

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISION DE AGRONOMIA



Producción de microtuberculos de papa In vitro. "Efectos del ABA, fotoperiodo y características físicas del medio nutritivo".

Por:

JUVENTINO PEREZ PEREZ

T E S I S

***Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:***

Ingeniero Agrónomo en Horticultura

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Marzo ,1999.

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
DIVISION DE AGRONOMIA

Producción de microtuberculos de papa In vitro. "Efectos del ABA, fotoperiodo y características físicas del medio nutritivo".

TESIS

Presentada por:

JUVENTINO PEREZ PEREZ

**Que Somete a Consideración del H. Jurado Examinador
como Requisito Parcial para Obtener el Titulo de:**

Ingeniero Agrónomo en Horticultura

Dr. Marco A. Bustamante Garcia
Asesor principal

MS. Leticia A. Bustamante Garcia
Asesor

MC. Alberto Sandoval Rangel
Asesor

M.C. Mariano Flores Davila
COORDINADOR DE LA DIVISION DE AGRONOMIA
Buenavista, Saltillo, Coahuila., México.
Marzo, 1999.

DEDICATORIAS

A dios

Por darme lo más hermoso de la vida y la oportunidad de estudiar una pequeña parte de ella pero la más digna del hombre libre.

C o n A d m i r a c i ó n , R e s p e t o y C a r i ñ o

A mis padres

Silvestre Pérez Cruz
Nicolasa Pérez Mendoza

Por haberme dado la vida, por su gran apoyo moral y económico que me brindaron durante el transcurso de mi carrera profesional; por la confianza que me depositaron en mi, por los valores que me han inculcado, por guiarme siempre por el camino de la superación y por todos sus sacrificios que han realizado que no han sido en vano ya que me han otorgado la mejor de las herencias.

Dios los guarde para siempre.

Mil gracias

A mis hermanos

* Gustavo
* Silvestre
Ruben

Quienes en todo momento han estado conmigo por la confianza, cariño y alentándome para seguir adelante y a quienes les deseo lo mejor de la vida.

* Gracias por el gran apoyo económico que me brindaron durante mi carrera profesional.

A mis abuelos con respeto y admiración

Serapio Pérez V. (+)
Petra Cruz J. (+)

Santiago Pérez (+)
Albina Mendoza

A mis cuñadas

* Alicia, Silvia y Toni

* Por los ánimos, consejos y la confianza que te he tenido

A mis tios (as)

Casimiro, Gonzalo, Eulalio, Eulogio, Eusebio, Josefina, Aurora, Cándida.

A mis primos (as)

Gabriela, *Angélica, Erica, Maribel, Maricela, Iiz, Juan, Pedro Luis, Juana, Isabel y Silvia

* Por ser una persona buena y a quien le he tenido mas confianza y a quien he querido como una hermana

A la familia Escamilla Jimenez con respeto y admiración

Sr. Valeriano Escamilla Pérez

Sra. Felipa Jimenez Hidalgo

Alejandra, Graciela, sonia, Noemi, Dolores, Lidia, Ofelia, Ma. Antonieta, Rogelio, Cesar y Valeriano.

A la familia camargo Pérez

Sr. Severiano camargo

Sra. Alfreda Pérez

Yemi, Graciela, Ruben, Rafael y Rene

A mis amigos

Edilberto, José Manuel, Francisco, Joaquín, Rigoberto, Salvador Machuca, Jose, Rigoberto, German, Eric, Pablo, Cesar, Arturo, Nachito, Oscar, Narcizo, Eliel, Jose Viveros, Jaime, Roberto, Ramón, Tobias, Cesar Cardoso, Angel, Royer, *Monica, Celia, Alicia Marin, Ma. Guadalupe, Ana Luisa, Rosa Alameda, Leticia, Esmeralda, Verónica, Toni, Subelda, Rosa, Luz Berta, Alicia, Abelina, Jose Luis, Ivan, Ana, Marquitos, Raymundo, Goyo, Noe, Chuma, Nacho, Moy, Tolu, Jose Luis y a todos quien en todo momento convivimos juntos durante este tiempo. Especialmente a todos los de la 2° y 1°sección de horticultura, tronco común y a mis compañeros de cuarto (Jose Manuel, Angel, Rogelio, Alejandro, Zesar e Ivan.

* por ser una persona tan maravillosa en el poco tiempo que te conocí y a la persona que mas admiré de las pocas que conocí.

A mis compañeros de siempre

Celia, Edilberto, Subelda, Jose Manuel, German, Eric y Francisco.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marco A. Bustamante Garcia

Por la asesoría, la confianza y revisión del presente trabajo que me brindo

Al Ing. M.C. Alberto Sandoval Rangel

Por la gran ayuda, confianza, sugerencias que me brindó durante la elaboración y revisión del presente trabajo y por ser como un amigo mas.

A la Ing. M.s. Leticia Bustamante Garcia

Por la revisión del presente trabajo

A la T.L.Q. Laura María Durón Ochoa

Por la gran ayuda que me brindo en los trabajos realizados en laboratorio y por su amistad.

A la Dra. Norma

Por las sugerencias y por su amistad que me brindó durante la realización del presente trabajo

A la Ing. Evangelina y esposo el Ing. Juventino pelcastre por su amistad y ser unas personas especiales

A todos mis amigos y compañeros que de una manera u otra contribuyeron a la realización del presente trabajo

A mi "Alma Terra Mater"

Por aceptarme en sus aulas y contribuir más en mis conocimientos agronómicos

A todos mis maestros

Por haberme preparado como un buen profesionista, en especial a los que me brindaron su confianza en todo momento (Ing. Alberto Sandoval, Ing. Juan Jose Galvan, Ing. Leobardo Bañuelos, Dr. Marco A. Bustamante, Dra. Norma, Ing. Alfredo. Ing. Morones. Dr. Navarro, Ing. Jose Luis, Dr. Eugenio Guerrero, Ing. Francisco Avalos, Ing. Gregorio Briones, Ing. Víctor Reyes y al Ing. Adolfo García.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
INDICE DE FIGURAS	
.....	xi
I.- INTRODUCCION	1
 II.- REVISION DE LITERATURA	
.....	5
2.1. Origen e historia del cultivo	5
2.2. Clasificación botánica	6
2.3. Descripción botánica	7
2.4. Condiciones edáficas	7
2.5. Condiciones climáticas	8
2.6. Producción de semilla-tuberculo	9
2.6.1. Producción de semilla-tuberculo básica	9
2.6.2. Producción de semilla-tuberculo registrada	10
2.6.3. Producción de semilla-tuberculo certificado	11
2.7. Obtención de plantas libres de virus	11
2.7.1. Termoterapia	12
2.7.2. Cultivo de meristemos	13
2.8. Producción de microplantas	14
2.8.1. Cultivo de explantes nodales	14
2.8.2. Apices de tallo	15
2.8.3. Estratificación <i>In vitro</i>	16
2.8.4. Cultivo de callo	16

2.8.5. Medios de cultivo	17
2.8.6. tuberización	23
2.9. Producción de microtuberculos <i>In vitro</i>	26
2.9.1. Importancia de los microtuberculos	27
2.9.2. Factores que afectan la tuberización <i>In vitro</i>	28
2.9.3. Experimentos realizados	36
III.- MATERIALES Y METODOS	39
3.1. Ubicación del lugar	39
3.2. Material vegetativo	39
3.3. Esterilización del medio e instrumento	39
3.4. Experimentos	40
3.4.1. Experimento uno	40
3.4.2. Experimento dos	41
3.6. Diseño experimental	41
3.7. Parámetros evaluados	43
IV.- RESULTADOS	45
V.- DISCUSION	60
VI.- CONCLUSIONES	63
VII.- LITERATURA CITADA	64
VIII.- APENDICE	71

INDICE DE FIGURAS

Fig.		pag.
1	Efecto del ABA sobre el numero de microtuberculos en medio sólido, evaluándose a los 45 días.	46
2	Efecto del ABA sobre el numero de microtuberculos en medio sólido y bajo condiciones de luz y oscuridad, evaluándose a los 75 días.	47
3	Efecto del ABA sobre el diámetro de microtuberculos en medio sólido, evaluándose a los 45 días.	49
4	Efecto del ABA sobre el diámetro de microtuberculos en medio sólido y bajo condiciones de luz y oscuridad, evaluándose a los 75 días.	50
5	Efecto del ABA sobre el peso de microtuberculos en medio sólido y bajo condiciones de luz y oscuridad, evaluándose a los 75 días.	51
6	Efecto del ABA sobre el numero de microtuberculos en medio líquido, evaluándose a los 45 días.	53
7	Efecto del ABA sobre el numero de microtuberculos en medio líquido y bajo condiciones de luz y oscuridad evaluándose a los 75 días.	54
8	Efecto del ABA sobre el diámetro de microtuberculos en medio líquido, evaluándose a los 45 días.	56
9	Efecto del ABA sobre el diámetro de microtuberculos en medio líquido y bajo condiciones de luz y oscuridad, evaluándose a los 75 días.	57
10	Efecto del ABA sobre el peso de microtuberculos en medio líquido y bajo condiciones de luz y oscuridad, evaluándose a los 75 días.	59

I. INTRODUCCION

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es considerada uno de los alimentos más importantes del mundo, ocupando el cuarto lugar, solo después del arroz, maíz y el trigo (SARH, 1994). El consumo de papa a nivel mundial representa uno de los más importantes entre las hortalizas, destacando algunas regiones como Europa, siendo los principales países productores: Rusia, Polonia, E.U., India, Ucrania y otros. Con una producción mundial de 302.50 millones de toneladas en 1997 (FAO, 1997).

En nuestro país esta hortaliza, tiene importancia debido a dos aspectos: 1) su valor nutritivo, 2) Ser una fuente generadora de empleos. La superficie sembrada en 1996 fue de 63,558 has. con una producción de 1,282.36 miles de ton. y un rendimiento promedio de 20.457 ton/ha., siendo los principales estados productores por orden de importancia: Sinaloa, México, Puebla, Guanajuato y Nuevo León (SAGAR, 1996).

El cultivo de la papa depende en gran medida del uso de semilla tubérculo de buena calidad, especialmente que esté libre de patógenos y en particular de virus.

La siembra de la papa se efectúa mediante el uso de tuberculo-semilla y la demanda potencial de categoría certificada es de 185,500 ton. Sin embargo,

únicamente se producen 28,000ton., cantidad que cubre el 15.5 % de la superficie cultivada (Villarreal, 1987). El tuberculo-semilla certificada es básicamente variedades mejoradas del país.

Una de los problemas que presenta la papa, es la asociación de enfermedades virosas, las cuales no solamente están relacionadas con las perdidas, sino por las grandes sumas de dinero destinados para su control, ya sea a través de plaguicidas para eliminar a sus insectos vectores, y también por la organización de servicios muy especiales para el mantenimiento de cultivares destinados a la producción de material vegetativo libre de virus para sus siembras (Fernández ,1976).

Debido a los problemas ocasionados por las enfermedades vírales ha sido necesario implementar mecanismos para erradicarlos o disminuirlos. Sin embargo, ya que la papa se multiplica asexualmente, el problema con las enfermedades virosas se ve acrecentado, sin mencionar la dificultad de contener o eliminar al patógeno presente en la semilla tubérculo.

Uno de los métodos que actualmente es efectivo para eliminar los virus en las plantas es el cultivo *In vitro* de meristemos apicales, los cuales por su condición indiferenciada se encuentran libres de virus.

En el caso de la micropropagación de la papa se ha utilizado en la obtención de plantulas *In vitro* de buena calidad y en un corto tiempo, para la producción de tubérculo semilla (Wright , 1983).

De acuerdo a los esquemas de producción de semilla certificada de papa, la semilla "BASICA" (anteriormente llamada semilla "NUCLEAR" u "ORIGINAL") son microplantas o microtubérculos producidos *In vitro*, los cuales se originan a partir de meristemas cultivados *In vitro*, los que por no estar conectados a los conductos vasculares de xilema y floema generalmente están libres de virus.

La semilla "BASICA 1" son los minitubérculos que se obtienen a partir de las microplantas o microtubérculos establecidos en invernadero, siendo estos últimos más fáciles de almacenar, transferir, y distribuir.

Varios investigadores han descrito técnicas para la propagación masiva de microtubérculos. (Estrada et. al. 1986; Chandra et. al. 1988; Akita and Takayama, 1988), sin embargo, estas utilizan fermentadores que son costosos, reportando resultados variables según la concentración de sacarosa y fitorreguladores que utilizan en el medio nutritivo.

En el laboratorio de biotecnología del departamento de horticultura, se han realizado trabajos de Investigación encaminados a producir semilla "BASICA" o microplantas de la variedad "ALPHA" (Bustamante and Peres, 1995); por lo que dado los resultados obtenidos y la experiencia adquirida.

El objetivo del presente trabajo es el de realizar estudios para producir microtuberculos de papa(Var. "Alpha") *In vitro*, para ser utilizados en un programa de multiplicación de semilla y en los sistemas de producción del cultivo da la papa.

Objetivos específicos.- Determinar el efecto del ABA, fotoperiodo y características físicas del medio nutritivo sobre la producción y calidad de microtuberculos.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 ORIGEN E HISTORIA DEL CULTIVO

Huaman et al. (1988) afirman que el centro de origen de la papa es de las tierras altas del sur de Perú, más precisamente en el área comprendida entre el Cuzco y los alrededores del Lago Titicaca; extendiéndose hacia, Bolivia, Chile y Argentina y por el Norte en Ecuador, Colombia, Venezuela, Centro América y México.

Hawkes (1978) señala que la papa fue introducida a Europa desde Sudamérica a fines del siglo XVI, por su parte, Mendoza y Estrada (1979) indican que el centro de origen de la papa cultivada es de los altiplanos de América del sur.

En México las culturas indígenas comenzaron a domesticar este cultivo 400 años A. C., donde junto con el maíz, se convirtió en la base de su alimentación (Rojas, 1976).

Hawkes (1978) menciona que el género *Solanum* tiene más de 2000 especies, de las cuales *Solanum tuberosum* L. de la serie tuberosa, son cultivadas.

Existen alrededor de 30 especies silvestres, entre ellas la serie poliploide de 24, 36, 48, 60 y 72 cromosomas, las cuales por su diversidad genética, constituyen un germoplasma sumamente valioso en el fitomejoramiento (Rojas, 1977; Romero, 1972).

El cultivo de esta solanacea esta ampliamente difundido y la cual se utiliza como producto alimenticio e industrial (Forsini, 1986).

2.2 CLASIFICACION BOTANICA

El nombre técnico de (*Solanum tuberosum* L.) fue usado por primera vez por el botánico suizo Gaspar Bahin en 1959 (Ramos, 1991). Teniendo actualmente la siguiente clasificación taxonómica:

Reino Plantae

Subreino Embryophyta

División Spermatophyta

Tipo Angiospermae

Clase Magnoliopsida

Subclase Gamopetala

Orden Tubiflora

Familia Solanaceae

Genero Solanum

Subgenero Pachystemon

Sección	Tuberarium
Subseccion	Hyperbasarthrum
Especie	tuberosum

Nombre científico: *Solanum tuberosum*

Nombre común: Papa o patata

2.3 DESCRIPCION BOTANICA

La papa es una planta herbácea, dicotiledonea y anual. Produce tallos aéreos y subterráneos; los primeros de 0.5 a 1 m de largo; presenta hojas pinaticompuestas en espiral en inflorescencia terminal en racimo con flores perfectas; el fruto es una balla redonda y pequeña de 1 a 3 cm de diámetro que contiene gran cantidad de semillas, las cuales solo se utilizan, en trabajos de mejoramiento. Los tallos subterráneos se desarrollan formando estolones que se transforman en tubérculos de forma ovoide o cilíndrica. En el tubérculo se encuentran yemas, los cuales son ramas no desarrolladas. La raíz es fibrosa y adventicia, típicas de las plantas propagadas asexualmente y nacen de los nudos de tallo a nivel del suelo (Thompson y Kelly, 1957; Edmon, 1989).

2.4 CONDICIONES EDAFICAS

El cultivo de papa puede ser establecido en una amplia variedad de suelos, pero se adapta mejor a suelos de textura migajon arenoso o migajon arcilloso, ricos en materia orgánica de estructura granular migajonosa y consistencia friable, es decir, fácilmente desmoronable. La reacción del suelo debe ser ligeramente ácida a neutro, con un mínimo de 2 % de materia orgánica, profundidad de suelo mayor de 60 cm y buen drenaje interno que facilite una buena aireación de las raíces. La resistencia del suelo a la penetración de raíces, a la emergencia de brotes y al crecimiento de los tubérculos debe ser baja; el contenido de carbonatos totales también debe ser baja y no deben existir problemas de sales, sodio, sustancias tóxicas ni parásitos o patógenos del cultivo (Narro, 1986).

2.5 CONDICIONES CLIMATICAS

El cultivo de la papa se desarrolla preferentemente en climas fríos y templados, sin exceso de humedad que obstaculice la maduración de los tubérculos. En general la temperatura óptima oscila entre los 7 y 18°C (SARH, 1994).

Se ha comprobado que el fotoperíodo y la temperatura afectan la formación del tubérculo; en días largos la formación de tubérculos ocurre si la temperatura nocturna es inferior a 20°C, siendo la óptima de 12°C (Yamaguchi, 1983).

La temperatura óptima del suelo para la emergencia es de 22°C; temperaturas altas retardan la emergencia. Se reporta que temperaturas de 16°C

por la noche y mayores de 18°C por el día arrojan los rendimientos mas altos y la cantidad de almidón más elevada; cabe mencionar que esta relación de temperaturas también depende del cultivar (Valadez, 1992).

2.6 PRODUCCION DE SEMILLA-TUBERCULO

La producción de semilla-tuberculo de calidad sanitaria, involucra todo un proceso que requiere la participación activa de un grupo técnico capaz de desarrollar con eficiencia cada una de las actividades a los que el cultivo sea sometido en cada una de las fases de desarrollo.

La selección y clasificación de las zonas aptas para la producción de semilla-tuberculo certificada, descarta aquellas que presenten problemas con nematodo dorado (*Globodera rostochiensis*), pudrición anular (*Corynebacterium sepodonicum*) y pudrición bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) (Ramírez, 1989).

2.6.1 PRODUCCION DE SEMILLA-TUBERCULO BASICA.

Se puede producir tuberculo-semilla básica por varios métodos, los cuales deben ser canalizados en cada país para utilizar la técnica adecuada.

Meléndez y Quevedo (1980) reportan que en un programa de producción de tuberculo-semilla de buena calidad, se trata de evitar la contaminación con

enfermedades, principalmente de virus, ya que son causantes de la pérdida gradual de la capacidad de producción. Es importante entonces, elevar la tasa de incremento rápido a fin de obtener a corto plazo material sano. Existen algunos métodos para la obtención de semilla tuberculo-basica como:

- Unidades tubérculos
- Índice de tubérculos
- Multiplicación por esqueje
- Producción el método clonal
- Selección masal por sitio
- Selección clonal o individual

Empleándose los cuatro primeros en programas bien establecidos cuando se cuenta con material sano. Los dos últimos deben ser utilizados en el caso de variedad o variedades producidas que se encuentren totalmente contaminadas por enfermedades virosas (Villareal, 1985; Ramírez, 1989).

2.6.2 PRODUCCION DE SEMILLA-TUBERCULO REGISTRADA

Esta categoría es producida en base a tuberculo-semilla de categoría básica, generalmente incrementada por el estado, pero también es posible que la produzcan los agricultores. En ambos casos deben ajustarse a las normas y reglamentos de producción de tuberculo-semilla establecidas (Christiansen, 1980).

2.6.3 PRODUCCION DE SEMILLA-TUBERCULO CERTIFICADO

La producción de esta categoría debe estar a cargo de agricultores semilleristas seleccionados. Se realiza en base a categoría registrada. En el proceso de producción de semilla-tuberculo certificado se debe tener un riguroso control fitosanitario, para controlar cualquier patógeno principalmente insectos vectores de virus (Christiansen, 1980).

2.7 OBTENCION DE PLANTAS LIBRES DE VIRUS

Muchos cultivos comerciales, que presentan propagación vegetativa, contienen virus que afectan su crecimiento y abaten su rendimiento. Por lo tanto, es necesario sanearlos antes de que se liberen comercialmente, ya que esto permitirá que sean propagados clonalmente (Merino, 1991). En muchas especies se ha logrado erradicar los agentes vírales por termoterapia y quimioterapia (Hollings, 1965); sin embargo, ciertos virus no se han podido erradicar del todo, por tanto la alternativa que actualmente se está usando es el cultivo de meristemas; ya sea solo o combinado con alguno de los métodos ya referidos (Merino, 1991).

2.7.1 TERMOTERAPIA

Esta técnica se fundamenta en que la síntesis de los virus en el interior de las plantas es un proceso continuo que se ve alterado por los cambios de temperatura, la cual, al ser alta conduce a la descomposición de la proteína viral, además que las plantas sometidas a la termoterapia, liberan sustancias fenólicas que interfieren en la síntesis de los agentes vírales (Villalobos, 1980).

Mellor y Stace-Smith (1977) eliminaron PVX y PVS por medio de termoterapia y cultivo de meristemos, además realizaron pruebas de diversos medios de cultivo, y mencionaron que los medios líquidos son más sobresalientes que los sólidos y que el tamaño del inoculo y el tipo de virus determina la liberación viral de la planta regenerada.

Mac Donald (1973) utilizó la termoterapia y el cultivo de meristemos para liberar plantas de papa de PVX y PVS. Asimismo mencionó que el fotoperíodo influye sobre el crecimiento de los cultivares de papa utilizados, así como el tipo de virus presente en los mismos.

Pennazio y Redolfi (1973) encontraron que los órganos de las plantas de tabaco infestadas con virus “X” de la papa responden en forma diferente a la termoterapia. Los virus pudieron eliminarse de las hojas, no así de la base del tallo ni de la raíz. Kassanis (1965), estima que para eliminar los virus se requieren de prolongadas exposiciones a temperaturas de 37°C de las plantas infestadas. Por

su parte Lozoya (1985) reportaron que al aplicar una temperatura de 35°C durante 3 semanas en el cultivar Alpha, se logro obtener 2 de 6 plantas libres de virus.

2.7.2 CULTIVO DE MERISTEMOS.

Según López y Zavala (1988) algunos virus resisten la termoterapia, por lo que se hace indispensable un método alternativo para la limpieza de materiales de propagación de papa. El cultivo de meristemos es la alternativa que mejores resultados han brindado y consiste en cultivar *In vitro* esta parte de la planta con medios y condiciones adecuadas. El principio fundamental de esta técnica se basa en la incapacidad del virus de replicarse a la misma velocidad de multiplicación celular de la planta.

Walkey (1978) menciona que la utilización extensiva del cultivo de meristemos para la producción de plantas libres de virus ha resultado ser la línea económicamente más importante de todas las que incluye el cultivo de tejidos vegetales.

El uso del cultivo de meristemos complementado con la termoterapia y la quimioterapia, ha sido por muchos años un importante componente en los programas de semilla de papa (Dodds, 1988). Las técnicas de producción de plantas libres de patógenos no solo son realizadas con el fin de incrementar los rendimientos, sino también para facilitar el intercambio de germoplasma para la eliminación de infecciones vírales (Hewitt y Chiarappa, 1977).

El cultivo de meristemas ha sido utilizado simultáneamente con la termoterapia lo que brinda un gran margen de seguridad en la obtención de plantas sanas (Wareh et al, 1989).

2.8 PRODUCCION DE MICROPLANTAS

Muchos programas de semilla de papa usan como material inicial, plántulas *in vitro* libre de patógenos. Las etapas iniciales de tales programas pueden hacer uso de diversas técnicas de micropropagación dependiendo del tamaño y localización del programa. Sin embargo los métodos básicos son muy similares en la mayoría de las instituciones dedicadas a ello, y se basan en un desarrollo rápido en los medios de cultivo líquidos o sólidos, de nudos individuales o tallos con múltiples nudos (Dodds, 1988).

2.8.1 CULTIVO DE EXPLANTES NODALES

El cultivo de segmentos nodales es ampliamente usado para una rápida multiplicación de tallos *In vitro*. Los explantes pueden ser obtenidos de tallos derivados *In vitro*, plantas desarrolladas en invernaderos o por brotes de los tubérculos. Algunos de los investigadores que han empleado esta técnica de multiplicación en el cultivo de la papa son Hussey y Stacey (1981), Westcott et al., (1979), Austin y Cassells (1983) y Bustamante y Pérez, (1995).

La técnica mas ampliamente usada es la eliminación de las hojas de plántulas *In vitro*. La remoción de las hojas provee de un crecimiento uniforme de nuevos tallos. Si las hojas son dejadas en los nudos se cree que las hormonas de la hoja senescente pueden inhibir el crecimiento de los nuevos tallos. Teniendo además las siguientes ventajas:

- 1.- El método es generalmente más simple que otros métodos de propagación.
- 2.- El rango de propagaciones es relativamente rápido.
- 3.- La estabilidad genética es usualmente preservada.

4.- El crecimiento de las plantas resultantes es muy bueno, debido al rejuvenecimiento y/o a las mínimas infecciones.

2.8.2 APICES DE TALLO

Li (1985) considera el cultivo de ápices de tallo, como una porción de tallo mas allá de la región ò zona meristemática subápical, los explantes son mayores ò iguales a 1 mm de longitud.

Roca, et al (1978) aceleró una rápida proliferación de yemas a partir de cortes de ápices de tallo mediante el cultivo de agitación, observándose desarrollo tanto de yemas axilares como de yemas adventicias a partir de los explantes y formación de una masa multimeristemática.

2.8.3 ESTRATIFICACION IN VITRO

Li (1985) menciona que por medio de la estratificación y subcultivos continuos de un tallo individual, se pueden producir aproximadamente 2.5^{17} plántulas en un año. De esta manera se producen anualmente grandes cantidades de brotes enraizados de varios cultivares para ser utilizados como parte del proceso de la reproducción de papa libre de virus.

2.8.4 CULTIVO DE CALLO

Merino (1994) describe que se puede definir el callo como un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una desdiferenciación celular, presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido.

Loyola (1985) menciona que la propagación masiva de plantas requiere de la proliferación del inoculo del cultivo, de manera que se pueden estimular muchos centros de regeneración de plantas de un solo tejido u órgano. Otra opción puede ser propiciar la proliferación de células en forma desorganizada para dar origen a un callo en crecimiento activo, del cual se pueden transplantar después pequeñas porciones para que continúe la proliferación en medios sólidos o líquidos.

2.8.5 MEDIOS DE CULTIVO

Merino (1991) reporta que los medios generalmente están constituidos por los siguientes componentes:

1.- Sales inorgánicas.

Estos se dividen en macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, y S) y microelementos (B, Co, Cu, Mn, I, Fe, y Zn), ambos son los iones que las plantas requieren para efectuar en forma eficiente sus procesos metabólicos (Gamborg, et al. 1983; López, 1985). En recientes años los quelatos NaFeEDTA (25 – 38 mg/l) han sido usados como una fuente de hierro (Pierik, 1989).

2.- Vitaminas

Son sustancias catalizadores en el metabolismo de la planta; las vitaminas mas usadas son la tiamina (de 0.1 a 0.5 mg/l) casi siempre es esencial y el ácido nicotínico (0.5 mg/l) y la piridoxina (0.5 mg/l), que son requeridos para ciertos tejidos vegetales, de ordinario se añaden. En muchos cultivos resulta beneficioso el inositol, a razón de 100 mg/l, y también se agrega en forma rutinaria. Entre otros materiales benéficos se encuentra el ácido pantoténico (0.1 mg/l) y la biotina (0.1 mg/l). Todos estos materiales son solubles en agua y se deben preparar como soluciones concentradas, listas para diluirse 100x en la solución final (Hartman y Kester, 1987).

3.- Carbohidratos.

En la mayoría de los cultivos se emplea sacarosa del 2 al 4%, pero en algunos casos se pueden usar concentraciones tan elevadas como del 12%, como en el caso de embriones jóvenes. En ocasiones se ha usado glucosa para monocotiledóneas. Ocasionalmente se ha empleado fructosa y aun almidón (Hartman y Kester, 1987).

4.- Materiales inertes de soporte

George (1993) menciona que el agar ha sido tradicionalmente usado como agente gelificante para el cultivo de tejidos, siendo muy empleado para la preparación de medios de cultivo semisolidos. Cuando se utilizan medios líquidos es muy frecuente utilizar papel filtro estéril como soporte del explante (Merino, 1991).

5.- Reguladores de crecimiento.

Las dos clases de hormonas más importantes son las auxinas y de las citokininas, que controlan la formación de la raíz, del tallo y el callo (Hartman y Kester, 1987). Las auxinas más usadas son: ácido 3 – indolacético (AIA), ácido 3 – indolbutírico (AIB) y el ácido 2, 4 – Diclorofenoxiacético (2, 4 – D). Las citocininas

incluyen N⁶ Bencilamino-purina (BA), kinetina y N⁶ furfuril aminopurina (cinetina) (Hurtado, 1987).

Los reguladores de crecimiento o fitohormonas se subdividen en auxinas, citocininas y giberelinas principalmente, sin embargo tenemos a otros reguladores muy poco usados como el ácido abscisico (Villalobos, 1979; López, 1985; Merino, 1994).

6.- Inhibidores de crecimiento

El grupo mas variado de los reguladores lo constituyen los inhibidores, que son fitorreguladores capaces de disminuir algún aspecto del desarrollo, ya sea de manera independiente o contrarrestando la acción de una hormona (Rojas, 1979).

Los inhibidores pueden ser naturales o sintéticos. Los primeros son sustancias orgánicas aromáticas, tales como compuestos fenólicos y ácidos benzoicos o sus derivados como el ácido abscisico y la cumarina. Los inhibidores sintéticos son compuestos importantes en la agricultura ya que se utilizan para controlar algunos procesos fisiológicos como el crecimiento vegetativo, la floración y el envejecimiento (Weaver, 1976)

En muchos sistemas, el ABA contrarresta los efectos de las hormonas promotoras (auxinas, giberelinas y citocininas). Parece lógico que en un sistema

de crecimiento deba haber algún freno. Aparentemente él ABA interactúa con diferentes hormonas promotoras del crecimiento en distintos sistemas vegetales. Una de las hipótesis lógicas es que cada una de esas interacciones se debe a alguna hormona maestra promotora y que él ABA actúa como hormona de freno (Weaver, 1976).

Esta hormona inhibitoria, muy difundida en el reino vegetal, interactúa con los promotores del crecimiento, por lo que tiene efectos importantes en los fenómenos del crecimiento (Weaver, 1976).

El descubrimiento de que durante los días cortos aumenta la cantidad de ABA en las hojas, ha despertado gran interés por los efectos del ABA en la floración. Las giberelinas realzan la iniciación floral en algunas plantas de día largo cultivadas durante un fotoperiodo no inductivo; sin embargo, se ha demostrado que él ABA contrarresta esos efectos. Una de las hipótesis es que él ABA actúa como inhibidor de la floración en hojas de plantas de día largo que crecen durante días cortos.

El ABA puede inducir también la floración en algunas plantas de día corto que crecen bajo condiciones no inductivas. Algunos de esos efectos pueden explicarse en base al retraso del crecimiento que hace disminuir la competencia de las partes vegetativas, de modo que se produce una mayor inducción floral (Weaver, 1976). El crecimiento y otras respuestas de la planta, pueden ser resultado de una interacción o un balance entre el ABA y los productos que

promovieron el crecimiento (Addicott y Lyon, 1969). Es posible que el efecto inhibitorio del ABA en el crecimiento, se deba a su inhibición de las enzimas hidrolíticas, que son esenciales al metabolismo vegetal. La acción del ABA puede deberse a la inhibición de la síntesis de las moléculas enzimáticas específicas de RNA o a la prevención de su incorporación a una unidad activa de síntesis enzimática.

Según Quatrano (1987) el ABA endógeno está muy ligado al inicio de la ruta normal de maduración y a la inhibición de la germinación precoz (viviparidad).

Milborrow (1984) concluyó que el ABA exógeno provoca abscisión pero de modo mucho menos eficaz que el etileno exógeno.

Osborne (1989) examinó los efectos del etileno y el ABA sobre la abscisión y concluyó que es probable que el ABA no tenga un cometido directo en la abscisión; más bien, actúa de manera indirecta causando senescencia prematura de células en el órgano que se desprende, lo que a su vez provoca un aumento en la producción de etileno. Según Osborne, es claro que el etileno, no el ABA, es el iniciador del proceso real de la abscisión.

El ABA inhibe el crecimiento de muchas plantas y partes vegetales, según se ha demostrado en coleóptilos, plántulas, discos de hojas, secciones de raíces, hipocótilos y radículas (Addicott y Lyon, 1969). También se ha demostrado que frecuentemente produce una inhibición del crecimiento de los brotes y las hojas;

sin embargo, se requieren con frecuencia varios tratamientos de ABA, debido a que sus efectos perduran tan solo un periodo breve. La aplicación de ABA provoca reposo también en las yemas de ciertas especies, incluyendo algunos frutales de hoja caduca, cítricos y papas.

El ABA parece actuar como inductor general del envejecimiento, a menudo, el tratamiento de ABA induce efectos de senescencia en las plantas. Al aplicar ABA al follaje se producen cambios de color en las hojas, similares a los que ocurren durante la senescencia (Smith y sus Colaboradores, 1968). El ABA ha estimulado la pérdida de clorofila en discos aislados de la mayoría de las especies examinadas (Addicott y Lyon, 1969; El – Antably y sus Colaboradores, 1967). Los tubérculos de papas tratados con ABA se forman blandos y senescentes (El – Antably y Colaboradores, 1967).

En plantas de *Solanum tuberosum* cultivar White Rose, en días largos se tienen la formación de tubérculos, rociando las plantas o las puntas de los estolones con ABA. En segmentos de tallos y estolones cultivados si se tiene la formación de tubérculos tratándolos con ABA, siempre y cuando tengan las condiciones óptimas para su desarrollo (Báez, 1983).

Larsen (1969) asperjo seis variedades de arboles frutales con el compuesto, en concentraciones de 0, 500, 1000 y 2000 ppm y encontró que cuanto más elevada fue la concentración de ABA tanto más completa resultó la defoliación.

Cooper y Henry (1968) observaron en cinco variedades de cítricos, que las concentraciones fuertes de ABA, aplicadas durante el verano, provocaban defoliación. Las aplicaciones invernales no la provocaron pero causaban cierta coloración en los frutos.

2.8.6 TUBERIZACIÓN

Durante el ciclo vegetativo, la formación y crecimiento de tubérculos, y los cambios metabólicos que se producen, dependen en gran medida de la temperatura y duración del día por su incidencia en el balance de las fitohormonas endógenas (Clegg y Rappaport, 1970).

Durante el reposo vegetativo, la actividad metabólica se reduce al mínimo y el balance hormonal endógeno se encuentra a favor de los inhibidores del crecimiento. Las variaciones de temperatura e iluminación favorecen los cambios en el equilibrio hormonal que conducen a la emergencia y desarrollo de nuevas plantas. Durante este tiempo, las condiciones fotoperiódicas favorecen la producción de hormonas promotoras, que estimulan el crecimiento y desarrollo de estas nuevas plantas que finalmente producen tubérculos.

Ewing (1981) indica que el estrés de temperatura pueden tener efectos adversos sobre el rendimiento, debido a efectos de interrelación de enzimas, hormonas y posiblemente de membrana, desplazando el balance metabólico hacia una menor cantidad de fotosintatos disponibles para el crecimiento o por la

disminución de la partición de fotosintatos hacia el tubérculo, provocada por el crecimiento desproporcionado de la parte aérea con relación al tubérculo.

Van der Zaag y Horton (1983) dicen que las altas temperaturas pueden afectar la producción de tubérculos por cambios en la partición de asimilatos entre las partes de la planta, a través de la reducción de la fotosíntesis y aumento de la respiración.

Torres (1985) señala que el comienzo de la tuberización de la punta del estolón coincide con los periodos de temperaturas más bajas y días más cortos, así como por altas concentraciones de hormonas inhibitorias, especialmente ácido abscísico.

En el cultivo de la papa se discutió ampliamente el papel de estos compuestos en la tuberización y se demostró que el inicio de la misma esta estrechamente vinculada con sustancias de naturaleza hormonal. A partir de este criterio se ha tratado de decidir cual de las hormonas es la que está relacionada mas directamente con el proceso, y aunque existen numerosas evidencias experimentales que señalan el ácido abscisico como hormona iniciadora, es importante considerar que la acción de las fitohormonas se ejerce a través de un equilibrio endógeno que garantiza que se lleve a cabo el proceso.

Okazawa y Chapman (1962) consideran que la iniciación del tubérculo es inducida por una hormona especifica, posiblemente producida bajo condiciones de

noches largas. Así mismo, afirman que una condición de noches cortas inhibe la formación del tubérculo, no así la elongación del estolón.

Krauss (1978) afirma que la nutrición con nitrógeno de las plantas de papa puede influir en la síntesis y la translocación de ácido abscísico y citocininas. Por lo tanto, ellos aducen que el efecto inhibitorio del nitrógeno en la tuberización puede estar relacionado con el control del nitrógeno por medio de los reguladores endógenos en el proceso de la tuberización.

Algunos datos recientes muestran claramente que la iniciación del tubérculo ocurre en las primeras etapas de desarrollo de la planta, aproximadamente 3 – 4 semanas antes de que haya una cubierta foliar completa (Allen y Scott, 1980).

Garner y Allard (1923) afirman que la transición de un tallo normalmente vegetativo a un órgano marcadamente adaptado para el almacenamiento está en respuesta de un fotoperíodo definido; así mismo, indicaron la importante asociación de la temperatura, relacionándola con la respiración e indirectamente con la disponibilidad de almacenar carbohidratos. Werner (1934), asocia la inducción del tubérculo con los niveles de carbohidratos de la planta.

Aparentemente debe existir un nivel adecuado entre los carbohidratos de la planta para que se formen los tubérculos. Así mismo, este nivel debe ser mayor que el requerido para la elongación vegetativa (Lawrence y Barker, 1963). Bajo un

estudio superficial, parece que un adecuado suministro de carbohidratos puede disparar la formación del tubérculo (Gregory, 1956).

Según Slater (1963) la tuberización resulta de una acumulación de substratos en los ápices estoloníferos; sin embargo, Madec (1963) considera la intervención de una sustancia específica formadora del tubérculo. También indica que, probablemente, el desarrollo del tubérculo es iniciado por un complejo de factores, cualquiera de los cuales puede convertirse en limitante en una serie de circunstancias en particular. En general, hay un balance entre el crecimiento de los tubérculos y el del resto de la planta y cualquier cosa que favorezca el desarrollo de uno, retardará el desarrollo del otro.

2.9 PRODUCCION DE MICROTUBERCULOS

GENERALIDADES

Para trasplantar plántulas provenientes de condiciones *In vitro* a un medio ambiente externo es muy laborioso y necesita procedimientos cuidadosos. Por otro lado, los tubérculos latentes cosechados de condiciones *In vitro*, almacenados y plantados, es un procedimiento sencillo sin las extenuantes precauciones. Con una inducción apropiada, cada axila de los vástagos desarrollados *In vitro* es capaz de producir un microtuberculo. Los tubérculos producidos *In vitro* pueden ser sesiles (en los nudos del tallo del explante) o axilares (terminalmente formado en nuevos vástagos en desarrollo). Excepto por el diminuto tamaño (usualmente 1 cm o menos) los microtuberculos producidos *In vitro* son morfológicamente

idénticos a aquellos producidos *In-situ*. Los explantes usados en la producción de microtubérculos pueden ser cortes nodales, estolones cortados, cortes de vástagos *In vitro* o vástagos enraizados *In vitro*. Esto ha hecho de la producción de microtubérculos un método masal de propagación *In vitro* de las plantas libres de virus (Wang y Hu, 1980).

Los métodos para la tuberización *In vitro* para la papa fue primeramente descrita por Lin et al., (1978) y Hussey y Stacey (1981). En el CIP, este procedimiento fue adoptado por Schilde (Anónimo, 1982) para almacenar germoplasma para su distribución internacional. Siendo reportada en forma comercial por Wattimena (1983).

2.9.1 IMPORTANCIA DE LOS MICROTUBERCULOS

Los microtubérculos de papa producidos *In vitro* pueden ser usados como una fuente de germoplasma para su conservación, transportación entre países, y esquemas de certificación de semilla (Slimmon et al., 1989). La respuesta de tuberización bajo condiciones *In vitro* es también un prerrequisito para estudios sobre fisiología y biología molecular de la iniciación y volumen del tubérculo (Bourque et al., 1987; Hussey y Stacey, 1984). Los microtubérculos más grandes aguantan condiciones adversas de plantación y producen más vigorosas Plántulas en las generaciones sucesivas que los microtubérculos mas chicos (Wiersema et al., 1987). Algunos autores han demostrado que el tamaño de microtubérculos producidos entre 2 a 3 meses depende en las condiciones del medio, temperatura

y fotoperíodo. Bajo altas concentraciones de citokininas, las cuales son comúnmente usadas en el medio de tuberización, la luz difusa y fotoperíodos más largos dan los tubérculos más grandes (Abbot y Belcher, 1986; Hussey y Stacey, 1981).

2.9.2 FACTORES QUE AFECTAN LA TUBERIZACION IN VITRO

Los factores que afectan la tuberización de papas fueron extensamente revisadas por Wattimena (1983).

La tuberización *In situ* en la papa puede ser inducida por días cortos, alta intensidad de luz, bajas temperaturas de noche, bajo nivel de nitrógeno, usando tubérculos fisiológicamente viejos, y la aplicación de ABA y Cycocel (β - cloroetiltrimetilamonio cloruro). Inesperadamente, las condiciones de tuberización *In vitro*, determinada a través de numerosos experimentos, frecuentemente no coinciden con las condiciones *In situ*. Es evidente que las reacciones fisiológicas de las plántulas *In vitro* difieren considerablemente de las plantas *In situ*. Estas diferencias son probablemente debido a variaciones en el medio fundamental, uso del cultivo, tipo de tejidos de explantes, reguladores de crecimiento, y el medio ambiente de incubación.

a).Temperatura.

La temperatura optima para la tuberización *In vitro* determinada por Wang y Hu (1982) fue 20°C con una temperatura constante, siendo más efectivo que temperaturas alternantes de día y noche. Temperaturas sobre 28°C son inhibitorias. De acuerdo a Hussey y Stacey (1981), el rango de temperatura optima fue 20 – 25°C con una ligera y más rápida tuberización a 20°C. La temperatura optima determinada por Wattimena (1983) no obstante fue 15°C. Dos posibles razones para esta temperatura optima baja son como siguen:

- 1.- citokinina no fue usada, así, sin citokinina, la baja temperatura llega a ser el requerido agente inductor de tubérculos.
- 2.- La más alta intensidad de luz que usaron puede haber resultado en una temperatura actual más alta dentro de los vasos del cultivo.

Okazawa (1967) encontró que a temperaturas bajo 12°C fueron fuertemente inhibidos, sin embargo, Thieme y Pett (1982) obtuvieron sus tubérculos *In vitro* de 8 a 10°C, y Wattimena (1983) detecto solamente una reducción ligera en la formación de tubérculos a 10°C, comparada a la temperatura optima de 15°C. La mayoría de los trabajadores escogieron 20°C (Sattelmacher y Marschner, 1978; Mares et al., 1981) o 25°C (Stallknecht y Farnsworth, 1982b; Mingo-Castel et al., 1974, 1976) para sus estudios de tuberización *In vitro*.

b). Fotoperíodo.

Los requerimientos para tuberización *In vitro* variaron entre diferentes reportes. Algunos usaron luz continua otros luz alternante, otros alternando luz y oscuridad con oscuridad continua. Lawrence y Baker (1963) encontraron que sus cultivos de tubérculos producirían solo bajo oscuridad continua o continua oscuridad interrumpida con una intensidad baja de luz. No se produjeron tubérculos bajo un fotoperíodo de 8-, 16-, o 24-h.

Schilde (Anónimo, 1982) encontró que la producción de microtubérculos fue más rápida cuando las plántulas fueron inducidas a tuberizar en la oscuridad que en un fotoperíodo de 8-h. Stallknecht y Farnsworth (1982) también hicieron su trabajo bajo la oscuridad. Wang y Hu (1982) encontraron un fotoperíodo de 8-h. fue mejor que uno de 16-h., pero oscuridad continua o luz continua no fueron probadas. Thieme y Pett (1982) observaron tuberización *In vitro* cuando el fotoperíodo fue menor de 12 h. Sattelmacher y Marschner (1978) y Mares et al. (1981) seleccionaron un fotoperíodo de 12-h para llevar a cabo su tuberización.

Hussey y Stacey (1981) observaron que los microtubérculos fueron formados en cultivos incubados con fotoperíodos de 16 y 24 h., pero no en fotoperíodo de 8 h. Wattimena (1983) usó 0, 8, o 24 h de luz por día y concluyeron que entre mas largo el fotoperíodo, mas mejor la tuberización.

Una intensidad de 800 lux fue usada por Hussey y Stacey (1981). Una ligeramente más baja intensidad fue usada por Wattimena (1983). Wang y Hu (1982) usó una muy baja intensidad

de 100 lux y encontró que 35.4 microtubérculos fueron producidos en cada cultivo a esta intensidad, comparado con 27.3 y 13 microtuberculos a 1 y 4 kilolux, respectivamente.

Las discrepancias anteriores pueden haber resultado parcialmente de que citokinina fue usado en el medio de cultivo por varios trabajadores. Parece ser que un largo fotoperíodo con alta intensidad de luz es requerido cuando citokinina no es usado. La razón para tal requerimiento de luz es oscuro.

c). Sacarosa.

Una alta intensidad luminica favorece la tuberización en el campo. Tal intensidad luminica no puede ser usado en cuartos de incubación, porque el exceso de calor intensificaría el calor en los frascos de cultivo. El carbohidrato necesario para la tuberizacion es proporcionado con la adición de sacarosa al medio.

La concentración en el medio de tuberización, por lo tanto debe ser más alta que en el medio usado para propósitos generales. Wang y Hu (1982) encontraron que un 8% de sacarosa fue optimo para la tuberización *In vitro* de vástagos enraizados *In vitro*. Wattimena (1983) no encontró diferencias significativas entre 4,6 y 8% de sacarosa para la producción de microtuberculos de cortes de vástagos *In vitro*, pero en promedio un 6% de sacarosa produjo más microtuberculos que 4 y 8%.

La diferencia entre estos dos grupos fue debida probablemente a mayor fotosíntesis llevada a cabo por las plantulas del ultimo grupo. Para el cual fueron usados un fotoperíodo más largo y una mayor intensidad luminica. Otros trabajos encontraron que la concentración optima de sacarosa fue entre 6 y 8%.

En general al incrementar la concentración de sacarosa de 1 a 8% se incrementó el porcentaje y la precocidad de tuberización. A niveles de sacarosa mayores de 10%, la tuberización fue inhibida excepto cuando neutralizó el efecto inhibidor del nitrógeno alto.

d). Promotores de crecimiento

1. Citokinina. La tuberización *In vitro* siempre resulto cuando fue usado citokinina exógena. Wang y Hu (1982) encontró que 10 mg/l BA indujeron el numero mas alto de microtubérculos de tallos enraizados *In vitro* con un rango de 0.01 a 30.0 mg/l. Por usar estolones apicales, una mas baja dosis optima de BA (2.5 mg/l) por la inducción de microtubérculos fue reportado por Mauk y Langille (1978). La optima dosis fue cerca de 3 mg/l cuando ZEA fue usado (Palmer y Smith, 1969; Mauk y Langille, 1978).

Wattimena (1983) encontró que citokinina (KIN) fue requerido solamente si la tuberización ocurrió en la ausencia de luz. La concentración optima de (KIN) para tuberización oscura fue de 45 μM . Un requerimiento de citokinina para tuberización *In vitro* bajo oscuridad continua han sido reconocidas por otros estudios de trabajadores (Palmer y Smith, 1970; Palmer y Barker, 1973; Tizio y Biain, 1973; Mingo-Castel et al., 1976). En la ausencia de exógenos reguladores de crecimiento, fotoperiodos de 16- y 24-h han sido reportados que resulta en un más alto porcentaje de tuberización *In vitro* (Hussey y Stacey, 1981).

2. Auxinas. Las auxinas y giberelinas no son esenciales para la tuberización *In vitro*. Las respuestas a IAA, 2,4-D, y NAA/I en la tuberización *In vitro* dependen de la concentración usada. A más bajas concentraciones (<1 mg/l), una inducción es observada (Harmey et al., 1966; Okazawa, 1967; Tizio y Biain, 1973; Stallknecht y Farnsworth, 1982). A más altas concentraciones, las auxinas fueron menos efectivos y aun inhibitorias (Stallknecht y Farnsworth, 1982a).

3. Giberelinas. GA promueve el crecimiento vegetativo y tienen efecto inhibitorio en tuberización *In vitro* cuando esta en bajas

concentraciones (Palmer y Smith, 1970). En concentraciones de 2.5 mg/l eliminaron completamente la tuberización *In vitro* inducido por cumarina (Stallknecht y Farnsworth, 1982).

e). Inhibidores de crecimiento.

Los componentes que inhiben el crecimiento vegetativo frecuentemente estimulan la tuberización. Así, muchas clases de retardantes e inhibidores de crecimiento han sido usados para estudios de tuberización *In vitro*. Estos componentes incluyen ABA, CCC, MH, Alar, Amo-1618, y cumarina.

1. Cumarina. La cumarina, como citokinina, estimula prontamente la tuberización *In vitro* en tallos, teniendo una concentración optima de 25 mg/l. Fue encontrado que la tuberización inducida por cumarina fue más rápida que aquella inducida por KIN (Stallknecht y Farnsworth, 1979, 1982). La inducción de tuberización por cumarina requirió bajo nitrógeno ambos en el medio de explantes y en el medio de tuberización. GA y altas concentraciones de nitrógeno en el medio inhibió la toma de cumarina [3-¹⁴c] por lo tallos axilares y así inhibió la inducción de

tuberización por cumarina. Inhibidores de proteína y ácidos nucleicos inhibieron significativamente la tuberización inducida por cumarina (Stallknecht y Farnsworth, 1982), mientras ellos solamente retardaron la tuberización inducida por KIN (Palmer y Smith, 1969). El modo de inducción de tubérculo por cumarina, entonces, es diferente de aquel inducido KIN.

2.ABA y otros inhibidores de crecimiento. Aplicaciones de ABA en plantas de papa intactas y puntas de estolón han sido reportados para estimular tuberización (Wattimena, 1983). Conversamente, datos por Palmer y Smith (1969) y Stallknecht y Farnsworth (1982), indicaron que ABA no estimulo en tubérculos *In vitro* la iniciación de estolones o germinaciones y este inhibió tanto la tuberización inducida por KIN y por cumarina. Cycocel (CCC), ácido Triiodobenzoico (TIBA) y hidrazido maleico (MH) fueron encontrados que induce tuberización *In vitro* (Tizio y Biain, 1973; Parrot, 1975). Por otro lado, Palmer y Smith (1969) reportaron que CCC y Amo-1618 tuvieron el mismo efecto reversible sobre la tuberización inducida por KIN como por ABA. Stallknecht y Farnsworth (1982) encontraron que CCC, TIBA y ácido succinico-2,2-dimetil hidrazido (Alar) no afecto la tuberización inducida por cumarina.

f). Otros factores.

i. Dióxido de carbono. Mingo – Castel et al. (1974, 1976) encontraron que exponiendo los cultivos por 3 a 5 días a 8 – 10% de CO₂ pueden inducir tuberización en estolones cultivados *In vitro*. También encontraron que la ausencia total de CO₂ es detrimental para la tuberización *In vitro*.

ii. Etileno. Experimentos llevados a cabo por García – Torres y Gómez – Campo (1973) y Stallknecht y Farnsworth (1982) mostraron que el etileno presentó un bajo grado de estímulo a tuberización.

Sin embargo otros trabajos mostraron que el etileno no solo no fue efectivo al inducir formación de microtuberculos sino también tuvo un efecto inhibitorio al efecto inductor de KIN y CO₂.

2.9.3 OTROS EXPERIMENTOS REALIZADOS

Los microtubérculos producidos *In vitro* en papa obtenidos por Slimmon et al., (1989) fue investigado usando un medio consistiendo de sales Murashige y Skoog, vitaminas, niveles altos de sacarosa y purina de benzylamino, cultivados a 16°C con un fotoperíodo de 8 hrs. y oscuridad

total, con los cultivares Red pontiac, Shepody, Kennebec y Yukon gold; reportando que los microtubérculos de todos los cultivares tuvieron un peso fresco mayor cuando fueron tratados con 8 hrs de día /luz comparados con oscuridad total. Los microtubérculos variaron en diámetro de 0.48 a 0.60 cm en el tratamiento de total oscuridad y de 0.58 a 0.75 cm en el tratamiento de 8 hrs día/luz.

Los nudos de hoja puestos en el tratamiento de “ total oscuridad “ , mostraron senescencia en la forma de amarillarse a las 4 semanas, con necrosis total a las 8 ó 10 semanas. Sin embargo, con el tratamiento de 8 hrs luz, las hojas permanecieron verdes por un periodo inicial mayor y gradualmente amarillandose y la necrosis a las 12 semanas. Una alta incidencia de enraíce ocurrió con los nudos de la hoja en el tratamiento de 8 hrs luz, pero en el tratamiento de “ total oscuridad “ solamente algunos pocos nudos de hojas mostraron algún desarrollo de raíz. La pigmentación verde fue observada con todos los microtuberculos formados bajo el tratamiento 8 hrs luz. Esto no fue evidente con el tratamiento “ oscuridad total “. La retardada senescencia de la hoja, el enverdecimiento del microtuberculo y el desarrollo de raíces podría ser indicativo de actividad fotosintética y síntesis de auxinas en las hojas.

Nowak y Asiedu (1992) examinaron los efectos de gelrite y de agar sobre la tuberización *In vitro* de 6 cultivares de papa (Atlantic, Chaleur, Cherokee, Desiree, Kennebec y Red pontiac). El medio consistió de sales MS, vitaminas, sacarosa, kinetina y gelrite o agar. Los cultivos fueron mantenidos ya sea bajo luz difusa, con un fotoperíodo de 16 hrs, o en la oscuridad a 22/19°C de temperatura diurna/nocturna por 8 semanas. Los resultados indicaron que la tuberización fue mas uniforme sobre gerlite que en agar en medio solidificado. La exposición de la luz fue benéfica solo en tres de los seis cultivares; un mas alto numero y peso de los tubérculos más grandes de 5 mm fueron registrados.

Delgado y páez de cásaes (1992) emplearon dos pasos para producir microtuberculos *In vitro* de papa. El primer paso fue la fase de multiplicación, utilizando segmentos de tallo con cuatro yemas. Ellos fueron implantados en medio liquido contando con los componentes básicos (MS) sales, varios compuestos orgánicos y reguladores de crecimiento (cinetina y ácido giberelico). Una vez que las yemas fueron brotadas el material fue pasado a un paso de inducción. Ese medio contenía las sales (MS), varios compuestos orgánicos y combinaciones de reguladores de crecimiento; 6-benzylaminopurina (BAP) y clorohidratoclorino de cloro (CCC). El material vegetativo en ambos pasos fue agitado continuamente en un agitador a 80 rpm y encubado a 25 + 2°C, 50-80%

HR y 3000 lux por 16 h (primer paso) y en oscuridad (paso de inducción) de 2 a 5 semanas, respectivamente. La tuberización en general fue aproximadamente buena entre el 80-100%. Fue observada una diferencia alta entre los tratamientos en el peso fresco de microtubérculos. Con esta metodología fue encontrada una mejor calidad en microtubérculos 7 semanas después de que los segmentos de tallo fueron implantados.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 UBICACIÓN DEL LUGAR.

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.

3.2 MATERIAL VEGETATIVO

El material vegetativo utilizado fueron plantulas de papa multiplicadas In vitro de la variedad comercial “alpha”, por lo cual no se llevo a cabo una previa desinfección del mismo.

3.3 ESTERILIZACION DEL MEDIO E INSTRUMENTO.

La esterilización del medio de cultivo se realizo en autoclave, durante un tiempo de 45 min., con una presión de 1.5 kg/cm². De la misma manera, los materiales de apoyo (pinzas, bisturí, papel filtro, cristalería, etc.) y el agua destilada se esterilizaron. Posteriormente, pudiéndose efectuar asépticamente la siembra en la campana de flujo laminar.

3.4 EXPERIMENTOS

Se realizaron dos experimentos, el primero se realizo en medio sólido y el segundo fue en medio liquido con fuente de papel filtro como se describe a continuación:

3.4.1 EXPERIMENTO UNO

Segmentos de tallo conteniendo una yema axilar y removida la hoja, fueron disectadas de plantulas cultivadas In vitro, los cuales fueron sembrados en un medio de inducción de tallos, que consistió de los componentes inorgánicos y orgánicos del medio MS + sacarosa (30g/l) + agar (8g/l), mismos que se desarrollaron bajo condiciones normales de cultivo (temperatura de 25°/18°c (día/noche) y con un fotoperiodo de 16 horas luz durante 30 días, teniendo 20 nudos por frasco gerber y estos con 30 ml del medio.

La inducción de microtuberculos en las microplantas producidas en esa primera fase, fue evaluada al agregarle a cada frasco gerber 5 ml de MS liquido; en donde se mantuvieron en condiciones de cultivo (temperatura de 19° constante) y con un fotoperiodo de 8 horas luz durante 45 días contándose con diez frascos (repeticiones) por tratamiento, siendo los siguientes:

- 1.- testigo sin reguladores + sacarosa 90g/l
- 2.- 0.1 mg/l de ABA + sacarosa 90g/l
- 3.- 0.2 mg/l de ABA + sacarosa 90g/l
- 4.- 0.4 mg/l de ABA + sacarosa 90g/l

5.- 0.8 mg/l de ABA + sacarosa 90g/l

Después de ese tiempo 5 frascos (repeticiones) se sometieron a oscuridad total y los otros 5 frascos (repeticiones) siguieron en las condiciones en las que ya estaban durante 30 días.

3.4.2 EXPERIMENTO DOS

En este experimento fue la misma metodología y en las mismas condiciones que el experimento uno, la diferencia de este experimento fue en el que se utilizó un medio líquido con puentes de papel filtro, se tuvieron 15 nudos por frasco, la hoja no fue removida y contándose con 8 frascos (repeticiones) por tratamiento, siendo los mismos tratamientos que el experimento uno.

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el experimento uno, en la primera evaluación (45 días) se utilizó un diseño completamente al azar, con sus respectivos tratamientos. Cuyo modelo fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Con:

$i = 1, 2, 3, 4, 5$ tratamientos

$j = 1, 2, 3, \dots, 10$ repeticiones

Donde:

Y_{ij} = Variable aleatoria observable de i-ésimo tratamiento y la
j-ésima repetición

μ = Media general

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

ϵ_{ij} = Error experimental

En la segunda evaluación (75 días) se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 5 x 2 en cinco repeticiones; donde el factor A son las concentraciones (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/l) y el factor B son las condiciones luz y oscuridad, cuyo modelo fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + C_j + CC_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Con:

$i = 1, 2, 3, 4, 5$ concentraciones

$j = 1, 2$ condiciones

$k = 1, 2, 3, 4, 5$ repeticiones

Donde :

Y_{ijk} = Variable aleatoria observable de la i-ésima concentración

μ = Media general

C_i = Efecto de la i-ésima concentración

c_j = Efecto de la j-ésima condición

cc_{ij} = Efecto de la interacción de la i-ésima concentración y la
j-ésima condición

ε_{ijk} = Error experimental

Además se utilizaron las pruebas de medias por el método de tukey, tanto en la primera como en la segunda evaluación.

Para el experimento dos se utilizó el mismo diseño y modelo estadístico, tanto en la primera como en la segunda evaluación, que el experimento uno, la diferencia de este es que se utilizaron 8 repeticiones. También se hizo uso de pruebas de medias por el método de tukey.

3.6 PARAMETROS EVALUADOS.

La primera evaluación se realizó a los 45 días y la segunda evaluación a los 75 días en los dos experimentos. Evaluándose los siguientes parámetros:

- 1.- No de microtuberculos por cultivo ó frasco
- 2.- Diámetro de microtuberculo
- 3.- Peso de microtuberculo

El parámetro tres solo fue para la segunda evaluación a los 75 días.

IV RESULTADOS

EXPERIMENTO 1 (MEDIO SOLIDO)

NUMERO DE MICROTUBERCULOS

En la evaluación a los 45 días (figura 1), se encontró diferencia significativa (Apéndice; tabla 1 y 1a) entre las concentraciones, siendo las dosis 0.2 y 0.4 mg/l de ABA en condiciones de luz, las que mostraron el mayor numero de microtuberculos con 14.2 y 13.1 respectivamente,

Así mismo, a los 75 días (figura 2), las dosis de 0.4 y 0.2 mg/l de ABA en condiciones de luz, fueron los que tuvieron mayor numero de microtuberculos con 23.2 y 23, respectivamente. De la misma forma, en condiciones de oscuridad las concentraciones de 0.4 y 0.2 mg/l de ABA, con 22.6 y 21.2 microtuberculos por cultivo, respectivamente, fueron las mejores.

En esta segunda evaluación no existió diferencia significativa (Apéndice; tabla 2 y 2a) en cuanto a las condiciones de fotoperiodo, aunque si la hubo en cuanto a concentraciones.

DIAMETRO DE MICROTUBERCULOS

En cuanto a esta variable, en la evaluación a los 45 días (figura 3), las concentraciones de 0.2 y 0.0 mg/l de ABA, en condiciones de luz, tuvieron el mayor diámetro con un promedio de 2.63 mm, pero no presentaron diferencia significativa (Apéndice; tabla 3 y 3a).

Sin embargo, a los 75 días (figura 4), las concentraciones de 0.2 y 0.1 mg/l de ABA, en condiciones de luz, tuvieron el mayor diámetro con 4.09 y 4.21 mm, respectivamente.

Así mismo, en condiciones de oscuridad, las dosis de 0.2 y 0.4 mg/l de ABA tuvieron el mayor diámetro con 3.92 y 3.87 mm, respectivamente.

De tal manera que se presento diferencia estadística (Apéndice; tabla 4 y 4a) para las dosis o concentraciones de ABA, pero no para condiciones de fotoperiodo.

PESO DE MICROTUBERCULO

Esta variable solo sé avalúo a los 75 días (figura 5), donde se encontró que el mayor peso de microtuberculos se presento en las concentraciones de 0.0 y 0.1

mg/l de ABA, en condiciones de luz, con un peso de 64.4 y 62.6 mg, respectivamente; mientras que para condiciones de oscuridad, las concentraciones de 0.2 y 0.4 mg/l de ABA, con un peso de 60.56 y 55.06 mg fueron los mas altos.

De tal forma que hubo diferencia altamente significativa para concentraciones y significativa para condiciones de fotoperiodo (Apéndice; tabla 5, 5a, 5b y 5c).

EXPERIMENTO DOS (MEDIO LIQUIDO)

NUMERO DE MICROTUBERCULOS

En la evaluación a los 45 días (figura 6), se observa que las concentraciones de 0.2 y 0.1 mg/l de ABA, en condiciones de luz, tuvieron el mayor numero de microtuberculos con 9.7 y 8.8, respectivamente, pero no presentaron diferencia estadística (Apéndice; tabla 6 y 6a).

Así mismo, a los 75 días (figura 7), las dosis de 0.4 y 0.8 mg/l de ABA, en condiciones de luz, fueron las que indujeron un mayor numero de microtuberculos con 13.2 y 13, respectivamente.

Sin embargo, bajo condiciones de oscuridad, solo la dosis de 0.2 mg/l de ABA, fue la que mostró el mayor numero de microtuberculos con 12.

De tal manera que se presentaron diferencias altamente significativa (Apéndice; tabla 7 y 7a) para dosis o concentraciones de ABA, pero no para condiciones de fotoperiodo.

DIÁMETRO DE MICROTUBERCULOS

En lo que respecta a esta variable, en la evaluación a los 45 días (figura 8), las dosis de 0.2 y 0.4 mg/l de ABA, en condiciones de luz, indujeron el mayor diámetro de microtuberculos, con 2.41 y 2.39 mm, respectivamente; pero no encontrándose diferencia estadística (Apéndice; tabla 8 y 8a).

Así mismo, a los 75 días (figura 9), las concentraciones de 0.1 y 0.2 mg/l de ABA, en condiciones de luz, fueron las que mostraron el mayor diámetro de microtuberculos con 4.63 y 3.94, respectivamente. De la misma forma, en condiciones de oscuridad, las dosis de 0.1 y 0.2 fueron las mejores.

De tal forma que hubo diferencia altamente significativa (Apéndice; tabla 9, 9a, 9b y 9c) entre concentraciones de ABA, pero no para condiciones de fotoperiodo.

PESO DE MICROTUBERCULOS

Esta variable solo se evaluó a los 75 días (figura 10), se observa que el mayor peso de microtuberculos se presento en las dosis de 0.1 y 0.0 mg/l de ABA con 76.3 y 51.7 mg, bajo condiciones de luz.

Sin embargo, bajo condiciones de oscuridad las concentraciones de 0.1 y 0.2 mg/l de ABA, fueron las que tuvieron el mayor peso con 55.7 y 43.1 mg, respectivamente.

De tal manera que se presento diferencia altamente significativa (Apéndice; tabla 10, 10a, 10b y 10c) entre dosis o concentraciones, pero no entre condiciones de fotoperiodo.

