelinas o ácido Abscísico, para mejorar el desarrollo del cultivo in-vitro de tejidos y órganos.

La cantidad de estas sustancias varía considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como la finalidad del cultivo in-Vitro(Vázquez, et al. 1997).

Regulador del crecimiento vegetal, se define a los compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas.

Son activas en pequeñas cantidades, en las que los lugares de síntesis y acción generalmente son distintos, siendo en algunos casos activos en el mismo sitio de formación(Merino, 2000).

Las sustancias hormonales son las auxinas y citocininas. Las concentraciones varían de especie a especie, pero generalmente las auxinas se usan en una concentración de 0.1- 10 mg/l y las citocininas de 0.03-30mg/l.

Función de las hormonas

En la actualidad existe evidencia suficiente para postular 2 hechos básicos sobre la acción fundamental de las fitohormonas.

1.- Las fitohormonas no actúan directamente a nivel del organismo si no de la célula, por ejemplo sobre la mitosis, el alargamiento celular, de modo que sus efectos se hacen sentir en todos los fenómenos fisiológicos que se basen en los fenómenos citológicos afectados.

2.- La acción básica de las hormonas ocurre sobre los ácidos nucleicos a nivel de la transcripción del mensaje(DNA→RNA) o de su traducción(RNA→Proteína) (Rojas, 1987).

Las giberelinas se emplean en algunas especies para obtener plantas libres de virus, principalmente en cultivos de ápices o meristemos(Merino,2000).

2.7.4.1 Citocininas

Lugar de síntesis.

Las citocininas se sintetizan principalmente en la raíz y su presencia en las yemas del tallo, donde tienen efecto hormonal, puede ser por transporte de la raíz, pero hay informes de su síntesis en las hojas(Rojas, 1987).

Función

Las citocininas son promotoras de la división celular(inducción y promoción)(interactúan con las auxinas), alargamiento celular, formación de órganos, contrarresto del letargo, prevención de la senescencia, movilización de nutrientes, regulación de los polirribosomas(Lira, 1994).

Las citocininas son aquellas sustancias químicas que pueden estimular la división celular o citocinesis(Merino, 2000).

Las citocininas incrementan tanto la citocinesis como la expansión celular, pero en especial la expansión celular(Salisbury, 1994).

La actividad de las citocininas no se reduce tan solo a la división celular en un tejido per-se. También regulan el tipo y la frecuencia de producción de órganos, así como su posición y forma.

Las citocininas están implicadas en la división celular, modificación de la dominancia apical y diferenciación de tallos(Pelacho, et al , 1997).

Las citocininas activan también el transporte de nutrientes(Rojas 1987). Las citocininas son típicamente, las hormonas de la división celular y activan el proceso directamente.

Los fenómenos estimulados por las citocininas son característicos de las plantas y tejidos jóvenes por lo que parecen ser esencialmente factores de juvenilidad cuya deficiencia induce síntomas de senescencia(Rojas, 1987).

Las citocininas actúan en el retraso de la senescencia(Merino, 2000).
Muestran un efecto inhibitor sobre el envejecimiento(Pelacho, et al.1997).
El efecto de las citocininas tiene lugar en concentraciones tan bajas como $5 \cdot 10^{-11}$ M; generalmente inhiben el crecimiento de las raíces; pudiendo estimular en muy bajas concentraciones $5 \cdot 10^{-8}$ M la iniciación del crecimiento de raíces laterales.

Las citocininas inhiben la elongación del tallo pero estimulan el alargamiento de las hojas, actúan en el retraso de la dominancia apical y tiene un papel importante en la organogenesis ya que pueden ser inducidas yemas en tejidos in-vitro de callo, hojas, raíces, cotiledones o piezas de tallo(Merino, 2000).

En los medios para cultivo in-vitro se incorporan citocininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos; además se usan para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical (Vázquez, et al.,1997).

2.7.4.2 Inhibidores del crecimiento

Al aislar una sustancia muy activa de las hojas de papa, esta sustancia induciría la tuberización in-vitro en concentraciones de $3 \cdot 10^{-8}$ M, en el rango de las concentraciones activas para auxina y otros reguladores del crecimiento, esta resulto ser una molécula similar al ácido jasmonico (Koda et al. 1988).

2.7.4.2.1 Ácido Abscísico(ABA)

Funciones.

El ABA es uno de los inhibidores del crecimiento mas conocidos y tiene implicaciones muy importantes en el control de la transpiración por los estomas; también provoca abscisión o caída de hojas, flores y frutos (Lira, 1994).

En muchos sistemas, él ABA contrarresta los efectos de las hormonas promotoras. Esto parece lógico que en un sistema de crecimiento y desarrollo deba haber algún freno. El ABA influye en procesos como la abscisión de frutos y hojas, inducción y prolongación del letargo en los brotes de árboles de hoja caduca y en los tubérculos inhibición de la brotación, así como en la floración en las plantas de día largo restringidas por los días cortos (Weaver, 1990).

El ABA es una hormona inhibidora, muy difundida en el reino vegetal, que interactúa con los promotores del crecimiento, por lo que tiene efectos importantes en los fenómenos del crecimiento. En las plantas existen inhibidores naturales del crecimiento que afectan a la apertura de las yemas, a la germinación de las semillas y al desarrollo de latencia (Pelacho, et al. 1997).

El ABA parece actuar como inductor general del envejecimiento y frecuentemente las aplicaciones de ABA al follaje, provocan cambios de color senescente de las hojas (Addicott y Lyon, 1969).

Es posible que el efecto inhibitor del ABA en el crecimiento se deba a su inhibición de las enzimas hidrolíticas, que son esenciales al metabolismo vegetal. Se sabe que él ABA estimula procesos fisiológicos aparentemente negativos que implican una suspensión del desarrollo, pero que son necesarios para la supervivencia de la planta (Rojas, 1987).

El ABA se encuentra en todos los órganos de la planta: frutos, semillas y yemas jóvenes son ricos en él.

El ABA induce la formación de tubérculos en papa y el etileno la apresura (Rojas, 1987).

El Ácido Abscísico promueve el letargo, antagonismo a la giberelina, floración (plantas de día corto) abscisión, cierre de los estomas, control del desarrollo embrionario (con las citocininas y el GA) (Lira, 1994).

El ABA en la mayor parte de los casos produce un efecto negativo en los cultivos in-Vitro, pero en determinados casos promueve la maduración de

embriones y en cultivos de células en suspensión facilita la sincronización de la división celular(Pelacho,et al. 1997).

El ABA evita la germinación prematura o el crecimiento de muchas semillas y yemas. El ABA actúa de 3 formas:

Parece tener tres efectos principales dependiendo del tejido implicado:

1.- Efectos sobre la membrana plasmática de las raíces.

2.- Inhibición de la síntesis de proteínas.

3.- Activación y desactivación específicas de ciertos genes(efectos en la transcripción)(Salisbury, 1994).

2.7.4.2.2 Compuestos Fenolicos

Los inhibidores naturales del crecimiento comprenden un grupo muy variado de compuestos; aunque los más comunes son las sustancias orgánicas aromáticas(Salisbury, 1994)

Los compuestos fenolicos se consideran como una segunda categoría de inhibidores, y pueden ocurrir en altas concentraciones en plantas ya sea como fenoles libres o como derivados de glicosidos(Leopold y Kriedmann, 1975).

Entre los productos secundarios sintetizados por la planta hay algunos que al ser aplicados a las semillas en germinación inhiben su desarrollo.

Los compuestos Fenolicos vienen del ácido Shiquimico a través de los aminoácidos aromáticos tirosina y fenilalanina(Kefeli y Kutacek, 1977).

Muchos de los compuestos Fenolicos son compuestos de fenil, incluyendo fenoles, ácidos benzoicos y otros compuestos de cadenas más largas. El ácido galico y el Shiquimico son derivados del ácido benzoico. El galico comúnmente se encuentra en los frutos en maduración. El ácido ferulico y el p-cumarico son cofactores de la oxidasa de IAA (Weaver, 1990).

Existen otros compuestos Fenolicos que surgen de la ruta del ácido₂₉

Shiquimico y de reacciones subsecuentes. Entre ellos están los ácidos: cinámico, p-cumarico, cafeico, ferulico, clorogenico, protocatecuico, y galico. Los 4 primeros se derivan por completo de la fenilalanina y tirosina(Salisbury, 1994).

Plantas con flores, helechos, musgos, hepáticas y muchos microorganismos contienen diversos tipos y cantidades de compuestos Fenolicos.

Todos los compuestos Fenolicos poseen un anillo aromático al que se unen diversos grupos sustituyentes, como hidroxilo, carboxilo, y metoxilo y a menudo otras estructuras cíclicas no aromáticas.

Los compuestos Fenolicos se diferencian de los lípidos en que son más solubles en agua y menos solubles en solventes orgánicos no polares (Salisbury, 1994).

El ácido p-cumarico en plantas de nogal, a una concentración de 10^{-5} M, redujo la altura de la planta y el total del área foliar en 23 y 28 %, respectivamente, comportándose como un inhibidor del crecimiento (Márquez, 1988).

2.8 Tuberización in-vitro

La inducción de micrutuberización in-vitro, cuando en cada axila de los vástagos desarrollados in-vitro es capaz de producir un microtuberculo, pero los microtuberculos producidos in-vitro pueden presentarse en la parte del nudo del tallo del explante o axilares. El tamaño del microtuberculo obtenido in-vitro es un tamaño igual o menor de un centímetro de diámetro, pero son idénticamente iguales en forma que los producidos in vivo. Tamandose como explantes cortes nodales, estolones cortados, cortes de vástagos in-vitro o vástagos enraizados in-vitro. Atraves de esto se ha hecho de la producción de microtuberculos un método masal de la propagación in-vitro de las plantas libres de virus (Wang y Hu, 1980).

2.8.1 Factores que afectan la formación de microtuberculos in vitro

Los factores que afectan la formación de microtuberculos in Vitro son: temperatura, fotoperiodo, carbohidratos y concentración de los reguladores.

2.8.1.1 Sacarosa

Cuando el medio nutritivo contiene sucrosa al 2 % o menos no hay formación de tubérculos, pero cuando se incremento la concentración de sucrosa, indujo a la tuberización.

Esto fue observado cuando se incremento hasta 8 % de sucrosa, resultando con un alto porcentaje de tuberización hasta en un 80% (Xin Xu et al., 1998).

Con un 8 % de sacarosa adicionada al medio fue optimo para la tuberización in Vitro de vástagos enraizados in Vitro(Wang y Hu, 1982).

En la producción de microtuberculos de cortes de vástagos in Vitro, no se encontró diferencias significativas en concentraciones de sacarosa de 4,6 y 8%, pero numéricamente la mayor cantidad de microtuberculos se obtuvo con 6% de sacarosa(Wattimena, 1983).

2.8.1.2 Fotoperiodo y temperatura

La iluminación y la temperatura, modifican el crecimiento al cambiar la proporción de las diferentes hormonas presentes en los tejidos. Estas variables afectan la síntesis, transporte e inactivación de las hormonas.(Weaver ,1990).

En la inducción de microtuberculos se manejo una temperatura de 10⁰ C con 16 hrs. luz, después del la fase vegetativa se le dio un fotoperiodo de 9 hrs. por un periodo de 3 meses. Los días cortos promovieron la tuberización(Westcott, 1981).

En la producción de microtuberculos de papa con un fotoperiodo para inducción de microtuberculos in Vitro, se obtuvo los mejores resultados con un fotoperiodo de 8 hrs. luz a una temperatura constante de 19⁰C, que cuando se mantuvieron en absoluta oscuridad(Pérez, 1999).

La temperatura optima para la tuberización in Vitro de papa fue determinada en 20⁰ C constante, siendo todavía más efectiva que las temperaturas alternantes dia/noche(Wang y Hu, 1982).

En cultivos mantenidos en fotoperiodo corto de 10 hrs. y bajas temperaturas día / noche 20 / 18⁰ C, tuvieron una producción mas alta de peso de microtuberculos 255 mg/planta y un mayor numero 2/planta, que los mantenidos bajo días largos 16 hrs, combinados con altas temperaturas día / noche de 28/26⁰ C, con una producción de 207 mg/planta y un numero de microtuberculos por planta de 0.9 (Gopal, et al.,1998).

2.8.1.3 Reguladores del crecimiento

Explantos nodales del cultivar Rema fueron cultivados en un medio MS , con sacarosa al 2%, temperatura de 20⁰ C y un fotoperiodo de 16 hrs, con luz fluorescente de 100 m⁻². Estos fueron tratados con concentraciones de paclobutrazol de 0-100 mg/l. El paclobutrazol adelanto la tuberización in Vitro y aumento la uniformidad. La concentración de 0.01-1.0 mg/l fue la que obtuvo la mejor tuberización in vitro, ya que con altas concentraciones 10-1000 mg/l de este inhibidor, el numero y masa de microtuberculos fue disminuido (Simko, 1994).

El efecto de triadimefon y uniconazole fue comparado con el de Bencilaminopurina(BAP) para la producción de microtuberculos de papa, en los cultivares Kufri Jyoti, Kufri Badshaha y Kufri Sinduri. Los dos triazoles tuvieron

un efecto positivo en la producción de microtuberculos, pero el uniconazole a concentración mas baja 0.01 mg/l, fue más eficaz al producir mas microtuberculos y mas peso promedio que la concentración de 10 mg/l de BAP, obteniéndose los mejores resultados con 0.5 mg/l de uniconazole(Chandra et al.,1992).

Utilizando explantes de papa con un solo nudo, cultivadas en MS, añadiendo sacarosa 8% y varias concentraciones de BA y varios fotoperiodos, en tres tipos de medios(medio en agitación, medio estático líquidos y medio sólido) para producir microtuberculos in Vitro; la aplicación de 2.5 mg/l de BA dio el mejor resultado, no habiendo tuberización en medio liquido estático, no habiendo diferencia significativa entre medio agitado y el medio sólido en este respecto, no habiendo diferencia significativa en la capacidad de tuberización en la oscuridad y en fotoperiodo de 8 hrs, pero mas del 60% de microtuberculos fueron formados con el medio en la luz y 80% fue formado microtuberculos en la oscuridad (Le, 1993).

El inductor de microtuberculos más eficaz en el cultivo in-vitro fue la Benziladenina (BA) en el diploide Hol 2/17. La regeneración de los cultivos in vitro, fueron plantados en crisoles en invernadero para probar la tuberización in vivo. Siendo la producción de microtuberculos similar a la de in-vitro (Miclovicova et al., 1993).

Bajo día corto y a bajas temperaturas la adición de BA , aumento la producción de microtuberculos/planta y el peso medio de microtuberculos a partir de 115mg-364mg.

Al utilizar CCC(Chlormequat) y BA en la formación de microtuberculos, a partir de explantes de papa provenientes del cultivo de meristemos, de los cultivares Benimaru, Reina de Mayo, y Danshakuimo; se aumento el peso fresco de los microtuberculos después de 28 días, siendo los mas grandes con 500 mg/l de CCC y el BA 5 mg/l, bajo oscuridad. Siendo el CCC eficaz para aumentar el

numero de microtuberculos en el primer cultivar, pero el peso fresco de microtuberculos del cultivar Reina de Mayo fue pequeño comparado con los otros dos cultivares (Yamamoto et al.,1997).

Explantes de papa con un solo nudo de c.v Bintje fueron inducidos a microtuberizacion, con sacarosa 8% y BA de 22 M, incubados a temperatura de 20⁰ C en condiciones de día corto y oscuridad, o con 26⁰ C en condiciones de día largo y oscuridad. Se obtuvo deposito de almidón al tercer día en la parte basal de los brotes axilares cultivados a 20⁰ C y fotoperiodo de 12 hrs, o en oscuridad; pero en cambio, en condiciones de 26⁰ C y 16 hrs. luz o en oscuridad, esto ocurrió hasta el octavo día y en oscuridad al 12 día. En el testigo no se observo reserva de almidón después de 2 semanas. Las temperaturas altas retrazaron producción de microtuberculos especialmente en la oscuridad (Pevalek, 1997).

III.- MATERIALES Y METODOS

3.1 Ubicación del lugar

Este trabajo de investigación se realizo en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

3.2 Material vegetativo

Se utilizaron plántulas de papa de la variedad Alpha multiplicadas in-vitro, libres de cualquier enfermedad, por lo cual no se realizo previa desinfección.

3.3 Esterilización

Se esterilizo el medio de cultivo y el material a utilizar para la siembra(bisturi,pinzas,cristaleria) agua destilada, en una autoclave, por un tiempo de 45 minutos, con presión de 1.5 kg/cm²..

3.4 Siembra

La siembra se realizo en la campana de flujo laminar, de forma asceptica,utilizando mecheros para no tener contaminación al momento de la siembra.

3.5 Experimentos

Los experimentos se llevaron a cabo en 2 etapas.

Se llevaron a cabo tres experimentos en medio sólido, describiéndose cada uno de ellos a continuación:

3.5.1 Experimento 1

Etapas 1.

De plántulas cultivadas in-Vitro fueron cortados segmentos de tallos con su respectivo nudo, de 1 cm. de longitud, quitando la hoja de la yema axilar; posteriormente sembrando 10 nudos en cada frasco gerber con 30 ml, de medio MS, que contenía los componentes inorgánicos y orgánicos + sacarosa 30 gr/l. + agar 8 gr/l. Los cultivos se incubaron en condiciones de 25⁰C/ 18⁰C (día / noche) con un fotoperiodo de 16 hrs. durante 30 días.

Etapas 2.

Pasado los 30 días se les aplico medio MS liquido conteniendo 90 gr/l de sacarosa mas ABA y Kinetina para la inducción a microtuberculos, agregándole a cada frasco 5 ml; incubando los cultivos a una temperatura de 19⁰C y un fotoperiodo de 8 hrs, por un tiempo de 110 días. Cada tratamiento contó con 5 frascos(repeticiones), como se presenta a continuación:

- 1.- ABA 0.2 mg/l + 0.0 mg/l de Kinetina.
- 2.- ABA 0.2 mg/l + 0.1 mg/l de Kinetina.

- 3.- ABA 0.2 mg/l + 0.2 mg/l de Kinetina.
- 4.- ABA 0.2 mg/l + 0.4 mg/l de Kinetina.
- 5.- ABA 0.2 mg/l + 0.8 mg/l de Kinetina.
- 6.- ABA 0.2 mg/l + 1.6 mg/l de Kinetina.

3.5.2 Experimento 2.

Se utilizó la misma metodología que el experimento anterior, cambiando un solo reactivo con 6 tratamientos y 5 repeticiones por cada uno de ellos, a continuación se presentan:

- 1.- ABA 0.2 mg/l + 0.0 mg/l de BA
- 2.- ABA 0.2 mg/l + 0.1 mg/l de BA
- 3.- ABA 0.2 mg/l + 0.2 mg/l de BA
- 4.- ABA 0.2 mg/l + 0.4 mg/l de BA
- 5.- ABA 0.2 mg/l + 0.8 mg/l de BA
- 6.- ABA 0.2 mg/l + 1.6 mg/l de BA

3.5.3 Experimento 3.

Se hizo de igual forma que en los experimentos anteriores, solo que en este se utilizó ácido p-cumarico para la inducción de microtuberculos. Contándose, con 6 tratamientos y 5 repeticiones por cada uno de ellos:

- 1.- 0.0 mg/l de ácido p-cumarico
- 2.- 0.1 mg/l de ácido p-cumarico
- 3.- 0.2 mg/l de ácido p-cumarico
- 4.- 0.4 mg/l de ácido p-cumarico
- 5.- 0.8 mg/l de ácido p-cumarico
- 6.- 1.6 mg/l de ácido p-cumarico

3.6 Diseño Experimental

Para los 3 experimentos se utilizó un diseño completamente al azar y realizando también la prueba de comparación múltiple de medias por el método de Tukey.

3.7 Parámetros Evaluados

Los tres experimentos se evaluaron a los 140 días después de la siembra, con la ayuda de un vernier y una balanza analítica, evaluándose los siguientes parámetros:

- 1.- Número de microtuberculos por cultivo o frasco.
- 2.- Diámetro ecuatorial de microtuberculos.
- 3.- Peso de microtuberculos.

VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EXPERIMENTO 1

4.1.1 Numero de microtuberculos por cultivo

En la evaluación realizada a los 140 días (figura 1) no se encontró diferencia significativa, pero numéricamente los mejores tratamientos fueron con la combinación de 0.2 mg/l de ABA + 0.1 mg/l de Kinetina, con 5.8 microtuberculos por cultivo; seguido del tratamiento de 0.2 mg/l de ABA + 1.6 mg/l de Kinetina con 5.6 microtuberculos por cultivo; también el tratamiento con 0.2 mg/l de ABA + 0.4 mg/l de Kinetina, con 5.4 microtuberculos por cultivo.

Se puede observar que hay una tendencia a incrementarse el numero de microtuberculos al aumentarse la concentración de Kinetina, sin embargo las caídas que se observan con 0.2 y 0.8 mg/l de Kinetina, no deja clara esta tendencia.

4.1.2 Diámetro de microtuberculos

En esta variable(figura 2) el mejor tratamiento fue con 0.2 mg/l de ABA + 0.0 mg/l de Kinetina obteniéndose un diámetro de 5.75 mm, siguiéndole el tratamiento de 0.2 mg/l de ABA + 0.4 mg/l de Kinetina, donde el diámetro fue de 5.68 mm.

Sin embargo todos los tratamientos fueron estadísticamente iguales.

En general podemos decir que el diámetro de los microtuberculos tendió a

disminuir al incrementarse la concentración de Kinetina, lo cual es de esperarse, ya que al incrementarse el número de microtuberculos con la Kinetina, el diámetro normalmente tiende a disminuir; sin embargo esta respuesta no fue muy uniforme.

Estos resultados obtenidos en cuanto a la interacción de las hormonas, coinciden con Weaver, (1990) quien menciona que las hormonas no actúan solas sino que interactúan unas con otras, esto debido al balance entre los promotores e inhibidores del crecimiento.

4.1.3 Peso de microtuberculos

En los resultados obtenidos en esta variable (figura 3), el mejor tratamiento fue el de la concentración de 0.2 mg/l de ABA + 0.0 mg/l de Kinetina, obteniendo un peso de 151.46 mg; siguiéndole los tratamientos, con 0.2 mg/l de ABA + 0.2 mg/l de Kinetina y 0.2 mg/l de ABA + 1.6 mg/l de Kinetina, obteniendo un peso de 129.13 mg y 129.13 mg respectivamente.

Sin embargo, de nuevo se ve una tendencia a la disminución del peso de los microtuberculos con una mayor dosis de Kinetina lo cual confirma que a mayor número de microtuberculos, menor es el diámetro y peso de estos.

En este experimento las plantas se mostraron vigorosas y con entrenudos largos y tallos gruesos, hasta el momento de la evaluación, no presentándose senescencia.

Estos resultados coinciden con Lira (1994) quien menciona que las citocininas son promotoras de la división celular, alargamiento celular, formación de órganos, contrarresto del letargo, prevención de la senescencia y

movilización de nutrientes.

Pérez (1999), obtuvo el mayor peso de microtuberculos con la concentración de 0.2 mg/l de ABA, con un peso de 61.9 mg.

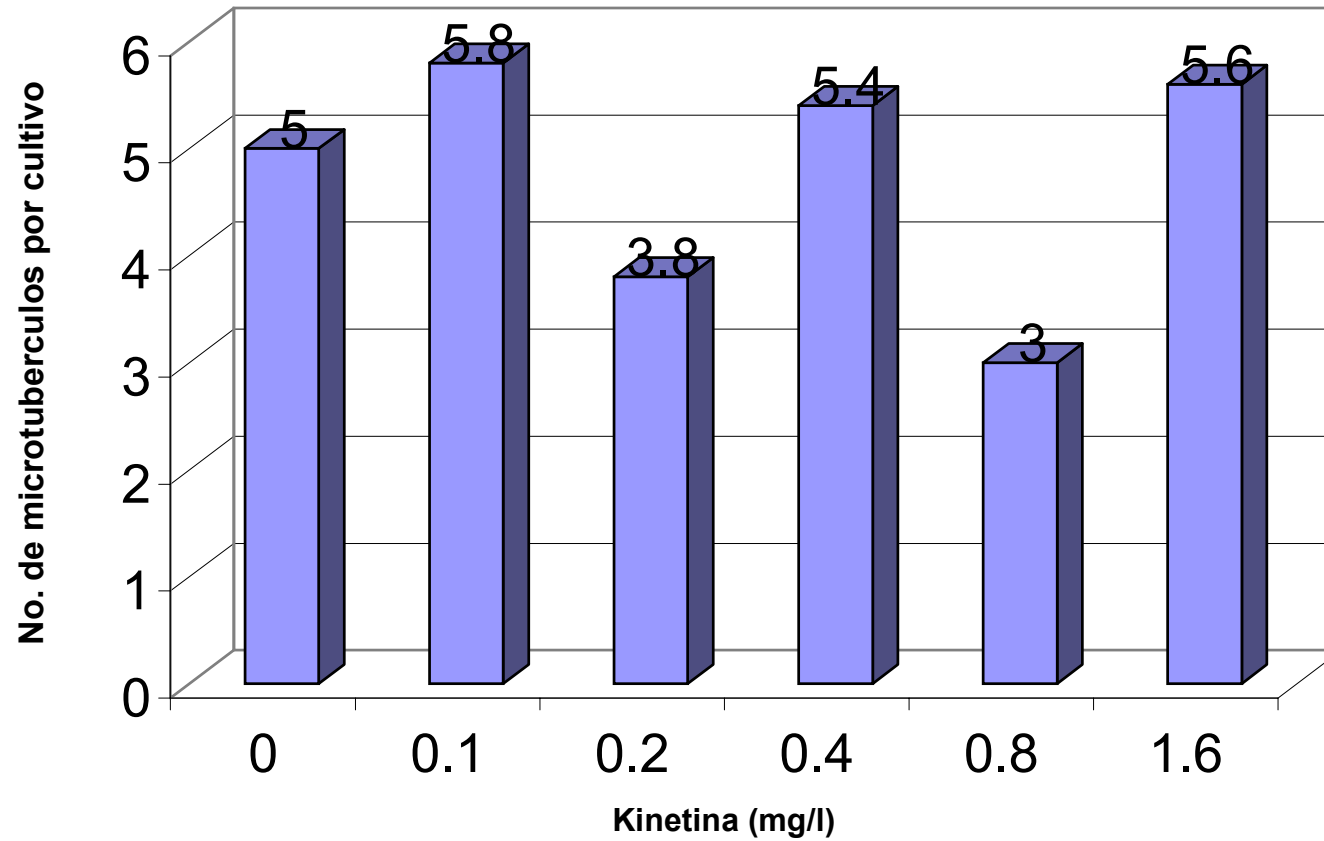


Figura. 1 Efecto del ABA 0.2 mg/l + Kinetina (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el numero de microtuberculos por cultivo, evaluándose a los 140 días.

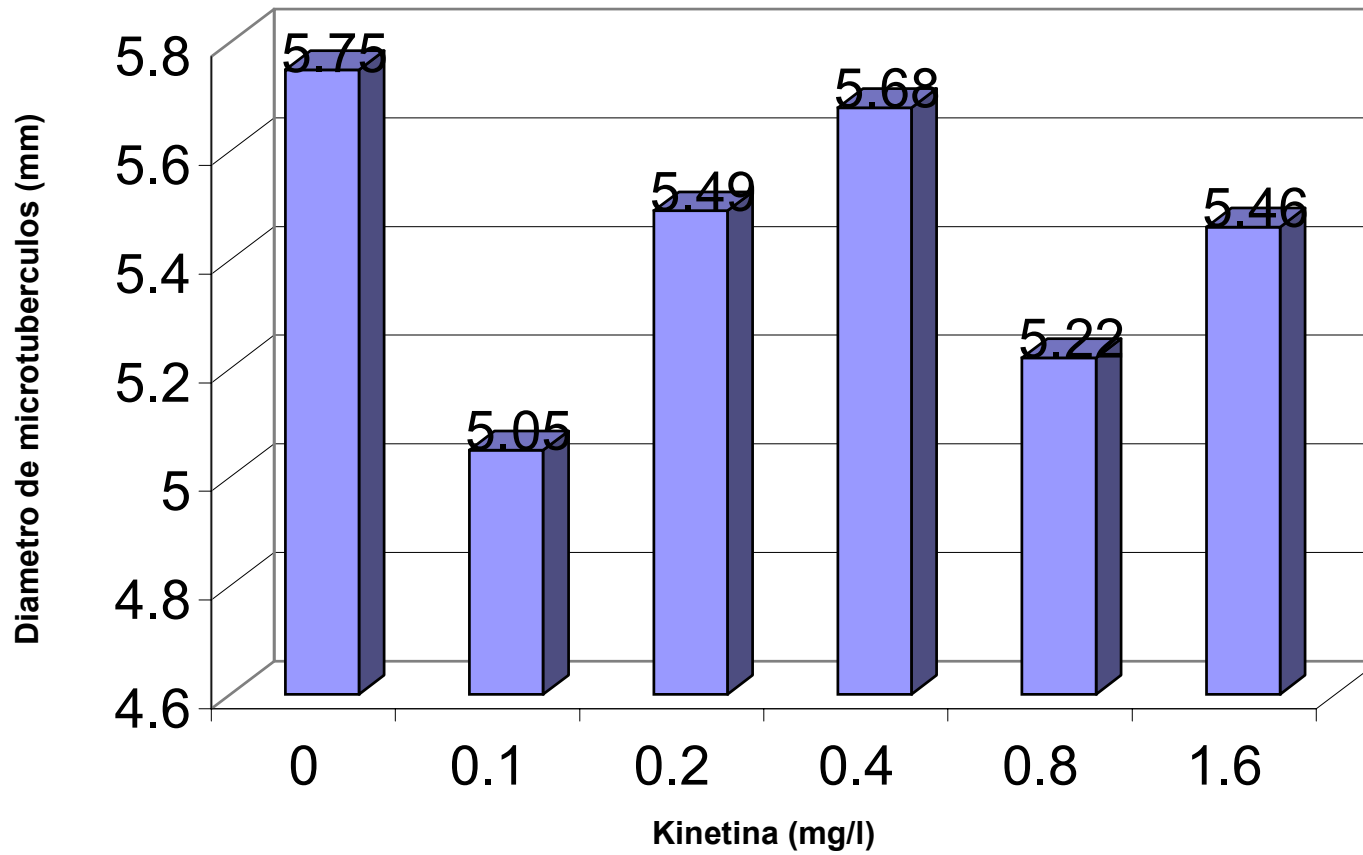


Figura. 2 Efecto del ABA 0.2 mg/l + Kinetina (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el diámetro de microtuberculos, evaluándose a los 140 días.

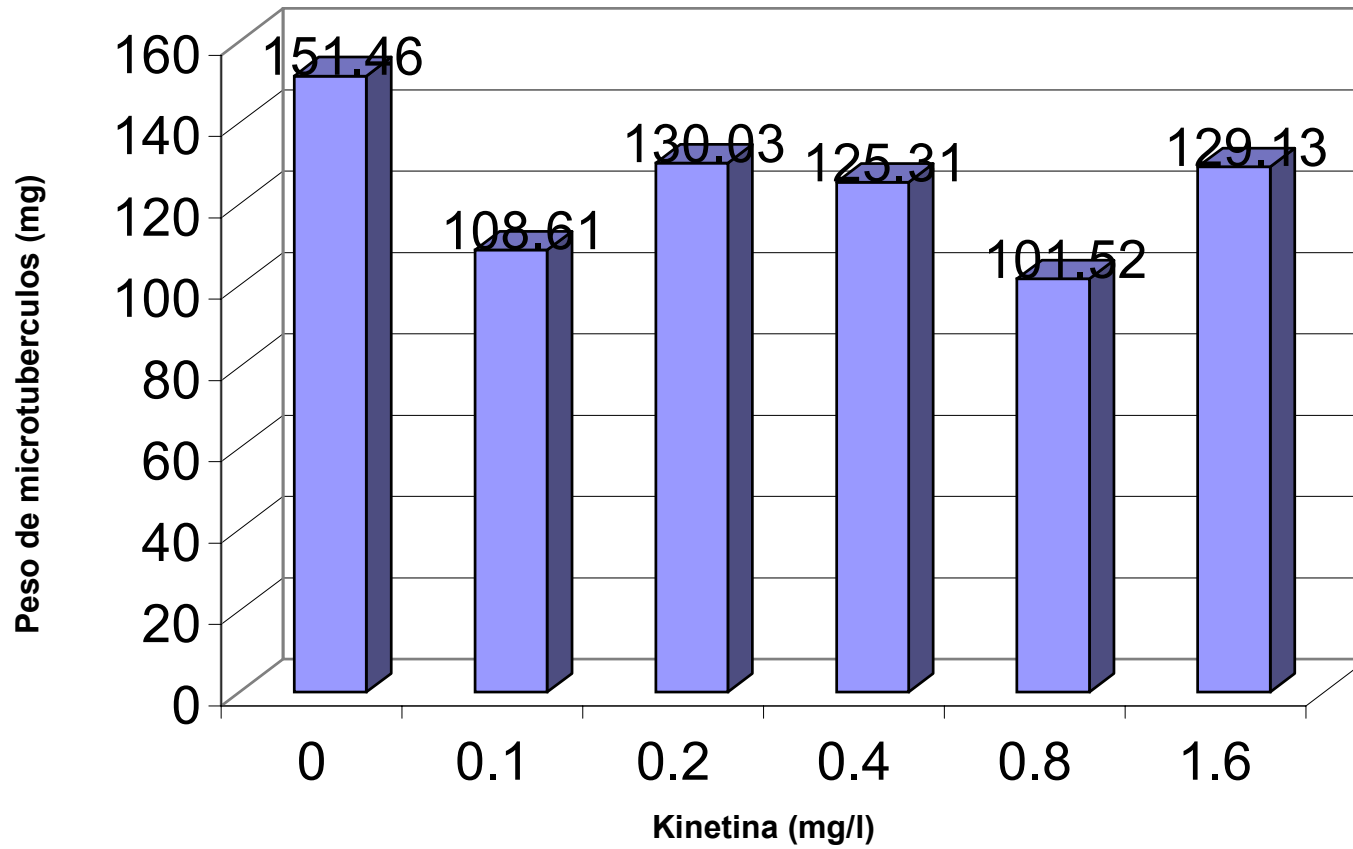


Figura. 3 Efecto del ABA 0.2 mg/l + Kinetina (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el peso de microtuberculos, evaluándose a los 140 días.

4.2 EXPERIMENTO 2

4.2.1 Numero de microtuberculos por cultivo

En esta variable (figura 4) el tratamiento que se comporto mejor fue con una interacción de 0.2 mg/l de ABA + 0.1 mg/l de BA donde se obtuvieron 8.8 microtuberculos por cultivo, seguido del tratamiento con 0.2 mg/l de ABA + 0.2 mg/l de BA con, un total de 8.4 microtuberculos por cultivo.

Cabe mencionar que no hubo diferencia significativa entre tratamientos. Sin embargo es claro que el BA aumento el numero de microtuberculos con relación al tratamiento sin BA, pero al llegar a la mayores dosis, este efecto tendió a disminuir y a ser negativo con 1.6 mg/l.

Esto coincide por los resultados obtenidos por Xin (1998), a obtener 100 % de tuberización en diferentes concentraciones de sucrosa, cuando se le añadió ABA al medio de cultivo.

4.2.2 Diámetro de microtuberculos

El mejor tratamiento (figura 5) en cuanto a esta variable se obtuvo con 0.2 mg/l de ABA + 1.6 mg/l de BA, con microtuberculos de 5.9 mm, siguiéndolo el tratamiento con 0.2 mg/l de ABA + 0.0 mg/l de BA con microtuberculos de 4.78 mm de diámetro. Estos resultados nos confirman que a mayor numero de microtuberculos, menor diámetro y viceversa.

No habiendo diferencia significativa entre tratamientos.

4.2.3 Peso de microtuberculos

El mejor resultado (figura 6) lo obtuvo el tratamiento con una concentración de 0.2 mg/l de ABA + 1.6 mg/l de BA, con 166.77 mg de peso.

En esta variable no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos.

Sin embargo, de nuevo se confirma que el BA al aumentar él numero de

microtuberculos, disminuye su diámetro y peso; y que cuando se reduce el número de microtuberculos, el diámetro y peso de estos tiende a incrementarse. Si comparamos estos resultados, con los obtenidos por Pérez (1999), quien utilizó únicamente ABA, podemos concluir que la adición de citocininas al medio de cultivo, especialmente BA, mejoran la respuesta, ya que obtiene un mayor número de microtuberculos, pero es recomendable usar 0.1 mg/l de BA, para que el diámetro y peso de los microtuberculos no se vea reducido tan drásticamente.

4.3 Experimento 3

4.3.1 Número de microtuberculos por cultivo

En la evaluación (figura 7) de esta variable, el mejor tratamiento fue con una concentración de 0.2 mg/l de Ácido p-cumarico, donde se obtuvo un total de 13.2 microtuberculos por cultivo; seguido de los tratamientos, con concentraciones de 0.8 y 0.4 mg/l de Ácido p-cumarico, con 12.8 y 12 microtuberculos por cultivo, respectivamente.

El tratamiento que obtuvo el menor número de microtuberculos fue el tratamiento de 0.0 mg/l de Ácido p-cumarico, con 9.2 microtuberculos por cultivo, no habiendo diferencia significativa entre tratamientos.

Estos resultados coinciden con los de Koda et al., (1988), quienes encontraron una sustancia inhibidora del crecimiento que indujo a la formación de microtuberculos in vitro, en concentraciones de 3×10^{-8} M .

Es claro que el ácido p-cumarico aumenta el número de microtuberculos con relación al testigo, teniendo su dosis óptima a 0.2 mg/l, ya que a mayores dosis este efecto tiende a disminuir.

En este experimento el testigo no contiene ABA, como en el caso de los 2 experimentos anteriores, por lo que es difícil hacer una comparación con los otros dos experimentos, sin embargo es claro que el ácido p-cumarico estimula la producción de microtuberculos, tal como lo hace el ABA, por lo que será recomendable comparar a estos dos inhibidores en un futuro trabajo.

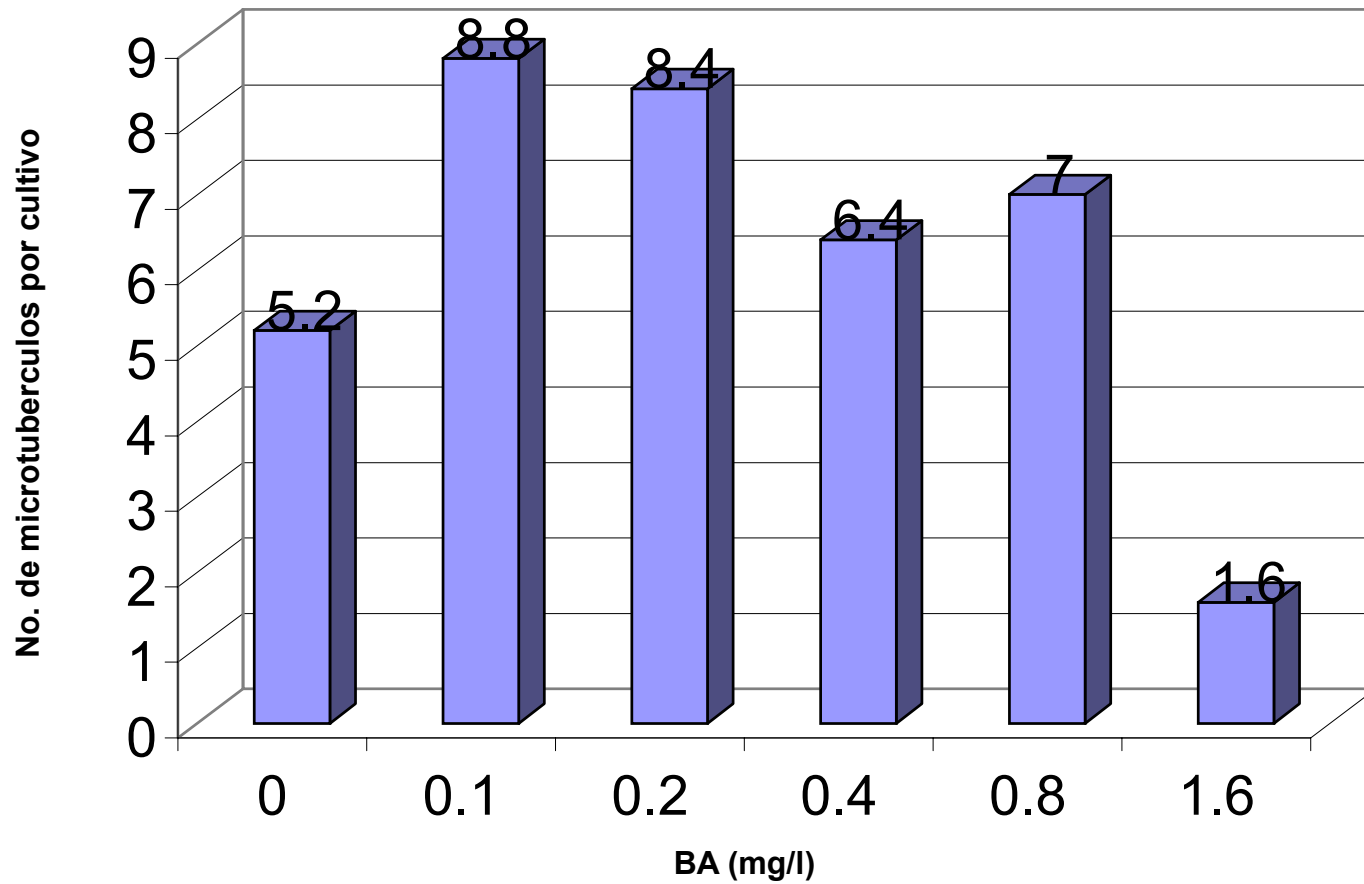


Figura 4. Efecto del ABA 0.2 mg/l + BA (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el número de microtuberculos, evaluándose a los 140 días.

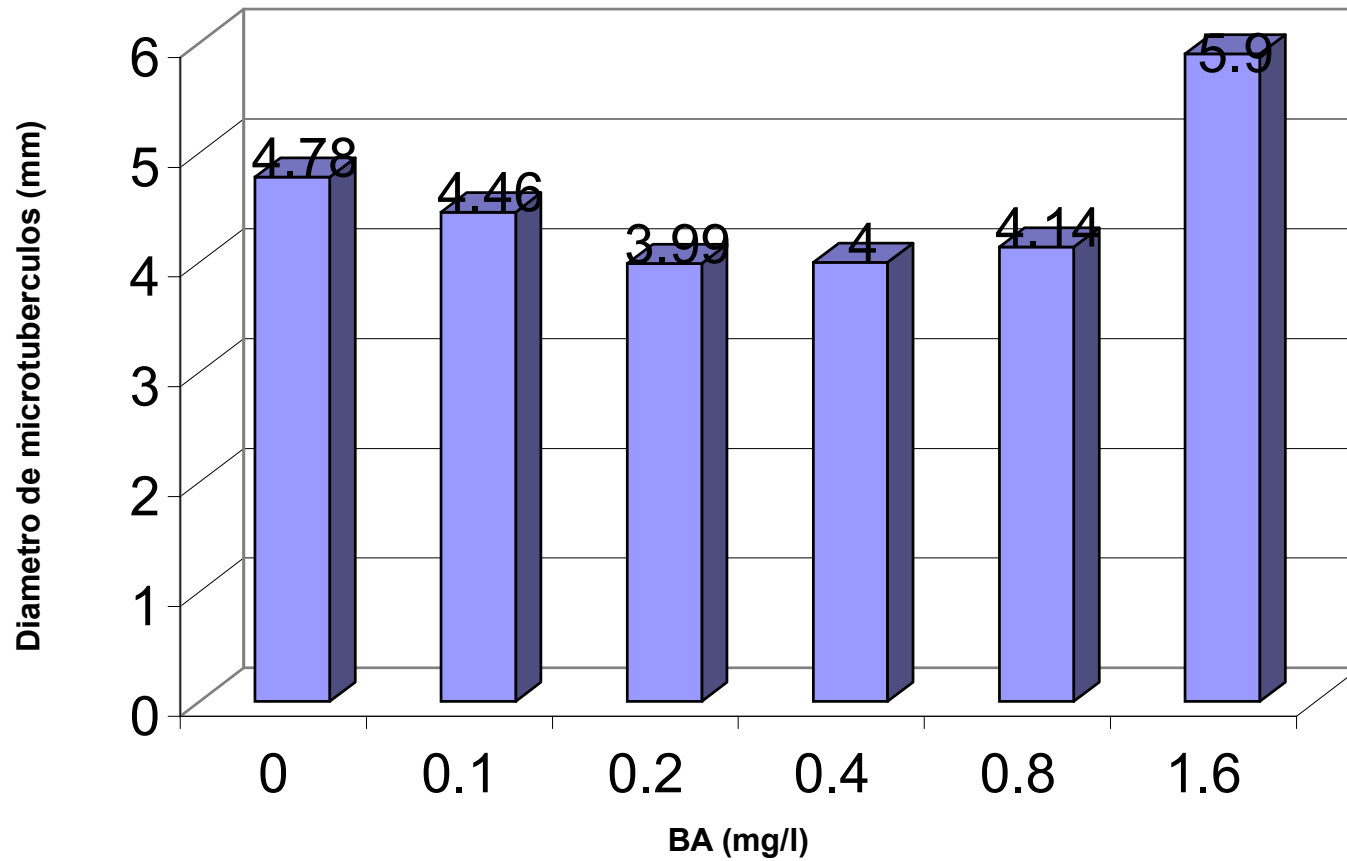


Figura 5. Efecto del ABA 0.2 mg/l + BA (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el diámetro de microtuberculos, evaluándose a los 140 días.

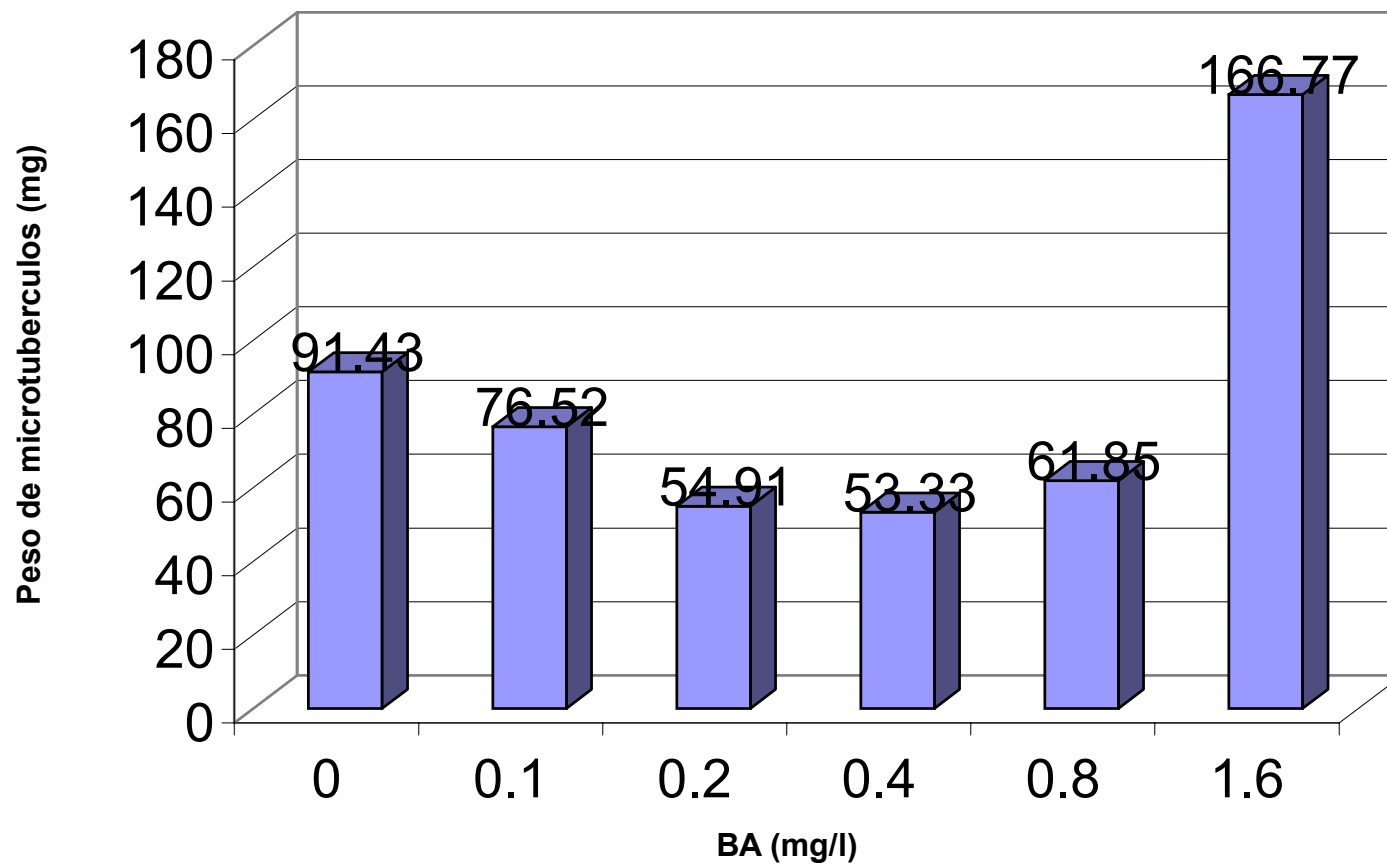


Figura 6. Efecto del ABA 0.2 mg/l + BA (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el peso de microtuberculos, evaluándose a los 140 días.

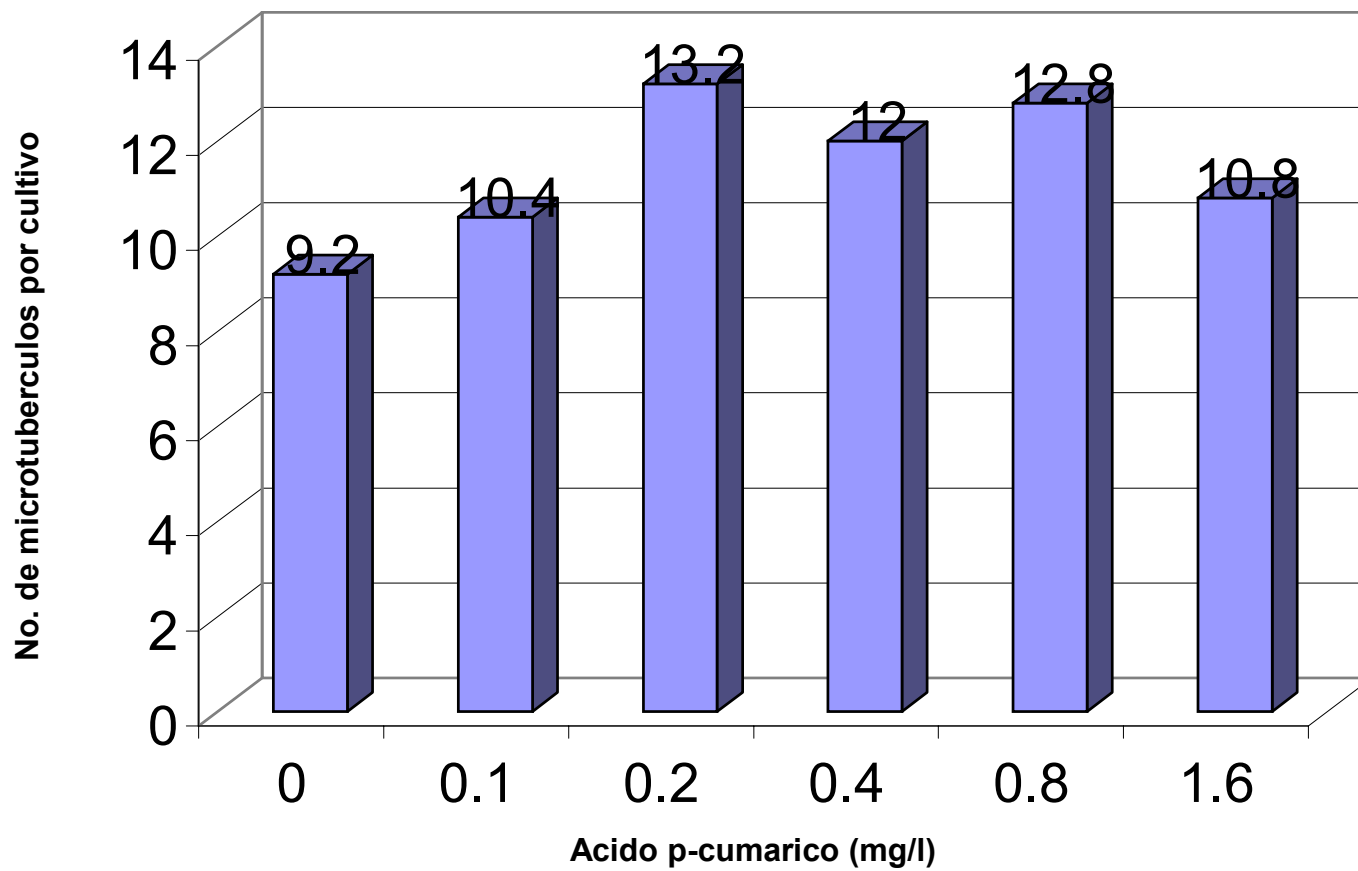


Figura 7. Efecto del ácido p-cumarico (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el numero de microtuberculos por cultivo, evaluándose a los 140 día

4.3.2 Diámetro de microtuberculos

En esta variable(figura 8) el tratamiento que sobresalió fue con una concentración de 1.6 mg/l de ácido p-cumarico, con diámetro de 3.74 mm; seguido por el tratamiento con 0.4 mg/l de ácido p-cumarico, obteniendo un diámetro de 3.72 mm, no encontrándose diferencia significativa entre tratamientos.

En este caso también, al aumentarse el numero de microtuberculos con el ácido p-cumarico, el diámetro de estos tendió a disminuir, especialmente con la dosis de 0.2 mg/l.

Sin embargo podemos decir que con la dosis de 0.4 mg/l es posible obtener buen numero de microtuberculos, sin afectar su diámetro.

4.3.3 Peso de microtuberculos

En la evaluación de esta variable(figura 9), se encontró que el mejor tratamiento fue a una concentración de ácido p-cumarico de 0.4 mg/l, con un peso de 45.34 mg, seguido de los tratamientos con concentraciones de 1.6 y 0.0 mg/l de ácido p-cumarico con, pesos de 43.68 y 41.97 mg, respectivamente; encontrándose que el tratamiento que obtuvo el menor peso fue con una concentración de 0.2 mg/l de ácido p-cumarico, con peso de 35.05 mg, lo cual puede deberse a que con esta dosis se obtuvo el mayor numero de microtuberculos por cultivo, no encontrándose diferencia significativa entre tratamientos.

En este experimento las plantas mostraron al momento de la evaluación, una marcada senescencia en las hojas aumentando esta a medida que las concentraciones del ácido p-cumarico eran mas fuertes o altas. Las plantas no mostraron un desarrollo vigoroso en cuanto a area foliar, lo cual es de esperarse si se considera que este inhibidor tiende a reducir el crecimiento y desarrollo de tallos y hojas, pero con esto se estimula la producción y tamaño de los microtuberculos.

Estos resultados coinciden con los de Márquez (1988), quien al trabajar con ácido p-cumarico en nogal, al aplicarlo a concentraciones de 10^{-5} M, este redujo la altura de la planta en un 23%, la longitud de entrenudos en 25% y el area foliar fue reducida en un 28%.

Leopold y Kriedemann (1975) y Wareing y Phillips (1978), mencionan que el ácido p-cumarico se dirige hacia las hojas y ápices donde estimula la oxidación de IAA al actuar como un activador de la enzima IAA-oxidasa, dando como resultado que la expansión de hojas y elongación de tallos sean inhibidas.

El ácido p-cumarico es pues un buen inductor de la tuberización de la papa in vitro, falta ver si este es más efectivo que el ABA y si su efecto se puede mejorar con la adición de una citocinina como el BA.

En la figura 12, se observan los microtuberculos obtenidos en cada uno de los tratamientos con ácido p-cumarico, de las 5 repeticiones o frascos, por lo que en cada una de esas cajas petri se tienen entre 45 y 65 microtuberculos.

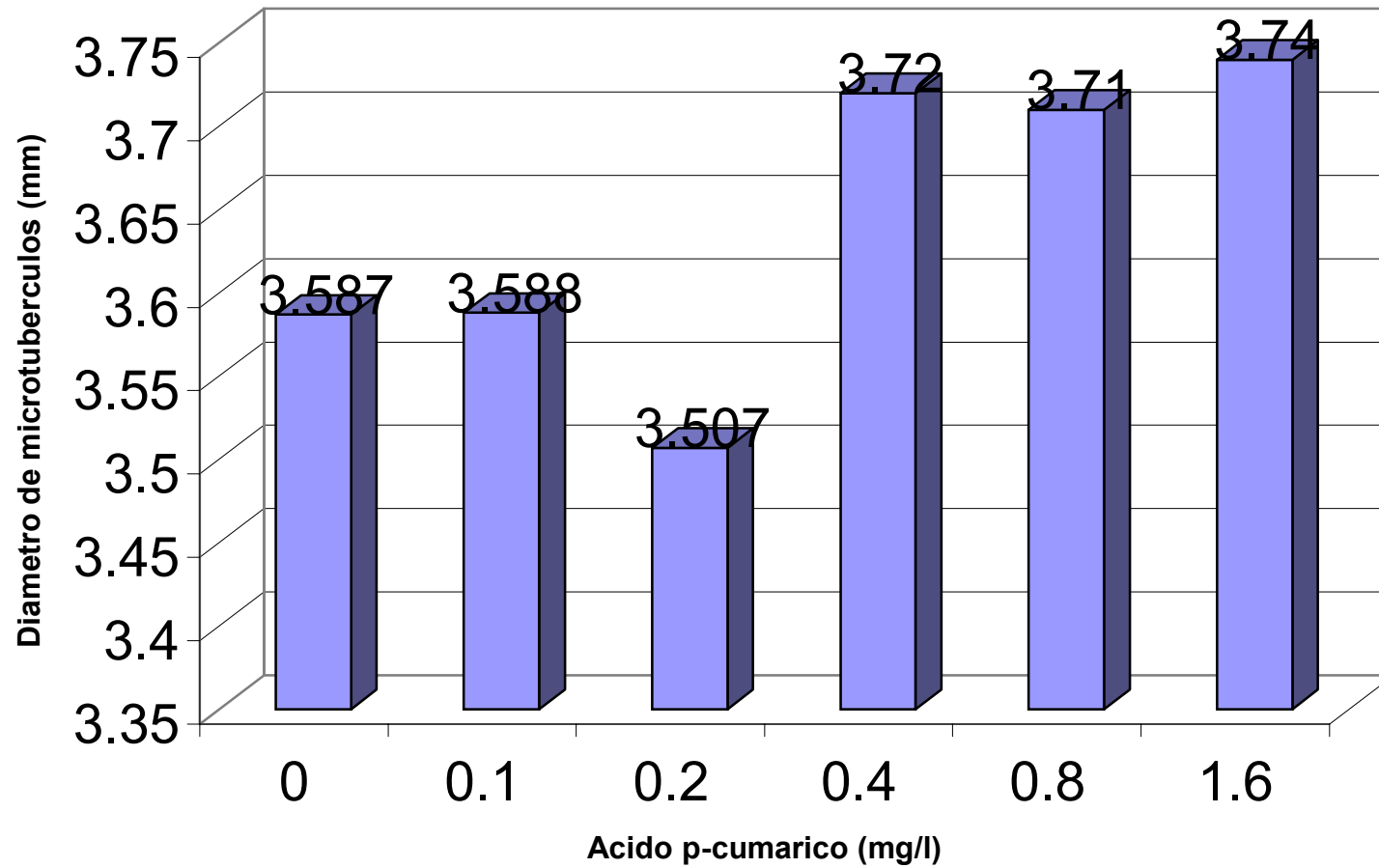


Figura 8. Efecto del ácido p-cumarico (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el diámetro de microtuberculos, evaluándose a los 140 días.

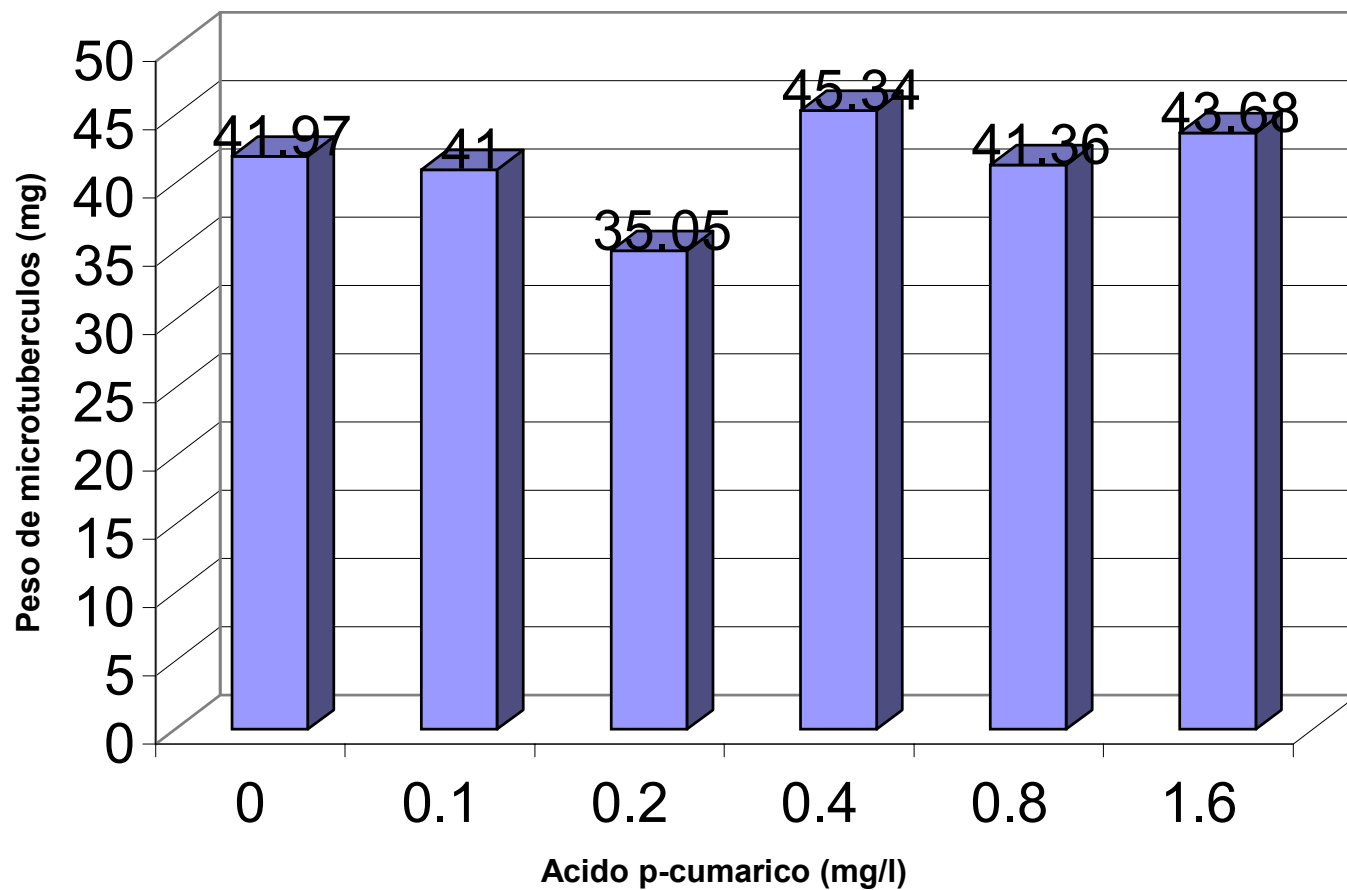


Figura 9. Efecto del ácido p-cumarico (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l) sobre el peso de microtuberculos, evaluándose a los 140 días.

En la figura 10, se puede observar el estado que presentaron las plántulas de papa a los 30 días después de la siembra, y que fue cuando se les aplicó los tratamientos con ABA + Citocininas o con ácido p-cumarico. Se puede observar que todos los explantes (10) sembrados inicialmente, produjeron una plántula y que estas tenían una altura aproximada de 7 cm.



Figura 10. Estado de las plántulas de papa a los 30 días después de la siembra.

En la figura 11, se presenta la respuesta obtenida con 0.8 mg/l de ácido p-cumarico, a los 140 días después de la siembra, observándose un promedio de 12.8 microtuberculos por cultivo o frasco, por lo que al menos cada plántula (10) produjo un microtuberculos (mayor al 100%).



Figura 11. Efecto del ácido p-cumarico (0.8 mg/l) sobre la producción de microtuberculos, vista a los 140 días después de la siembra.

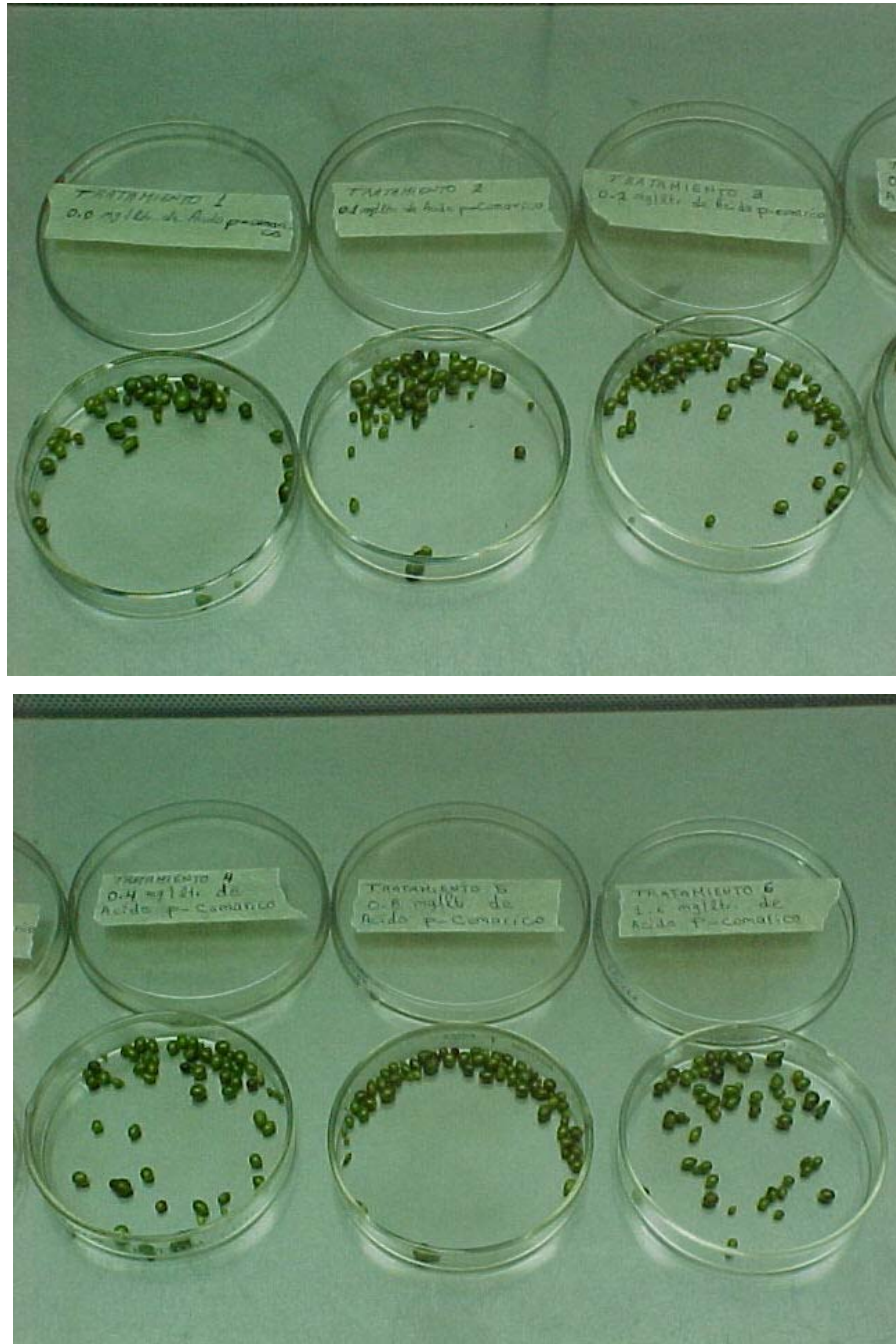


Figura 12. Microtuberculos obtenidos en el experimento con ácido p-cumarico (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/l), a los 140 días después de la siembra.

V.- CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos podemos concluir lo siguiente:

- 1.- Al combinar una citocinina con un inhibidor (ABA). Se mejora la cantidad de microtuberculos, en relación con la respuesta que se obtiene con el inhibidor únicamente.
- 2.- Este efecto promotor de las citocininas es mas marcado cuando se utiliza BA que cuando usamos Kinetina.
- 3.- La combinación más efectiva o recomendable es la de 0.2 mg/l de ABA + 0.1 mg/l de BA, ya que con esta se obtiene un mayor numero de microtuberculos (8.8 por cultivo), sin reducirse mucho el diámetro y peso de los microtuberculos.
- 4.- El ácido p-cumarico estimula la producción de microtuberculos, comparado con el testigo, obteniéndose la mejor respuesta con la dosis de 0.4 mg/l, ya que con esta se obtiene un buen numero de microtuberculos (12) y un buen diámetro (3.72 mm) y peso (45.34 mg) de estos.

VI.- RECOMENDACIONES

- 1.- Para futuros experimentos, se recomienda evaluar el efecto comparativo del ABA y el ácido p-cumarico a dosis similares y/o en combinaciones, así como determinar si la respuesta al ácido p-cumarico se puede mejorar con la adición de las citocininas, especialmente el BA.

- 2.- Se recomienda evaluar el efecto de una mayor concentración de sacarosa en el medio de cultivo, para determinar si esta puede contrarrestar la disminución de diámetro y peso de los microtuberculos al incrementarse él numero de estos en los cultivos.

VII. LITERATURA CITADA

- Addicott, F.T. and Lyon, J.L. 1969. Physiology of abscisic acid and related substances. *An. Rev. Plant. Physiol.* 20:139-164.
- Alonso, A. F. 1996. *El Cultivo de la Patata*. Prensa Mundi. México D.F.
- Bokelmann, G.S. and Roest S. 1983. Plant regeneration from protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* cv. Bintje) *Z. Pflanzenphysiol.* 109: 259-265.
- Confederación Nacional de Productores de Papa de la Republica Mexicana (CONPAPA) 1995. *Memorias del VI Congreso Nacional de Producción de Papa*. Saltillo, Coahuila, México.
- Chandra, R., Randhawa, G.J., Chaudhari, D.R. and Upadhya, M.D. 1992. Efficacy of triazoles for in vitro microtuber production in potato. *Potato-Research* 35:3,339-341.
- Dodds, H.J. 1998. *Tissue Culture Technology, Practical Application of Sophisticated Methods*. International potato Center(CIP). Lima Perú pp. 167-179.
- Edmont J.B., Seen F.S. and Andrews F.S. 1967. *Principios de Horticultura*. Editorial continental S.A. de C.V. México D.F.
- Gopal, J., Minocha, J.L. and Dhaliwal, H.S. 1998. Microtuberization in potato(*Solanum tuberosum* L.) *Plant-Cell-Reports*. 17: 10, 794-798.
- Hartmann , H.T. y Kester D.E. 1999. *Propagación de Plantas*. Ed. Continental S.A de C.V. México D.F.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) 1997. *Programa Nacional de Investigaciones en el cultivo de la Papa*. Publicación especial No. 13 México D.F.

Instituto Nacional de Estadística , Geografía e Informática (INEGI), 1999. El Sector Alimentario en México. Cultivo de la Papa.

Kefeli, V.I. and Kutacek 1977. Plant Growth Regulation (ed. P.E. Pilet). Proceedings 9 th. Internat. Conf. Lausanne. Springer-Verlag, Berlin, pp. 181-188.

Koda, Y., El- Sayed, A. O., Yoshihara, T., Shibata, H., Sakumara, S. and Okazawa, Y. 1988. Insolation of a specific potato tuber-inducing substance from potato leaves. Plant Cell Physiology. 29:1047-1051.

Le, C.L. 1993. In vitro tuberization of cultivated potato(*Solanum tuberosum* L.) cv. Bintje.Revue-Suisse-d' Agriculture. 25:6, 365-367.

Leopold, A.C. and Kriedmann P.E. 1975. Plant Growth and Development. 2da. Ed. New York. Mc Graw –Hill.

Li, P.H. 1985. Potato Physiology. Academic Press. Inc. Orlando Florida. USA.

Lira, S.R.H.1994. Fisiología Vegetal. Ed. Trillas Mexico, D.F.

López, C.M., Closas, M.L., Toro, J. and Pelacho, A.M. 1999. Cambios Morfológicos y Estructurales causados por el ácido jasmonico en el sistema radical de explantos de *solanum tuberosum*. VI Congreso

Márquez, Z.C.F. 1988. Efecto del paclobutrazol, dikegulac, ácido cinámico y ácido p-cumarico sobre el crecimiento vegetativo del nogal. (*Carya illinoensis* (Wats.) K. Koch) Tesis Profesional UAAAN.

Merino H. 2000. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. México D.F.

Miklovicova, M. and Suantnerova, Z. 1993. Induction of tuberization in haploids of *Solanum tuberosum* L. Genetic-et-Biologia Molecularis. 24-25: 53-59.

Narro, F.E.A. 1986. Efecto de mejoradores del suelo sobre el rendimiento del cultivo de papa. Reunión sobre Investigación y Análisis de la Problemática de Papa. UAAAN, CONACYT, Asociación de Productores de Papa de Saltillo, Coahuila.

Norma Oficial Mexicana, 1997. Certificación de Semilla de Papa. Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural. México, D.F. pag. 1-12.

Pavelek, K.B. and Berljak, J. 1997. Starch accumulation as a marker for microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.) Biologia- Bratislava 52; 4, 553-559.

Pelacho, A.A.M.; Llosas, L.M.; Cueva, B.R.M. 1997. Reguladores del Crecimiento. http://www.etsea.udl.es/in_vitro/meristem.htm.

Perez, P.J. 1999. Producción de microtuberculos de papa in vitro. Efectos del ABA, Fotoperiodo y Características Físicas del Medio Nutritivo. Tesis profesional UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Perez, G.M.; Marquez, S.F. AND Peña, L.A. 1997. Mejoramiento Genético de Hortalizas. Universidad Autónoma de Chapingo. Imprenta Universitaria.

Ramos, P. 1991. Diagnóstico sobre el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.)₆₂

en el area de influencia de la UAAAN. Monografía, UAAAN Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Rojas G.M. 1987. Control Hormonal del Desarrollo de las Plantas. Fisiología-Tecnología-Experimentación. Editorial Limusa México D.F.

Roca,W., Espinoza,M. and Bryan J.E. 1978. A tissue culture method for the rapid propagation of potatoes . Potato Journal (55) 691-701. USA.

Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) 1994. Hortícolas y ornamentales, datos básicos No. 5 Documento de Circulación Interna. México D.F.

SARH 1992. Manual de Producción de Semilla de Papa. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. México pp. 1-95.

Salisbury B.F. 1994. Fisiología Vegetal. Editorial Iberoamericana S.A. de C.V. México D.F.

Shepard, J.F. 1975. Regeneration of plants from protoplasts of potato virus ix-infected tobacco leaves. Virology 66: 482-501.

Schumann, U. and H. Koblitz 1983. Studies on plant recovery from mesophyll protoplasts of *Solanum tuberosum* L. An solanum phurega juz. Ef Buk. Biol. Plant. 25:180-186.

Simko, I. 1994. Effect of paclobutrazol on in vitro formation of potato microtubers and their sprouting after storage. Biologia-plantarum. 36:1,15-20.

Sopory, S.K. 1978. Utilization of anther culture technique crop improvement. In “ Current Advances in Plant Reproductive Biology”.pp.239-248.

- Valdez, L.G.S. y Moreno, A.L.A. 1995. Mantenimiento y Producción de Germoplasma de Papa in Vitro. Avances de Investigación. CIA-FAUANL.
- Valadez, L.A. 1998. Producción de Hortalizas. Octava reimpresión. Editorial Limusa S.A. De C.V.
- Vázquez, Y.C.; Orozco, R.M; Sánchez, M.E; Cervantes, V. 1997. La reproducción de las plantas: Semillas y meristemas.
http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/vol...7/htm/sec_6.htm.
- Villareal, G.M.J. 1987. Producción de Tubérculo-semilla Comercial de Papa en México. Seminario sobre la Producción de Tuberculo-semilla Comercial de Papa. INIFAP-CIP.Lima Peru. P. 8-15.
- Wang, P.J. and Hu C.Y. 1980. Regeneration of virus-free plants trough in vitro culture.Ad.Bichem.Eng.18:61-99.
- Weaver, J.R. 1990. Reguladores del Crecimiento de las Plantas en la Agricultura. Editorial trillas. P.137.
- Westcott R.J. 1981. Tissue culture storage of potato germoplasm 1. Minimal growth storage. Potato Res. 24:331-342.
- Wright, N.S. 1983. Uniformity among virus-free clones of ten potato cultivars. Am. Potato J. 40:381-388.
- Xin Xu, Andre 1998. The role of gibberellin, absicic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro. Plant Physiol. 117:575-584.
- Yamamoto, T. and Nakata, K. 1997. Effect of CCC and BA on the formation of

potato tuber in vitro. Japanese Journal-of-Crop-Science.66;4,663-668.

VIII.-APENDICE

EXPERIMENTO UNO

TABLA 1. Análisis de varianza para la variable de respuesta; número de microtuberculos por cultivo, evaluándose a los 140 días (datos transformados de raíz cuadrada de $x+0.5$).

F.V	G.L.	S.C.	C.M.	F	P>F
TRAT.	5	2.392258	0.478452	0.5954 NS	0.706
ERROR	24	19.284500	0.803521		
TOTAL	29	21.676758			

C.V.= 42.06%

** = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 1 %

* = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

NS= NO SIGNIFICATIVO

TABLA 2. Análisis de varianza para la variable de respuesta; diámetro de microtuberculos, evaluándose a los 140 días(datos transformados de raíz cuadrada de $x+0.4$).

F.V	G.L.	S.C	C.M	F	P>F
TRAT	5	3.551392	0.710278	1.6051 NS	0.196
ERROR	24	10.619995	0.442500		
TOTAL	29	14.171387			

C.V.= 31.33%

** = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 1 %

* = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

NS= NO SIGNIFICATIVO

TABLA 3. Análisis de varianza para la variable de respuesta; peso de microtuberculos, evaluándose a los 140 días(datos transformados de $\ln(x+3)$).

F.V	G.L	S.C.	C.M.	F	P>F
TRAT	5	17.229614	3.445923	1.7673 NS	0.157
ERROR	24	46.796936	1.949872		
TOTAL	29	64.026550			

C.V. = 33.26%

** = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 1%

* = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5%

NS= NO SIGNIFICATIVO

EXPERIMENTO DOS

TABLA 4. Análisis de varianza para la variable de respuesta; número de microtuberculos por cultivo evaluándose a los 140 días(datos transformados de raíz cuadrada de $x+0.5$).

F.V	G.L	S.C.	C.M.	F	P>F
TRAT	5	10.602224	2.120447	1.4517 NS	0.242
ERROR	24	35.055603	1.460650		
TOTAL	29	45.657837			

C.V. = 52.95 %

** = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 1 %

* = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

NS= NO SIGNIFICATIVO

TABLA 5. Análisis de varianza para la variable de respuesta; diámetro de microtuberculos, evaluándose a los 140 días(datos transformados de raíz cuadrada de $x+0.3$).

F.V	G.L	S.C.	C.M.	F	P>F
TRAT	5	3.559143	0.711829	1.1949 NS	0.341
ERROR	24	14.297928	0.595747		
TOTAL	29	17.857071			

C.V. = 49.74%

** = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 1 %

* = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

NS= NO SIGNIFICATIVO

TABLA 6. Análisis de varianza para la variable de respuesta; peso de

microtuberculos, evaluándose a los 140 días(datos transformados de $\ln(x+3)$).

F.V	G.L	S.C.	C.M.	F	P>F
TRAT	5	12.805939	2.561188	1.0697 NS	0.402
ERROR	24	57.460876	2.394203		
TOTAL	29	70.266815			

C.V. = 50.35%

** = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 1 %

* = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

NS= NO SIGNIFICATIVO

EXPERIMENTO TRES

TABLA 7. Análisis de varianza para la variable de respuesta; numero de microtuberculos, por cultivo, evaluándose a los 140 días.

F.V	G.L	S.C.	C.M.	F	P>F
TRAT	5	58.799805	11.759961	0.7342 NS	0.607
ERROR	24	384.400146	16.016672		
TOTAL	29	443.199951			

C.V. = 35.11%

** = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 1 %

* = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

NS= NO SIGNIFICATIVO

TABLA 8. Análisis de varianza para la variable de respuesta; diámetro de microtuberculos, evaluándose a los 140 días.

F.V	G.L	S.C.	C.M.	F	P>F
TRAT	5	0.233124	0.046625	0.3870 NS	0.853
ERROR	24	2.891266	0.120469		
TOTAL	29	3.124390			

C.V. = 9.52%

** = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 1 %

* = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

NS= NO SIGNIFICATIVO

TABLA 9. Análisis de varianza para la variable de respuesta; peso de microtuberculos, evaluándose a los 140 días.

F.V	G.L	S.C.	C.M.	F	P>F
TRAT	5	307.652344	61.530468	0.7869 NS	0.571
ERROR	24	1876.722656	78.196777		
TOTAL	29	2184.375000			

C.V. = 21.36%

** = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 1 %

* = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

NS= NO SIGNIFICATIVO

