

108
24



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

"MANTENIMIENTO DE GERMOPLASMA DE *Solanum tuberosum* "IN VITRO" EMPLEANDO ACIDO ACETIL SALICILICO"

T E S I S
Que para obtener el Titulo de
B I O L O G O
p r e s e n t a
MARCOS JIMENEZ CASAS



México, D. F.

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	PAG.
LISTA DE CUADROS	V
LISTA DE FIGURAS	VII
RESUMEN	X
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
1. GENERALIDADES DE <u>SOLANUM TUBEROSUM</u>	3
1.1 Origen y distribución	3
1.2 Clasificación botánica	4
1.3 Importancia	5
2. EL CULTIVO DE TEJIDOS	6
2.1 El cultivo de tejidos de papa	7
3. CONSERVACION DE GERMOPLASMA	8
3.1 Banco de germoplasma <u>in vitro</u>	10
3.1.1 Banco de genes activo	12
3.1.2 Banco de genes base	15

4. PRINCIPALES BANCOS DE GERMOPLASMA <u>IN VITRO</u> EN EL MUNDO.	16
4.1 Bancos almacenados por temperatura reducida.	17
4.2 Bancos almacenados por medio modificado	17
4.3 Otros métodos	20
4.4 Métodos de caracterización	20
5. ACIDO ACETIL SALICILICO	22
5.1 La inhibición de procesos diversos por los salicilatos.	23
6. OBJETIVO	26
III. MATERIALES Y METODOS	27
1. MATERIAL BIOLOGICO	27
2. MEDIOS DE CULTIVO	27
2.1 Preparación de medios de cultivo	29
2.2 Preparación de la solución de ASA	29
2.3 Condiciones de cultivo	31
2.4 Preparación de testigos	32

3. EXPERIMENTOS	32
3.1 Experimento 1 Efecto del ASA en el desarrollo de yemas.	32
3.2 Experimento 2 Incubación de yemas en ASA por un periodo de un año	33
3.3 Experimento 3 Cultivo de plantas en invernadero previamente incubadas en ASA	37
IV. RESULTADOS	40
Experimento 1	40
Experimento 2	43
Experimento 3	52
V. DISCUSION	62
VI. CONCLUSIONES	70
VII. BIBLIOGRAFIA	71
VIII. APENDICE	78

LISTA DE CUADROS

Cuadro 2.1 Especies almacenadas en el mundo bajo condiciones de temperatura reducida. Mediante la técnica de banco de genes activo. (IBPGR, 1987).

Cuadro 2.2 Especies almacenadas en el mundo, bajo condiciones de medio modificado. Mediante la técnica de banco de genes activo. (IBPGR, 1987).

Cuadro 2.3 Especies almacenadas en el mundo, otros métodos, mediante la técnica de banco de genes activo. (IBPGR, 1987).

Cuadro 3.1 Clones de Solanum tuberosum del banco de germoplasma in vitro del Programa Nacional de Papa, seleccionados para preservarlos en presencia de ASA.

Cuadro 3.2 Descripción de medios de cultivo.

Cuadro 3.3 Distribución de los clones en cuatro medios de cultivo (F,G,H,I) para su recuperación, después de ser almacenados durante 240 días con ASA 10^{-4} M.

Cuadro 3.4 Clones almacenados por 360 días con ASA 10^{-4} M y recuperados en medio F.

Cuadro 3.5 Clones almacenados por 360 días con ASA 10^{-4} M y transferidos a mismo medio de cultivo (B).

Cuadro 4.1 Efecto del ASA en el crecimiento de yemas axilares de Solanum tuberosum cultivadas in vitro durante 240 días, bajo condiciones de almacenamiento. Los resultados son promedio de 39 clones con 5 repeticiones por clon.

Cuadro 4.2 Incubación de yemas axilares de 39 clones de Solanum tuberosum, en diferentes medios de cultivo, durante 30 días. Previamente almacenados en ASA $10^{-4}M$ durante 240 días. Los datos son el promedio de 8 repeticiones por clon.

Cuadro 4.3 Porcentaje de sobrevivencia, longitud de tallo, peso fresco, porcentaje de explantes brotados, número de brotes por explante y porcentaje de explantes con raíz en yemas axilares de 43 clones de Solanum tuberosum cultivados in vitro durante 12 meses en ASA (1), y posteriormente subcultivadas durante 30 días a medio F (2).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efecto del ASA en la longitud de yemas axilares de Solanum tuberosum (Var. Alpha) cultivadas in vitro durante 120 días, los resultados son el promedio de 5 repeticiones \pm error estándar.

Figura 2. Efecto del ASA en el peso fresco de yemas axilares de Solanum tuberosum (Var. Alpha) cultivada in vitro durante 120 días. Los resultados son el promedio de 5 repeticiones + error estándar.

Figura 3. Porcentaje de sobrevivencia de explantes de Solanum tuberosum almacenados por 120 días en ASA. Los resultados son considerando 5 repeticiones por tratamiento.

Figura 4. Incremento en longitud de tallo de explantes de Solanum tuberosum incubados en diferentes medios de cultivo por 30 días. Previamente almacenados en ASA $10^{-4}M$ durante 240 días. Los datos son el promedio de 39 clones con 8 repeticiones por clon.

Figura 5. Incremento en peso fresco de explantes de Solanum tuberosum incubados en diferentes medios de cultivo por 30 días. Previamente almacenados en ASA $10^{-4}M$ durante 240 días. Los datos son el de 39 clones con 8 repeticiones por clon.

Figura 6. Porcentaje de sobrevivencia de explantes de Solanum tuberosum, incubados en diferentes medios de cultivo por 30 días, previamente almacenados en ASA $10^{-4}M$ durante 240 días. Los datos son el promedio de 39 clones con 8 repeticiones por clon.

Figura 7. Longitud de explantes de Solanum tuberosum después de un almacenamiento de 360 días en ASA 10⁴M. Los resultados son el promedio de 43 clones con 5 repeticiones por clon \pm error estándar.

Figura 8. Peso fresco de explantes de Solanum tuberosum después de un almacenamiento de 360 días en ASA 10⁴M. Los resultados son el promedio de 43 clones con 5 repeticiones por clon \pm error estándar.

Figura 9. Longitud de explantes de Solanum tuberosum, recuperados en medio F durante 30 días. Previamente almacenados durante 360 días en ASA 10⁴M. Los resultados son el promedio de 43 clones con 8 repeticiones por clon \pm error estándar.

Figura 10. Peso fresco de explantes de Solanum tuberosum, recuperados en medio F durante 30 días. Previamente almacenados durante 360 días en ASA 10⁴M. Los resultados son el promedio de 43 clones con 8 repeticiones por clon \pm error estándar.

Figura 11. Porcentaje de sobrevivencia de explantes de Solanum tuberosum (clon 575045), en invernadero, previamente almacenados en ASA 10⁴M durante 365 días in vitro y subcultivadas en medio G durante 30 días in vitro. Los resultados son promedio de 10 repeticiones.

Figura 12. Longitud de Solanum tuberosum (clon 575045) bajo condiciones de invernadero durante 90 días previamente almacenadas en ASA in vitro en medio B (ASA 10⁴M) testigo en medio A, posteriormente recuperadas en medio G (ASA 2.5 X 10⁴M) y el testigo en medio F cada punto es el promedio de 10 repeticiones.

Figura 13. Número de tubérculos de Solanum tuberosum (clon 575045), obtenidos en invernadero, a partir de explantes almacenados previamente en ASA $10^{-4}M$ durante 360 días in vitro y subcultivados en medio G durante 30 días in vitro. Los resultados son promedio de 10 repeticiones \pm error estándar.

Figura 14. Peso de tubérculos de Solanum tuberosum (clon 575045) obtenidos en invernadero, a partir de explantes almacenados previamente en ASA $10^{-4}M$ durante 360 días in vitro y subcultivados en medio G durante 30 días in vitro. Los resultados son promedio de 10 repeticiones \pm error estándar.

Figura 15. Diámetro de tubérculos de Solanum tuberosum (clon 575045), obtenidos en invernadero, a partir de explantes almacenados previamente en ASA $10^{-4}M$ durante 360 días in vitro y subcultivados en medio G durante 30 días in vitro. Los resultados son promedio de 10 repeticiones \pm error estándar.

RESUMEN

Se estudio el efecto del ácido acetyl salicilico (ASA) en la conservación in vitro de 100 clones de Solanum tuberosum, mediante los siguientes experimentos:

Se probaron cuatro concentraciones de ASA ($10^{-4}M$, $2.5 \times 10^{-4}M$, $5 \times 10^{-4}M$ y $7.5 \times 10^{-4}M$) en el crecimiento de yemas axilares de papa, modificando el medio de cultivo A, recomendado por el CIP, que es el medio para almacenamiento. Se observó inhibición en el crecimiento, resultando mayor a concentraciones altas. En ASA $10^{-4}M$ la inhibición del crecimiento fue semejante a la presentada por el testigo así como el porcentaje de sobrevivencia, que para ambos casos fue de 100%.

Posteriormente se incubaron yemas axilares de 100 clones con ASA $10^{-4}M$ para ser almacenadas. Después de ocho meses se sacaron del almacenamiento 39 clones para conocer su recuperación en cuatro medios de cultivo (F, G, H, I), ya que dichos clones presentaban síntomas de senescencia y una inhibición del crecimiento mayor que el testigo. En los cuatro medios de cultivo los explantes mostraron un incremento en peso fresco y longitud superior a su testigo además de un porcentaje de sobrevivencia semejante al presentado por éste. Después de un año de almacenamiento 43 clones fueron sacados y recuperados en medio F obteniéndose una sobrevivencia de 100% al salir del almacenamiento, las plantas tratadas con ASA mostraron mayor

longitud, pero menor peso fresco que las plantas testigo. Por otro lado 18 clones restantes almacenados por un año con ASA fueron subcultivados al mismo medio (ASA 10^{-4} M), para continuar con su almacenamiento en el salicilato, los cuales presentaban hasta los dos meses de transferidos 100% de sobrevivencia. De los 43 clones sacados al año de almacenamiento se eligió al azar el clon 575045 para ser recuperado en medio G, donde se obtuvo una sobrevivencia de 100%, y posteriormente se llevó a invernadero donde se observó que plantas tratadas presentan un crecimiento similar a las plantas testigo; sin embargo, la producción de tubérculo se vió afectada en plantas tratadas con ASA, ya que en estas plantas se obtuvo un mayor número de tubérculos con menor peso y menor tamaño que los obtenidos por el testigo, se discuten las ventajas que estos resultados implican.

I. INTRODUCCION

En México el consumo de la papa se ha incrementado en los últimos años, convirtiéndose en un alimento importante. La cosecha en la superficie nacional se estima en 70 000 hectáreas, con una producción total de 930 000 toneladas (SARH, 1990). A nivel mundial el cultivo de papa alcanza el cuarto lugar, después del maíz, trigo y arroz (FAO, 1986; citado por Abello, 1985).

Las colecciones de germoplasma vegetal representan una fuente de variación genética importante para el mejoramiento genético de cultivos con importancia en la alimentación, en la economía y en la ecología. Muchos de estos cultivos son conservados mediante su semilla sexual, sin embargo algunos producen semillas recalcitrantes, por lo que no se pueden conservar mediante su semilla sexual sino que su conservación tiene que ser vegetativa lo cual representa un riesgo, ya que dicho material está expuesto a factores bióticos y abióticos. La papa presenta este tipo de problemas por tener semilla de tipo recalcitrante, pero mediante la técnica de cultivo de tejidos dichos problemas son solucionados por los métodos de almacenamiento in vitro que incluyen la conservación a corto y mediano plazo así como la conservación a largo plazo o criopreservación. (Withers, 1985).

Actualmente se trabaja en la optimización de los métodos de conservación in vitro, con el fin de aumentar la sobrevivencia durante el almacenamiento y durante la recuperación después del

almacenamiento.

En algunas plantas se han encontrado los salicilatos en forma de ésteres (Collier, 1963), sin embargo, se desconoce parcialmente su modo de acción en los vegetales, varios trabajos han demostrado que intervienen en diferentes funciones, como la inhibición de procesos diversos, transpiración, actividades enzimáticas, producción de proteínas relacionadas con la patogénesis, etc. (Saedi et al, 1984; Larqué-Saavedra, A., 1978; Kumar and Nanda, 1981 y Collige and Slusarenko, 1987).

Basado en los estudios realizados en un clon de Solanum cardiophyllum (López-Delgado, 1987) y en otro de Solanum tuberosum (Mora, 1991), se plantea establecer el efecto del ácido acetyl salicílico en la preservación in vitro a mediano plazo de diferentes clones de Solanum tuberosum pertenecientes al banco de germoplasma in vitro del Programa Nacional de Papa del INIFAP.

Hipótesis: Si el ASA mostró potencial en la preservación in vitro de un clon de S. cardiophyllum y otro de S. tuberosum, entonces el ASA podría ser una alternativa real para la conservación in vitro de un mayor número de clones de Solanum tuberosum a mediano plazo, sin afectar la sobrevivencia de las plantas tanto en las fases del almacenamiento como en la de recuperación.

II. REVISION DE LITERATURA

1. GENERALIDADES DE SOLANUM TUBEROSUM

1.1. Origen y distribución.

Los documentos arqueológicos y etnológicos hasta ahora disponibles indican que la papa se originó en las altas mesetas de la cordillera de los Andes, al sur del Perú y al norte de Bolivia (Dodds, 1962). Particularmente a las orillas del lago Titicaca a casi 4000 metros de altura, existe una gran variabilidad genética de especies, indicando que en estos lugares se encuentra su centro de origen. (Espinoza, 1988).

La domesticación de la papa fue hecha por los Incas hace aproximadamente 8 mil años, donde adoptó el nombre de papa en el lenguaje Quechua del imperio Inca (Harris, 1978).

Al ser conocida por los españoles en el siglo XV durante la conquista de América, la papa es llevada a Europa, donde surgen nuevas variedades y se constituye en un alimento básico. Posteriormente tiene su aparición en Asia y Africa, actualmente la papa es uno de los cultivos alimenticios importantes para países con alto índice demográfico como China e India (Espinoza, 1988).

La papa crece en climas templados entre 7.2 y 18.3°C, resistiendo un mínimo de 2°C. En altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 4000 metros sobre el nivel del mar, dependiendo de la pluviosidad y oscilación de temperatura durante todo el año. (Montaldo, 1984).

La diversidad de especies de papa se extiende por todo América desde el sur de E.U, México, América Central, los países andinos y hasta el sur de Chile (Horton, 1988).

1.2 Clasificación Botánica.

La papa pertenece a la familia de las solanáceas, que incluye a especies de importancia económica como el tomate, el tabaco, los pimientos y las berenjenas; el género Solanum comprende alrededor de 2000 especies en todo el mundo (Harris, 1978). Aunque existe gran número de especies de papa solo ocho especies se cultivan, de las cuales únicamente Solanum tuberosum es cultivada por todo el mundo, las otras siete se cultivan sólo en países andinos (Huaman, 1986).

De acuerdo con las características florales, la clasificación de la papa es la siguiente (Huaman, 1986):

Familia Solanaceae

Género Solanum

Sección Petota

Esta sección se subdivide en series, especies y subespecies.

Especie tuberosum

Subespecie Solanum

También se clasifica de acuerdo con los niveles de ploidia. El número cromosómico de la papa es de doce cromosomas ($X=12$). Las células somáticas en las especies cultivadas de papa pueden variar entre el nivel diploide y pentaploide. Solanum tuberosum es tetraploide ($4n=48$) (Huaman, 1986).

1.3 Importancia.

En la mayoría de países en desarrollo el consumo de papa aumenta considerablemente, por los ingresos crecientes y el cambio en los hábitos de consumo, asociados con el desarrollo económico y el urbanismo (Horton, 1988).

La contribución de la papa en la alimentación humana no es solamente como fuente de carbohidratos sino en un mayor grado en proteínas, vitaminas y minerales (Woolf, 1987). La relación proteína-caloría es más alta que en la mayoría de los cereales y los plátanos.

Por otro lado es comparable a hortalizas en cuanto al contenido de vitaminas, especialmente vitamina C; normalmente es una buena fuente de fosfato, magnesio y potasio (INTA, 1984).

Cabe destacar que las papas rinden más energía alimenticia por hectárea que los cereales (Horton, 1988).

En la industria la papa sirve de materia prima en transformaciones industriales a partir del almidón llamado también fécula; se emplea tal cual o despolimerizado en forma de dextrina (almidón modificado) en varias industrias alimenticias: como sustituto de la harina para aligerar las pastas en la fabricación de galletas, repostería, etc., como espesante y estabilizante en los helados, sopas, salsas, etc. Finalmente los aguardientes, como el vodka o el aquavit, son alcoholes de fécula de papa. En la industria farmacéutica la fécula sirve a menudo como excipiente para los comprimidos (Ducieux, 1986).

2. EL CULTIVO DE TEJIDOS.

El cultivo de tejidos en células vegetales aparece 30 años después de que Carell, en 1912, lograra cultivar células animales in vitro. En 1962, Morell y Martín en Francia demuestran que los tejidos meristemáticos son capaces de desarrollar plantas completas in vitro (Petiard and Bariaud-Fontanel, 1986).

Este descubrimiento que demuestra la potencialidad de las plantas para formar nuevos individuos a partir de células aisladas en cultivo, ofrece un gran número de aplicaciones prácticas en la propagación y fitomejoramiento de las plantas

cultivadas. Por otra parte permite el estudio manipulable de los mecanismos de diferenciación celular y de los factores físicos y químicos que los regulan (Cassab, 1984).

La aplicación del cultivo de tejidos en la agricultura ha resultado tener gran aceptación, en varios aspectos como la rápida propagación clonal, en la eliminación de virus y otros patógenos, el almacenamiento de germoplasma, y la síntesis de productos secundarios. (Dodds, 1987).

2.1 El cultivo de tejidos de papa.

La papa es un modelo en cultivo de tejidos, todas las técnicas conocidas para cultivar tejidos vegetales son aplicadas en papa con buenos resultados. Esto ha permitido aplicar rutinariamente algunas técnicas, mejorando la cantidad y calidad en la producción de papa (Espinoza et al; 1986).

El Centro Internacional de la Papa (CIP, Lima Perú) lleva a cabo trabajos de cultivo de tejidos en papa sobre:

Eliminación de patógenos. A través de termoterapia seguido de cultivo de meristemas. El estado fitosanitario se comprueba con las técnicas de látex o ELISA.

Micropropagación in vitro. El material limpio de virus es propagado por medio del cultivo de meristemas. Estas plantas son enraizadas in vitro para ser usadas como plantas madre, las

cuales son propagadas en campo o invernadero; o bien para producir "semilla" básica certificada.

La conservación del germoplasma in vitro es una alternativa para mantener material genético de papa libre de virus, con lo que se cuenta con material disponible libre de enfermedades.

Exportación internacional de germoplasma. El material sano que se produce puede ser enviado con facilidad, para su propagación y empleo como planta madre (Espinoza et al; 1985).

3. CONSERVACION DE GERMOPLASMA.

La necesidad de conservar la diversidad genética vegetal, como una fuente de variación genética ha dado lugar al establecimiento de colecciones de germoplasma, principalmente por parte de programas de mejoramiento genético. Dichas colecciones denominadas como banco de semillas, banco de genes o banco de germoplasma, representan, una medida satisfactoria en la conservación de los recursos genéticos vegetales. (IBPGR, 1982). Las cuales apoyan a programas nacionales de diferentes especies.

Algunos autores como Withers (1990), hacen referencia a dos aspectos que se deben tomar en cuenta para establecer un banco de germoplasma, primero determinar que variedades, especies o géneros comprenderá la colección, los cuales deben estar caracterizados, evaluados y determinados, para poder ser catalogados mediante una clave y facilitar el uso de dicho banco.

En segundo lugar, se habla de la conservación adecuada del cultivo en cuestión. Debido a que existen semillas que permiten reducir su contenido de humedad y temperatura baja, entre 0 y -20°C, no tienen problemas para ser almacenadas; este tipo de semillas se reconocen como ortodoxas (Roberts, 1973), para las que se han desarrollado técnicas de almacenamiento eficaces.

Sin embargo algunas especies producen semillas que no toleran la disminución en la humedad y en la temperatura, ya que les provoca cambios fisiológicos irreversibles, produciéndoles la muerte, este tipo de semillas se reconocen como recalcitrantes, las cuales además se caracterizan por carecer de un mecanismo de dormancia natural. (Roberts, 1973).

Algunas especies que producen semillas recalcitrantes y que tienen importancia económica son: el cacao (Theobroma cacao), el coco (Cocos nucifera), cultivos madereros como el roble (Quercus Spp) y frutas como el mango (Mangifera indica) (Roberts & Kings, 1982).

Por lo tanto este tipo de especies que producen semillas recalcitrantes sólo se pueden conservar vegetativamente en colecciones de campo, es decir, en huertos o plantaciones. Al igual que aquellas especies que además presentan un alto grado de esterilidad como Solanum tuberosum, algunas especies de Allium y Musa (Withers, 1990).

En el caso de Solanum tuberosum, los materiales genéticos se conservan también a través de tubérculos (semilla asexual), los cuales son cosechados y posteriormente almacenados en bodegas (López, 1988).

Resulta muy problemático y muy costoso mantener las colecciones en campo a través de semilla asexual, como en el caso de Solanum tuberosum, ya que se requiere invertir mucho tiempo, un gran espacio, una labor intensa y se expone el material a los agentes bióticos y abióticos (Fernández and Lu, 1987).

Pero con el desarrollo de la tecnología in vitro, se ha resuelto en gran medida este tipo de problemas en la conservación y mantenimiento de germoplasma vegetal, funcionando como una herramienta que motiva a la planeación, investigación y desarrollo de recursos alternativos para la conservación (Villalobos, 1987).

3.1. Banco de Germoplasma in vitro.

Las técnicas utilizadas en los sistemas in vitro permiten la conservación de germoplasma bajo condiciones controladas, lo cual trae como consecuencia ventajas sobre las colecciones de campo, como los menores costos de mano de obra, ausencia de infecciones, ausencia de peligros contra variaciones del medio ambiente (heladas, granizadas, etc.), acceso oportuno a material para micropropagación, material libre de virus, y disponibilidad permanente de material para propagación y exportación en

cualquier época del año (Espinoza, 1985).

Existen algunos aspectos que deben ser tomados en cuenta para la conservación *in vitro*, de acuerdo con Roca (1989), 1) La capacidad del tejido cultivado, ya que algunas especies no se pueden regenerar por medio de la técnica de cultivo de tejidos. Una alternativa es la embriogenesis somática, donde las plantas generadas con genotipos estables se recobran mediante la micropropagación (Scowcroft, 1984). 2) La viabilidad del tejido cultivado, debe ser evaluada al término de la conservación, tomando en cuenta los siguientes parámetros: contaminación, número de explantes verdes, número de nudos viables, elongación de tallos, presencia o ausencia de raíces y aparición de callos, brotes, etc. 3) Estabilidad genética, se puede garantizar de acuerdo con varios autores (Henshaw, 1975; Kartha, 1981, Espinoza, 1985; y Withers, 1980), mediante el cultivo de meristemo, ya que es muy estable y presenta un gran potencial morfogénético, además la reducción en el desarrollo de la planta provocada por la técnica de conservación *in vitro*, implica una reducción en la división celular lo cual puede reducir la frecuencia de mutaciones que pueden ocurrir durante la duplicación del DNA en fase mitótica del ciclo celular (Henshaw, 1982). Una ventaja adicional al cultivar tejido meristemático, es que este tejido no se encuentra vascularizado por lo que es poco frecuente que sea infectado por virus; lo cual hace más apropiado la utilización del tejido meristemático en la conservación de germoplasma. Por otro lado, se recomienda monitorear la estabilidad genética, mediante aspectos

morfológicos, bioquímicos y moleculares (Withers y Williams, 1986). 4) Administración de datos, el banco de germoplasma debe ser catalogado en aspectos de intercambio de germoplasma, caracterización genotípica, índice de enfermedades, micropropagación, fechas de subcultivos y propagación, y otras operaciones en la conservación.

Por lo tanto los prerrequisitos que debe cumplir un banco de germoplasma in vitro son: que las condiciones de almacenamiento ofrezcan un alto nivel de sobrevivencia y estabilidad.

Se conocen dos tipos de conservación de germoplasma in vitro denominados como banco de genes activo y banco de genes base (Withers y Williams, 1985), términos reconocidos por el Consejo Internacional para Recursos Genéticos de Plantas (IBPGR).

3.1.1. Banco de Genes Activo.

Comprende una conservación a corto plazo (3 a 6 meses) y a mediano plazo (6 meses a 2 años) (Espinoza et al; 1985). El objetivo de la conservación de genes activo es establecer de acuerdo a las condiciones experimentales el desarrollo mínimo posible en el uso de subcultivos, listo para proveer material en la multiplicación evaluación y distribución (IBPGR, 1983).

Este sistema de conservación plantea la reducción en la velocidad de crecimiento, de las plantas, mediante la disminución

de temperatura de incubación intensidad luminosa y composición del medio de cultivo (López-Delgado, 1988; Withers, 1986). La investigación se ha centrado en estos factores tratando de optimizar el medio de cultivo y las condiciones ambientales, para evitar el subcultivo frecuente y mantener la viabilidad del cultivo.

a) Medio de Cultivo Modificado.

Es posible añadir al medio inhibidores de crecimiento específicos, como el ácido abscísico (ABA), se sabe que es inhibidor de procesos diversos, probado en Solanum spp redujo el desarrollo in vitro. (Roca; en Fernández and Lu, 1987).

Fernández and Lu (1987) almacenó durante un periodo prolongado plantas de camote, aplicando en el medio ácido N-dimetil succínico, obteniendo porcentajes altos de sobrevivencia al término del almacenamiento.

Otros compuestos como el B 995 y el fosphon-D tuvieron un efecto inhibitorio en el desarrollo de papa durante el almacenamiento, sin embargo, el efecto fue menor comparado con el obtenido con manitol (Wescott, 1981).

El manitol es catalogado como un inductor de estrés ideal (Brown et al; 1979), ya que además de ser metabolizado lentamente, producen cambios en el potencial osmótico de la célula (Thompson et al; 1986 y Cram, 1984). Esto ha sido confirmado en otros estudios como el realizado en el crecimiento

hidropónico de la raíz de trigo, el cual se redujo por el estrés osmótico registrado en los compartimientos celulares causado por el manitol (Pritchard et al, 1991).

En el almacenamiento in vitro el manitol ha resultado adecuado en colecciones de Solanum tuberosum, combinándolo con temperaturas de 8°C y fotoperiodo de 16 horas (López-Delgado, 1988).

Especies de gengibre fueron conservadas con manitol combinado con parafina líquida a temperaturas relativamente altas de 24 a 29°C, logrando inhibir el desarrollo y el periodo de subcultivo; obteniendo una sobrevivencia del al final del almacenamiento. (Dekkers et al, 1991).

Sin embargo en la conservación de Ipomoea batatas, el manitol produjo un efecto indeseable sobre el grosor de las plantas (Jarret and Gawell, 1991).

b) Factores Medioambientales.

La reducción del fotoperiodo y la temperatura han resultado ser eficientes en la disminución del desarrollo de las planta sobre todo cuando en algunos casos se incluye en el medio de cultivo algún osmótico o inhibidor del crecimiento.

Jarret and Gawel, (1991), detuvieron el desarrollo de Ipomoea batatas en un 50% al reducir la temperatura a 15.6°C y al cambiar el fotoperiodo, de 16 horas a 4 horas, el tejido se

mostró clorótico pero las plantas mantenían un buen aspecto.

En especies de Musa, se logró un almacenamiento de 18 meses a una temperatura de 18°C y con una intensidad luminosa reducida (3000-1000 lux). (Vuylsteke, 1989).

Otros cultivos mantenidos con temperaturas reducidas y con algún agente osmótico o inhibidor del crecimiento en el medio son: yuca, papa y batata (Dodds, 1987).

Por otra parte se plantea que el sistema de almacenamiento de banco de genes activo presenta algunas desventajas como la contaminación microbiana, disminución en el vigor de la planta y probables cambios en el genoma (Roca et al, 1989). Estas desventajas se eliminan mediante la conservación a largo plazo o banco de genes base.

3.1.2 Banco de genes base.

Esta técnica de conservación llamada también como criopreservación o conservación a largo plazo, se basa en la reducción total de las funciones metabólicas, incluyendo la división celular de los explantes, esto se realiza cuando el material es llevado a temperaturas de nitrógeno líquido (-186°C) (Kantha, 1981). Básicamente la criopreservación consiste en llevar material biológico de temperaturas fisiológicas normales a temperaturas ultrabajas, donde puede permanecer el tejido durante un periodo ilimitado y cuando dicho material es requerido

este puede regresar a temperatura fisiológica normal sin ningún daño (Withers, 1985).

El procedimiento para llevar a cabo esta técnica comprende: la elección y el aislamiento del material, pretratamiento con sustancias crioprotectoras (DMSO, glicerina, sorbitol), congelamiento con nitrógeno líquido, almacenamiento descongelmiento y fases de recobro. Se recomienda utilizar tejido meristemático o embriones para criopreservación. (Withers, 1990).

Sin embargo, para algunos cultivos la criopreservación presenta todavía algunos problemas. Se han observado algunos casos donde los tejidos criopreservados, muestran después del descongelmiento, disturbios metabólicos y síntomas del daño físico en las membranas celulares, además de que su desarrollo inicial se muestra muy lento (Withers et al; 1990).

En algunas especies de Musa criopreservadas, se han obtenido resultados favorables (Villalobos y Abdelnour, 1989; Vuylstoke, 1989).

4. PRINCIPALES BANCOS DE GERMOPLASMA IN VITRO EN EL MUNDO.

La base de datos del Consejo Internacional de Recursos Genéticos Vegetales (IBPGR), registran hasta 1987, que 47 países cuentan con bancos de germoplasma in vitro, bajo condiciones de

lento desarrollo (banco de genes activo), los cuales suman 506 especies. (IBPGR, 1987).

El análisis de los datos muestran que 293 bancos de germoplasma *in vitro*, almacenan bajo condiciones de lento desarrollo utilizando diferentes técnicas: Bajo condiciones de temperatura reducida se almacena el 86.7%, la técnica de medio modificado la usan el 31.1% y finalmente el 9.9% usa otras técnicas.

4.1 Bancos almacenados por temperatura reducida.

En el almacenamiento por lento desarrollo, la técnica más usada es la que se trabaja mediante la temperatura reducida. Las especies que son almacenadas bajo temperaturas reducidas se reportan en el cuadro 2.1.

4.2 Bancos almacenados por medio modificado.

En esta técnica se utilizan algunos factores limitantes del desarrollo en el medio de cultivo. Partiendo de los 90 bancos que usan esta técnica, el 31.1% usa manitol el 21.1% trabaja con bajas concentraciones de sacarosa, el 15.6% excluye las hormonas y el 11.1% usa ajustadores osmóticos. Las especies almacenadas bajo estas condiciones se reportan en el cuadro 2.2.

Cuadro 2.1. Especies almacenadas en el mundo, bajo condiciones de temperatura reducida. Mediante la técnica de banco de genes activo (IBPGR, 1987).

Acer saccharum	Eleais guineensis	Petargurium x zonale	Saussurea leppa
Aehrocline alata	Fajoa sellowiana	Phaseolus vulgaris	Senecio x hybridus
Allium cepa var. aggregatum	Festuca arundinacea	Phoenix dactylifera	Simmondsia chinensis
A.spp.	F. pratensis	Physcomytrelia patens	Solanum nigrum
Alnus glutinosa	F. x Lolium hybrids	Phytolacca spp.	S. phyreja
A.incana	Fragaria ananassa	Picea abies	S. spp.
Ananas spp.	F. spp.	Pinus radiata	S. tuberosum
Anthurium spp.	Freesia spp.	Pistacia vera	Sorbus aucuparia
Asparagus officinalis	Gerbera jamesonii	Platanus orientalis	S. domestica
A. spp.	G. sp.	P. x acerifolia	Sparaxis spp.
Atropa bella-donna	G. spp.	Poa pratensis	Stachys sieboldi
Avena sativa	Gladiolus spp.	Populus spp.	Sullius sp.
Beta vulgaris	Hevea brasiliensis	P. tremula	Trifolium arvense
Betula pendula	Mordeum spp.	Prunus arium	T. campestre
B.platyphylla	M. vulgura	P. pseudocoraseus	T. glomeratum
(ver japonica)	Hyacinthus orientalis	(X Prunus arium)	T. massilense
Betula pubescens	Hyocyanus muticus	P. spp.	T. pratense
B. spp.	Ipomoea spp.	Pseudotsuga menziesii	T. repens
Brassica napus	Iris spp.	Pteridium aquilinum	T. spp.
Cestanea spp.	Larix decidua	Pteris cretica	Triticum aestivum
Chrysanthemum cinerariaefolium	Lolium spp.	Pyrus communis	T. spp.
C. morifolium	L. multiflorum	P. spp.	Ulmus hybrids
C. spp.	L. perenne	Quercus petraea	Valcinus spp.
Cichorium intybus	L. spp. hybrids	Q. robur	Vitis spp.
Chinchona ledgeriana	Lotus corniculatus	Rhododendron hybrid	V. vinifera
Citrus spp.	Malus domestica	R. spp.	Xanthosoma brasiliense
Colocasia esculenta	M. pumila	Ribes spp.	X. robustum
Cardyline fruticosa	M. spp.	Robinia pseudoacacia	X. sagittifolium
Crinipellis pernicioso	M. rotundifolia	Rosa hybrids	
(Theobroma cacao)	Mandragora turcomanica	R. spp.	
Cyclamen persicum	Manihot esculenta	Rubus fruticosus	
Cynara scolymus	M. spp.	R. hybrid	
Cyphomandra betacea	Maranda arundinacea	R. idaeus	
Dagtylis glomerata	Morus spp.	R. spp.	
Dalbergia sissoo	Musa spp.	R. spp. hybrids	
Datura innoxia	Marcissos spp.	Ruta chalepensis	
D. stramonium	Nephrolepis exaltata	Saccharum spp.	
Daucus carota	Nicotiane spp.	Salix alba	
Dianthus caryophyllus	Petargurium peltatum	Sambucus australis	
D. hybrida			
Digitalis lanata			
Dioscorea spp.			

Cuadro 2.2 Especies almacenadas en el mundo, bajo condiciones de medio modificado. Mediante la técnica de banco de genes activo. (IBPGR, 1987).

Allium cepa	Quercus petraea
Allium fistulosum	Quercus robur
Allium galanthum	Ribes spp.
Allium spp.	Robinia pseudoacacia
Alnus glutinosa	Rorippa nasturtium-aquaticum
Arachis hypogea	Rubus hybrid
Beta vulgaris	Rubus idaeus
Capsicum frutescens	Rubus spp.
Chrysanthemum cinerariaefolium	Rubus spp. hybrids
Chrysanthemum morifolium	Saccharum officinarum
Chinchona ledgeriana	Sacharum spp.
Citrus spp.	Simmondsia chinensis
Coccus nucifera	Solanum tuberosum
Colocasia esculenta	Triticum aestivum
Cyphomandra betacea	Vaccinium spp.
Digitalis lanata	Vitis spp.
Dioscorea spp.	
Claeis guineensis	
Fragaria ananassa	
Fragaria spp.	
Helianthus tuberosus	
Hycosyamus muticus	
Ipomea batatas	
Ipomea spp.	
Lycopersicon esculentum	
Malus spp.	
Manihot spp.	
Musa spp.	
Phoenix dactylifera	
Pistacia vera	
Populus deltoides	
Populus spp.	
Prunus spp.	
Pteridium aquilinum	
Pteris cretica	
Pyrus communis	

4.3 Otros métodos.

Las técnicas menos usadas para reservar germoplasma, pero que en algunas especies resultan eficaces, las llevan a cabo 29 bancos; donde el 34.5% utiliza fotoperiodo reducido, el uso de aceites minerales los llevan a cabo el 13.8%, con frascos sellados el 10.3%, inhibidores del desarrollo son usados en un 6.9%, y el uso de químicos sólo el 3.4%. En el cuadro 2.3 se reportan las especies almacenadas bajo estas condiciones.

Resulta importante destacar que de 293 bancos almacenados por las tres técnicas anteriores, el 30.0% presentó deterioro en los cultivos. Dicho deterioro se presentó de la siguiente forma: en el 4.4% la coloración de los cultivos se tornó negra, café o amarilla; se registró muerte y necrosis en el 6.8%, también la desecación del tejido se mostró en 1.0% y el 1.4% mostraron vitrificación.

4.4 Métodos de caracterización.

De los 293 bancos, en 40 se realiza algún método de caracterización del material, después de haber permanecido almacenado. En cuanto a examinación citológica el 17.5% analiza el número de cromosomas, el 7.5% estudia la citología del cultivo y el 5.0% trabaja sobre el análisis de DNA. Por otra parte el 17.5% realiza exámenes fenotípicos y el 7.5% exámenes morfológicos. Por lo que toca al análisis bioquímico el 22.5%

Cuadro 2.3 Especies almacenadas en el mundo, otros métodos, mediante la técnica de banco de genes activo. (IBPGR, 1987).

Allanthurus altissima
Allium spp.
Alnus glutinosa
Beta vulgaris
Chrysanthemum morifolium
Chinchona ledgeriana
Cyphomandra betacea
Delphinium malabaricum
Dianthus caryophyllus
Digitalis lanata
Dioscorea spp.
Elaeis guineensis
Fraxinus americana
Ipomoea spp.
Physcomytrella patens
Phytolacca decandra
Pistacia vera
Robinia pseudoacacia
Rosa hybrida
Saccharum officinarum
Saccharum spp.
Stachys sielboldi
Triticum aestivum
Vanilla walkeriae
Vinca minor
Vitis spp.

analiza las isoenzimas, el 5.0% las proteínas y el 7.5% los productos secundarios.

De acuerdo con estos métodos de caracterización, en dos bancos se registraron algunos cambios como: se observó que después del almacenamiento, las plantas tenían un florecimiento temprano y por otro lado la velocidad de desarrollo inicial resultaba ser muy lenta, sin embargo posteriormente se recuperaba, volviendo a la velocidad de desarrollo normal.

5. ACIDO ACETIL SALICILICO.

El ácido acetil salicílico (ASA) mejor conocido como aspirina, es un salicilato que se obtiene por acetilación del ácido salicílico, el nombre de aspirina resulta de la contracción de acetilo y del género Spiraea, plantas de este género tienen salicilatos naturales. Los salicilatos son conocidos hace tiempo por su utilidad en la medicina humana, como analgésicos, antirreumáticos, antipiréticos, uricosúricos y antiinflamatorios; además de actuar efectivamente en diversas enfermedades como artritis, cataratas, diabetes, y otras. (Collier, 1963 y Shaphiro, 1986).

Los mecanismos de acción del ASA y de otros salicilatos no se han aclarado, se propone al ASA como un antagonista de las prostaglandinas en tejidos animales (Coolier, 1963 y Shaphiro, 1986), pero estudios recientes muestran que el ASA actúa a nivel de membrana celular, bloqueando directamente la transmisión de

señales químicas al asociarse con proteínas de membrana celular. (Weissmann, 1991).

La molécula de ASA tiene un peso molecular de 180.15, punto de fusión 137°C y un pK de 3.5 (Collier, 1963; Merck S Co.Inc., 1976, en López-Delgado, 1987).

Los salicilatos han sido estudiados en diferentes funciones de las plantas como en la inhibición de procesos diversos, floración, transpiración, producción de grano, maduración de frutos, formación de raíces, actividad enzimática, respiración, resistencia a patógenos y organogenesis (López-Delgado, 1987).

5.1 La inhibición de procesos diversos por los salicilatos.

Los ácidos fenólicos son reguladores de la actividad de la enzima ácido-indolacético oxidasa, que descarboxila al AIA. Dentro de estos ácidos, los ácidos monofenólicos son cofactores mientras que los difenólicos son inhibidores de la enzima, por lo que ejercen un efecto sinérgico o antagonístico sobre la actividad del AIA (Tomazwski and Thimann 1966, Robert, 1976, citados por Cassab, 1984).

En la raíz y coleoptilo de trigo, el ASA inhibió el crecimiento (Larque-Saavedra, 1975). Por otro lado el ASA inhibió los movimientos escotonásticos en hojas de Cassia fasciculata a una concentración de $10^{-4}M$, y promovieron los movimientos fotonásticos a $5 \times 10^{-4}M$, donde al parecer el ASA inhibió la

síntesis de prostaglandinas las cuales parecen acelerar estos movimientos (Saedi et al; 1984).

En algunas especies también se ha logrado el cierre de estomas mediante la aplicación del ácido acetil salicílico (Larqué-Saavedra, 1979).

En fotosíntesis, el disalicildenopropanodiamina (DSPD), inhibió el transporte electrónico ante el fotosistema II y el fotosistema I, y bloqueó la fosforilación en cloroplastos de espinacas (Leasch et al; 1979), se propone que este efecto inhibitorio fue mediado por el salicilaldehído (Ireland y Glowin; 1979).

White (1979) al aplicar ácido acetil salicílico al 0.02% a un pH de 6.5, ácido salicílico al 0.1% y ácido benzoico al 0.1% ambas ajustadas un pH de 6.5, en plantas de tabaco, inhibieron la multiplicación del virus del mosaico del tabaco e indujeron la formación de nuevas proteínas.

En plantas de tabaco White y Burley, el salicilato de sodio indujo la restricción en la multiplicación de los virus ATMV y TRV (Roggero y Penazzio, 1988).

Se propone que los salicilatos promueven la expresión de proteínas PR (Relacionadas con la patogénesis de la planta) al igual que el etileno, el ácido abscísico y la citoquininas; al provocar en la planta una respuesta hipersensitiva (Collinge and Slusarenko, 1987; Doherty et al; 1988; and Miranda et al; 1990).

En cultivos en suspensión de pera, el ácido salicílico y el ácido acetil salicílico inhibieron la biosíntesis de etileno (Leslie and Roman; 1986 citado por Carwell et al; 1989). Observándose los mismos resultados de reducción de etileno al aplicar ASA a cultivos en suspensión de papa (Pearl et al; 1988, citado por Carswell et al; 1989).

López-Delgado (1987) inhibió el crecimiento de yemas axilares de Solanum cardiophyllum al cultivarlas in vitro en presencia de ASA $10^{-4}M$, $10^{-5}M$ y $10^{-6}M$. Posteriormente Mora (1991) obtuvo resultados semejantes al inhibir el crecimiento de yemas axilares de Solanum tuberosum al cultivarlas in vitro en presencia de ASA.

Al aplicar ASA en el cultivo in vitro de ápices de Ipomoea batatas L., se observaron diferencias significativas en los tratamientos con ASA. El ASA influyó sobre el número de foliolos que la planta desarrolló y limitó el crecimiento del camote in vitro. (Albarenga, S. y Villalobos, V.M., 1988).

De acuerdo con los efectos inhibitorios de los salicilatos en plantas y tomando como base los trabajos realizado con ASA en Solanum cardiophyllum, Solanum tuberosum e Ipomoea batatas; en la presente investigación se plantea el siguiente objetivo:

6. Objetivo

Conocer si el potencial del ASA observado en la preservación in vitro de dos clones de papa (S. cardiophyllum y S. tuberosum), es real en la preservación in vitro de un amplio número de genotipos de Solanum tuberosum.

III. MATERIALES Y METODOS.

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Programa Nacional de Papa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) Toluca, Edo. de México.

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Como material biológico se emplearon yemas axilares de 100 clones de Solanum tuberosum (cuadro 3.1), dichos clones fueron seleccionados al azar a partir de los 325 clones que conforman el banco de germoplasma in vitro del Programa Nacional de Papa.

2. MEDIOS DE CULTIVO.

En la elaboración de los medios de cultivo se emplearon los siguientes reactivos: sales inorgánicas (Baker), reguladores del crecimiento (Sigma Chemical Co), vitaminas (Sigma Chemical Co), sacarosa (Baker), agar (Sigma Chemical Co), manitol (Baker), ácido acetil salicílico ASA (Sigma Chemical Co), y dimetil sulfóxido DMSO (Merck).

El medio de cultivo A utilizado, es recomendado por el Centro Internacional de la Papa (CIP) (Espinoza et al, 1987), el cual es una modificación de las sales de Murashige-Skoog (MS) (1962). Otros medios de cultivo empleados en este trabajo son el

Cuadro 3.1 Clones de Solanum tuberosum del banco de germoplasma in vitro del Programa Nacional de Papa, seleccionados para preservarlos en presencia de ASA.

1) 278072.10	26) 397576.25	51) 720083	76) 800223
2) 274080.5	27) 573032	52) 720091	77) 800224
3) 375057.9	28) 573215	53) 720117	78) 800286
4) 375331.1	29) 575001	54) 720118	79) 800289
5) 375333.1	30) 575003	55) 720123	80) 800823
6) 375335.1	31) 575010	56) 720124	81) 800827
7) 376999.6	32) 575021	57) 720130	82) 800928
8) 377257.1	33) 575036	58) 720133	83) 800937
9) 377964.5	34) 575045	59) 720135	84) 800944
10) 378017.2	35) 575049	60) 720138	85) 800945
11) 378711.5	36) 676011	61) 720142	86) 800946
12) 379690.8	37) 676014	62) 750675	87) 800947
13) 379695.14	38) 676026	63) 750708	88) 800954
14) 380496.2	39) 676087	64) 750783	89) Sn. José
15) 3804.96.6	40) 676171	65) 750821	90) Diamante
16) 380506.10	41) 678009	66) 750826	91) R ₂
17) 380586	42) 678011	67) 750835	92) R ₃
18) 380576.11	43) 720025	68) 750851	93) Amigo
19) 380576.35	44) 720031	69) 760065	94) Sebago
20) 380700.79	45) 720052	70) 800027	95) Alpha
21) 380701.12	46) 720053	71) 800097	96) L. Rosset
22) 380700.7	47) 720055	72) 800102	97) R ₂ R ₃
23) 382032.1	48) 720057	73) 800112	98) R ₁ R ₂
24) 382432.2	49) 720071	74) 800212	99) R ₃
25) 387576	50) 720078	75) 800222	100) R ₄

F (Espinoza et al, 1988 comunicación personal) y el H (López, 1987) este último utilizado por su autor en papita güera. Estos medios de cultivo al igual que otros medios empleados se describen en el cuadro 3.2.

2.1 Preparación de medios de cultivo.

El procedimiento general para la preparación de los medios de cultivo es el siguiente: mezclando las soluciones concentradas correspondientes a las sales de Murashige-Skoog con los reguladores de crecimiento que correspondan, según sea el caso, y sacarosa en cantidades requeridas. Se Ajusta el ph a 5.7 con HCl o KCl 1N. Finalmente se adiciona el agar y se licúa el medio. Sirviéndose en tubos de ensayo de 23 X 120 mm y en frascos "Gerber" de 57 X 68 mm, 8 ml por tubo de ensayo y 15 ml por frasco, ambos tapados con tapas de plástico. La esterilización del medio se realizó en un autoclave horizontal a 121°C, durante 15 minutos a una presión de 103.4 Kp (15 libras por pulgada cuadrada).

2.2 Preparación de la solución de ASA.

El ácido acetil salicílico se disolvió con dimetil sulfóxido (DMSO), se aforó con agua destilada y se agregó al medio, la cantidad utilizada de DMSO dependió de la concentración de ASA requerida. Para disolver una concentración de ASA de $10^{-4}M$ se necesitan 0.1 ml de DMSO.

Cuadro 3.2 Descripción de los medios de cultivo

Clave	Medios de Cultivo
A	MS + Manitol 4% + Sacarosa 3% + Agar 0.8% + Tiamina $1.186 \times 10^{-4}M$ + Inositol $5.54 \times 10^{-4}M$.
B	MS + ASA 10^{-4} + Sacarosa 3% + Agar 0.8% + Tiamina $1.186 \times 10^{-4}M$ + Inositol $5.54 \times 10^{-4}M$.
C	MS + ASA 2.5×10^{-4} + Sacarosa 3% + Agar 0.8% + Tiamina $1.186 \times 10^{-4}M$ + Inositol $5.54 \times 10^{-4}M$.
D	MS + ASA $5 \times 10^{-4}M$ + Sacarosa 3% + Agar 0.8% + Tiamina $1.186 \times 10^{-4}M$ + Inositol $5.54 \times 10^{-4}M$.
E	MS + ASA $7.5 \times 10^{-4}M$ + Sacarosa 3% + Agar 0.8% + Tiamina $1.186 \times 10^{-4}M$ + Inositol $5.54 \times 10^{-4}M$.
F	MS + GA ₃ $2.88 \times 10^{-5}M$ + Glicina $1.33 \times 10^{-4}M$ + Ac.Nicotínico $4.06 \times 10^{-4}M$ + Piridoxina HCl $(2.43 \times 10^{-3}M)$ + Sacarosa 2.5% + Agar 0.6%.
G	MS + GA ₃ $2.88 \times 10^{-5}M$ + Glicina $1.33 \times 10^{-4}M$ + Ac.Nicotínico $4.06 \times 10^{-4}M$ + Piridoxina HCl $(2.43 \times 10^{-3}M)$ + Sacarosa 2.5% + ASA $2.5 \times 10^{-4}M$ + Agar 0.6%.
H	MS + IAA $5.7 \times 10^{-6}M$ + BA $4.4 \times 10^{-6}M$ + Sacarosa 3% + Agar 0.7%.
I	MS + GA ₃ $1.154 \times 10^{-4}M$ + IAA $5.7 \times 10^{-6}M$ + BA $4.4 \times 10^{-6}M$ + BA $4.4 \times 10^{-6}M$ + Sacarosa 3% + Agar 0.7%.

ASA - Acido acetil salicilico
MS - Sales de Murashige-Skoog

IAA - Acido Indolacético
BA - Bencil aminopurina

2.3 Condiciones de cultivo.

Para la incubación de las yemas axilares se utilizaron dos cuartos con un fotoperiodo de 16 horas; radiación de $24 \text{ mm}^2 \text{ seg}^{-1}$ (400-700 nm) y temperatura de $16 \pm 1^\circ\text{C}$ en uno de los cuartos, que para fines prácticos en este trabajo se denominó como cuarto de "propagación", mientras el otro cuarto presentó un fotoperiodo de 16 horas, radiación de $11 \text{ mm}^2 \text{ seg}^{-1}$ (400-700 nm) y una temperatura de $8 \pm 1^\circ\text{C}$ al cual se denominó como cuarto de "almacenamiento".

En los experimentos se utilizó siempre un esqueje por tubo de ensayo y ocho esquejes por frasco "Gerber". Cada esqueje integrado por dos yemas axilares.

Las plantas crecidas en invernadero permanecieron a temperaturas de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ como máximo y $14 \pm 1^\circ\text{C}$ como mínimo con fotoperiodo natural. Sembradas en macetas de 16 X 14 cm en suelo de hoja estéril, regadas con agua corriente por periodos de 4 a 5 días.

En general para la evaluación de todos los experimentos, se tomaron los siguientes parámetros: longitud total del tallo, peso fresco y porcentaje de sobrevivencia, otros parámetros se indican en los resultados de cada experimento.

2.4 Preparación de testigos.

En todos los experimentos se tomó de una solución madre de DMSO (1.40×10^{-6} M) un volumen igual al requerido en la solución de ASA y se agregó al medio de cultivo del testigo.

3. EXPERIMENTOS.

3.1 Experimento 1. Efecto del ASA en el desarrollo de yemas.

Con la finalidad de conocer el efecto del ASA en el desarrollo in vitro de yemas axilares durante un periodo de almacenamiento de 120 días, se aplicaron cuatro tratamientos a yemas axilares de la variedad alpha, en los cuales se varió la concentración de ASA (cuadro 3.2, medios B, C, D y E. como testigo el medio A). Tales tratamientos permanecieron bajo las condiciones del cuarto de almacenamiento. Previamente se mantuvieron en cuarto de propagación bajo observación por 8 días con el objeto de verificar la ausencia de contaminación.

Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones con sus respectivos testigos. En el montaje de este experimento se utilizaron tubos de ensayo.

3.2 Experimento 2. Incubación de yemas en ASA por un periodo de un año.

Para probar el efecto del ASA en un mayor número de genotipos de Solanum tuberosum y poder determinar su potencial real en la preservación in vitro de los clones que componen el banco de germoplasma del Programa Nacional de Papa del INIFAP, se incubaron en cuarto de almacenamiento yemas axilares de 100 clones en ASA 10^{-4} M, es decir, en medio de cultivo B, mientras que para el caso del testigo se empleo medio de cultivo A.

Cada clon tuvo cinco repeticiones con su testigo respectivo. Este experimento se montó con tubos de ensayo.

El experimento se desarrollo en tres fases:

Fase I

Se sacaron paulatinamente del almacenamiento con ASA 10^{-4} M 39 clones, durante el periodo comprendido entre los 235 días y los 245 días, ya que los explantes de dichos clones presentaban síntomas de aparente senescencia, los cuales después de ser evaluados fueron segmentados en esquejes, posteriormente dichos esquejes se transfirieron a cuatro medios de cultivo (cuadro 3.2; medios F, G, H, I), para conocer la recuperación de dichos clones en diferentes medios de cultivo. La distribución en los medios de cultivo, de los 39 clones, se realizó homoganeamente de

acuerdo con la disponibilidad del material como se indica en el cuadro 3.3, en los siguientes porcentajes el 20.5% se transfirió a los cuatro medios, el 14.2% a tres medios, el 41.0% a dos medios y el 25.6% en un sólo medio; cabe señalar que dicha distribución se llevó a cabo sin preferencia hacia algún medio de cultivo.

La incubación se llevó a cabo en cuarto de propagación y después de 30 días se evaluó el experimento. Se tuvieron 8 repeticiones por clon con su testigo respectivo. En el montaje de este experimento se utilizaron frascos "Gerber".

Fase II

Después de un año de almacenamiento en ASA $10^{-4}M$, durante los diez siguientes días, se fueron sacando 43 clones (cuadro 3.4), después de su evaluación se transfirieron en esquejes a medio de cultivo F, para determinar su recuperación después de 30 días.

La incubación se llevó a cabo en cuarto de propagación. Después de 30 días se realizó la evaluación, donde cada clon tuvo ocho repeticiones con su testigo respectivo. Para el montaje de este experimento se utilizaron frascos "Gerber".

Cuadro 3.3 Distribución de los clones en cuatro medios de cultivo (F,G,H,I), para su recuperación, después de ser almacenados durante 240 días con ASA 10^{-4} M.

CLON	Medios de Cultivo			
	F	G	H	I
278072.10	x	x	x	x
377257.1	x	x	x	x
575036	x	x	x	x
676011	x	x	x	x
676171	x	x	x	x
750675	x	x	x	x
800097	x	x	x	x
800289	x	x	x	x
800823	x	x	x	x
375331.1		x	x	x
387576		x	x	x
573032	x	x	x	
678011	x	x	x	
800223	x	x	x	
380576.35	x	x		
382032.1	x	x		
720078	x			x
720133	x			x
720135	x			x
375335.1	x			x
L. Rosset		x	x	
380496.2			x	x
720031			x	x
750826			x	x
750835			x	x
720057		x	x	
750708			x	x
380700.79		x		x
800947	x		x	
379695.14	x			
380576.11	x			
676087		x		
R4		x		
800212			x	
750821			x	
720052			x	
376999.6				x
750783				x
720071			x	
Clones				
totales	21	21	26	23

X- Medio en el cual se subcultivó.

Cuadro 3.4 Clones almacenados por 360 días con ASA 10⁴M y recuperados en medio F.

1	274080.5	22	720130
2	375057.9	23	720124
3	377964.5	24	720117
4	380496.6	25	720118
5	380506.10	26	720138
6	380701.12	27	720142
7	382432.2	28	750851
8	397576.25	29	760065
9	575001	30	800027
10	575003	31	800102
11	575021	32	800112
12	575045	33	800222
13	575049	34	800224
14	676014	35	800286
15	676026	36	800827
16	678009	37	800954
17	720025	38	Sn. José
18	720053	39	R ₂
19	720055	40	Sebago
20	720083	41	Diamante
21	720091	42	Alpha
		43	720123

Fase III

En esta fase 18 clones restantes (cuadro 3.5) fueron subcultivados al mismo medio (B), en presencia del salicilato con el fin de continuar su almacenamiento rutinariamente, después de que permanecieron por un año en almacenamiento con ASA $10^{-4}M$, y en futuros trabajos del laboratorio realizar estudios de caracterización de dichos materiales.

Estos clones se conservan en cuarto de almacenamiento. Cada clon con cinco repeticiones. El montaje de este experimento se realizó con tubos de ensayo. A los dos meses se evaluó el porcentaje de sobrevivencia.

3.3 Experimento 3. Cultivo de plantas en invernadero, previamente incubadas en ASA.

A partir de los clones que se encontraban almacenados durante un año con ASA $10^{-4}M$ (medio B) y su testigo (medio A), se eligió al azar el clon 575045 el cual fue trasplantado en esquejes a medio G (ASA $2.5 \times 10^{-4}M$) y el testigo a medio F (sin ASA), donde se incubaron por 30 días en cuarto de propagación, posteriormente se trasplantaron a suelo y se llevaron a invernadero. Esto se realizó con la finalidad de conocer el porcentaje de sobrevivencia en la recuperación con medio G, de un clon que previamente estuviera almacenado en ASA $10^{-4}M$ durante

Cuadro 3.5 Clones almacenados por 360 días con ASA $10^{-4}M$ y transferidos a mismo medio de cultivo (B).

-
1. 375333.1
 2. 378017.2
 3. 378711.5
 4. 379690.8
 5. 380586
 6. 575010
 7. 800928
 8. 800937
 9. 800944
 10. 800945
 11. 800946
 12. R_5
 13. Amigo
 14. $R_2 R_3$
 15. $R_1 R_2$
 16. R_3
 17. R_4
 18. 573215
-

un año y determinar el comportamiento en invernadero así como la producción de tubérculo de dicho clon tratado con ASA tanto en invernadero como en fase de recuperación.

Para este experimento se utilizaron 10 repeticiones para el testigo y 10 repeticiones para el tratamiento, cada repetición constó de un explante por maceta. Cada ocho días se evaluó la longitud total del tallo y el número de nudos para cada planta; la cosecha se llevó a cabo a los 90 días después de la siembra. La producción de tubérculo se evaluó tomando las medidas por planta del tamaño del tubérculo, peso del tubérculo y número del tubérculo.

IV. RESULTADOS

Las claves de los medios de cultivo del cuadro 3.2 son utilizadas en la presentación de los resultados.

Experimento 1

Este experimento se diseñó para conocer el efecto del ASA en el crecimiento de yemas axilares de Solanum tuberosum, en función de las dosis probadas y establecer de esta forma la dosis óptima para el almacenamiento de germoplasma in vitro; se observó que la inhibición en el crecimiento de las plantas fue mayor a medida que la concentración de ASA aumentó siguiendo un patrón de dosis respuesta. Esto se hace evidente en la longitud del tallo (figura 1), donde a medida que la concentración del salicilato es mayor la longitud del tallo disminuye; sucediendo lo mismo con el peso fresco de las plantas (figura 2). Además, se presentó una reducción en el tamaño de las hojas y en el de las raíces, estas últimas con una coloración blanca, el tallo se curvó y sufrió un ligero engrosamiento. Dichas modificaciones se observaron en todos los tratamientos con ASA. Conforme aumentaba la concentración de ASA se hacían más evidentes. De tal forma que a concentraciones de $7.5 \times 10^{-4}M$ (E) el 80% de las plantas produjo raíz, mostrándose muy reducida; dicho porcentaje fue el más bajo de los tratamientos. Por otro lado, el tejido de las plantas tratadas con ASA mostró cierto grado de clorosis, es decir, presentaban una coloración amarillo-verdoso. Dicho grado

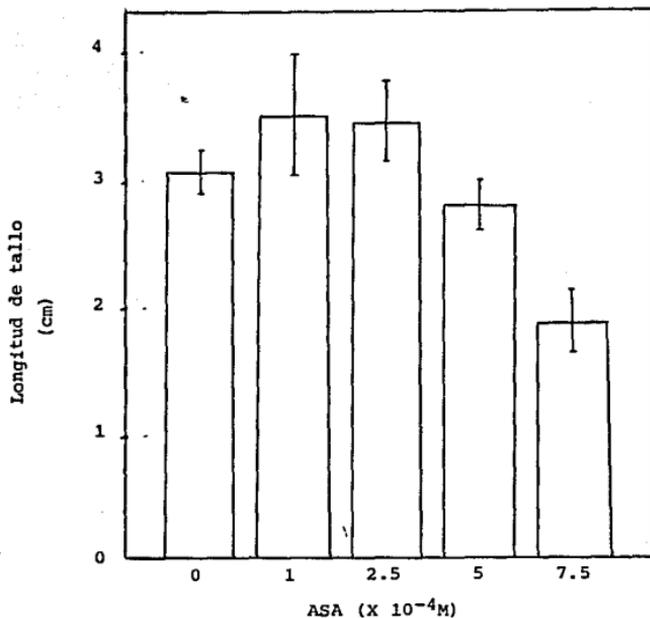


Figura 1. Efecto del ASA la longitud de yemas axilares de *Solanum tuberosum* (var alpha) cultivadas *in vitro* durante 120 días, los resultados son el promedio de 5 repeticiones \pm error estándar.

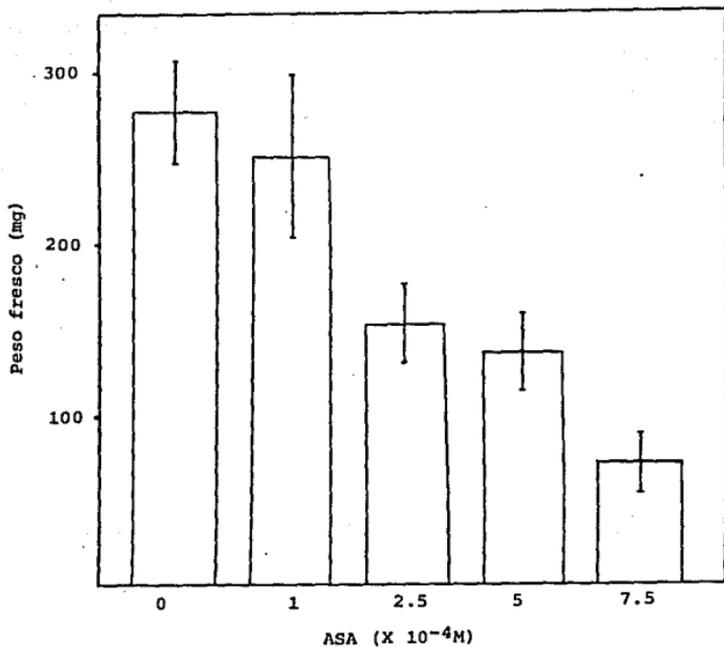


Figura 2. Efecto del ASA en el peso fresco de yemas axilares de *Solanum tuberosum* (var alpha) cultivada *in vitro* durante 120 días. Los resultados son el promedio de 5 repeticiones \pm error estándar.

de clorosis aumentó en concentraciones mayores a la de $10^{-4}M$ (B), lo cual hace pensar en cierta toxicidad del salicilato en concentraciones altas. Esto parece ser más evidente cuando el porcentaje de sobrevivencia del tejido decrece en concentraciones de $2.5 \times 10^{-4}M$ (C), $5 \times 10^{-4}M$ (D) y $7.5 \times 10^{-4}M$ (E); en 95%, y 90% respectivamente. (Figura 3).

En la concentración de $10^{-4}M$ (B), se obtuvieron valores semejantes a los valores testigo, tanto en peso fresco como en longitud de tallo, pero algo muy importante es que a esta concentración se obtuvo el 100% de sobrevivencia del tejido (figura 3), porcentaje no alcanzado por los demás tratamientos. Por otro lado, las plantas tratadas a dicha concentración no mostraron las características observadas en los otros tratamientos. Por tal motivo para el experimento 2 se optó por trabajar con la concentración de $10^{-4}M$ (B).

Experimento 2

Este experimento se realizó para conocer la respuesta de un amplio rango de clones (100 en total) durante un periodo de cultivo prolongado, en presencia de ASA, para establecer si el ASA mantiene el efecto inhibitor en el crecimiento de dichos clones; además determinar si al finalizar el periodo de cultivo podrían ser recuperados en un medio de cultivo sin ASA. De esta manera se podría saber si el ASA es una opción real para la preservación *in vitro* de un banco de germoplasma de papa, y conocer los alcances y limitaciones de esta metodología.

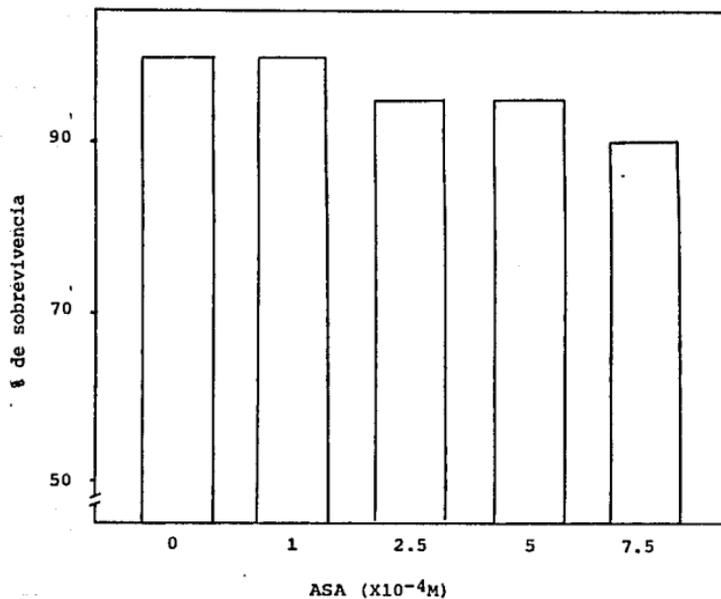


Figura 3. Porcentaje de sobrevivencia de explantes de Solanum tuberosum almacenados por 120 días en ASA. Los resultados son considerando 5 repeticiones por tratamiento.

Al término de 8 meses de almacenamiento en ASA 10⁻⁴M (B), 39 clones de los 100 almacenados, presentaron características visibles de senescencia, ya que el tejido de las hojas y del tallo presentaba cierto grado de clorosis, además de que en algunos casos existía tejido necrótico, por lo que se encontraban algunas plantas muertas. De tal forma que los 39 clones fueron sacados del cuarto de almacenamiento presentando un porcentaje de sobrevivencia de 90.3% para los clones tratados con ASA mientras que para el testigo fue de 97.9% por lo que toca a la raíz, ésta se presentó en todas las plantas tratadas con el salicilato al igual que en el testigo, (cuadro 4.1), sólo que se mostró con poco desarrollo comparado con éste. Respecto a la longitud del tallo y al peso fresco, fue notoria la inhibición causada por el ASA, debido a que la longitud del tallo fue menor por 1 centímetro con respecto al testigo y el peso fresco resultó casi 3 veces más pequeño que el testigo (cuadro 4.1). En los 39 clones se observaron características antes vistas de hoja reducida, tallo curvado y engrosado y raíz con poco desarrollo presentando una coloración blanca.

Fase I

Los 39 clones provenientes de ASA, cultivados en cuatro medios de cultivo mostraron globalmente un porcentaje de sobrevivencia por arriba del 80% (cuadro 4.2); mostrando capacidad de recuperación en los cuatro medios de cultivo, observándose un incremento en las plantas, tanto en la longitud del tallo como en el peso fresco, superiores al incremento

Cuadro. 4.1 Efecto del ASA en el crecimiento de yemas axilares de Solanum tuberosum cultivadas in vitro durante 240 días, bajo condiciones de almacenamiento. Los resultados son promedio de 39 clones con 5 repeticiones por clon.

Tratamiento (ASA)	% de Supervivencia	X Peso fresco (mg)	X Longitud del tallo (cm)	% de plantas con raíz	% de explantes brotados	No. de brotes por explantes
0	97.9	191.4+25.06	4.3+0.16	100	23%	1.01+0.35
10 ⁻⁴	90.3	71.8+4.63	3.3+0.15	100	20.7%	1.08+0.27

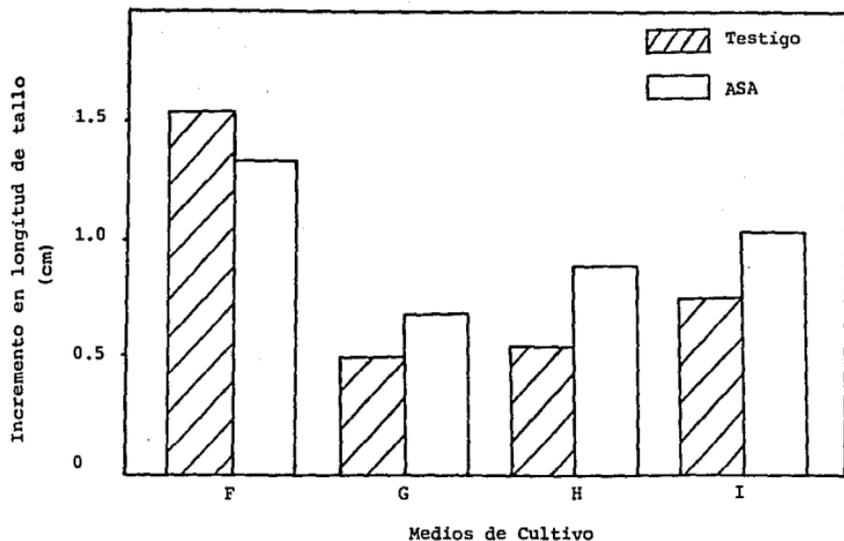


Figura 4. Incremento en longitud de tallo de explantes de *Solanum tuberosum* incubados en diferentes medios de cultivo por 30 días. Previamente almacenados en ASA $10^{-4}M$ durante 240 días. Los datos son el promedio de 39 clones con 8 repeticiones por clon.

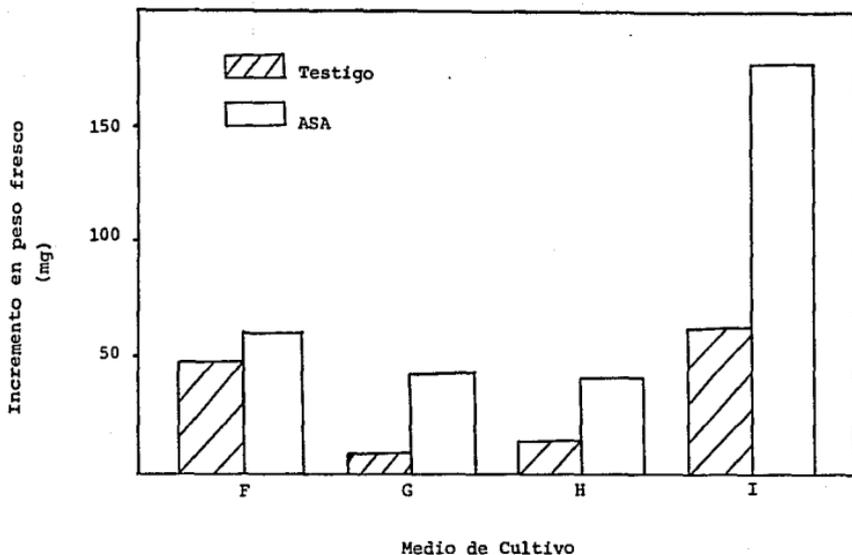


Figura 5. Incremento en peso fresco de explantes de *Solanum tuberosum* incubados en diferentes medios de cultivo por 30 días. Previamente almacenados en ASA $10^{-4}M$ durante 240 días. Los datos son el promedio de 39 clones con 8 repeticiones por clon.

Cuadro 4.2 Incubación de yemas axilares de 39 clones de Solanum tuberosum, en diferentes medios de cultivo, durante 30 días. Previamente almacenados en ASA $10^{-4}M$ durante 240 días. Los datos son el promedio de 8 repeticiones por clon.

Procedencia (ASA M)	Medio de cultivo (tratamiento)	% de supervivencia	X Incremento en peso fresco(mg)	X Incremento en longitud tallo (cm)	% de explantes con raíz	% de explantes brotados	No. de brotes por explante
0	F	100	49.26	1.54	100	9.0	2.5 \pm 0.2
0	G	98.0	9.10	0.49	100	7.5	1.5 \pm 0.2
0	H	97.8	13.35	0.52	100	12.1	2.3 \pm 0.2
0	I	90.5	65.40	0.72	100	16.0	2.9 \pm 0.4
10^{-4}	F	99.10	62.140	1.31	100	9.5	2.6 \pm 0.4
10^{-4}	G	95.0	44.30	0.68	100	8.3	1.5 \pm 0.2
10^{-4}	H	93.1	41.55	0.89	100	12.6	2.7 \pm 0.3
10^{-4}	I	91.5	179.14	1.28	100	16.0	3.5 \pm 0.59

presentado por las plantas testigo (figuras 4 y 5). De tal forma que en el caso del peso fresco, el medio que favoreció un mayor incremento respecto a su testigo fue el medio I con un 486.8%, que además, presentó un mayor número de brotes y sus plantas formaron callo (cuadro 4.2). En el medio G el incremento de peso fresco también fue considerable con un un 31.2%.

Por lo que toca a longitud de tallo, los medios en los que se observó un mayor incremento fueron el medio H y el medio I en 171% y 177% respectivamente. Por otra parte el desarrollo de las hojas y de la raíz fue óptimo en los cuatro medios de cultivo, sin embargo, en medio de cultivo F se mostró el mejor desarrollo de hojas y raíz, donde en términos generales el vigor de la planta fue excelente, presentando el mayor porcentaje de sobrevivencia (figura 6). Los valores en incremento de peso, porcentaje de explantes brotados y número de brotes por explante son valores intermedios respecto a los obtenidos por los otros medios de cultivo, sin inclinación hacia algún tratamiento en especial. De acuerdo con esto en la siguiente fase se utiliza el medio de cultivo F en la recuperación de los clones.

Fase II

Al término de 365 días, de los 100 genotipos almacenados en un principio, 43 genotipos fueron sacados del almacenamiento, los cuales mostraron tener una sobrevivencia de 97.3% para los tratados con ASA y 98.9% para los testigo.

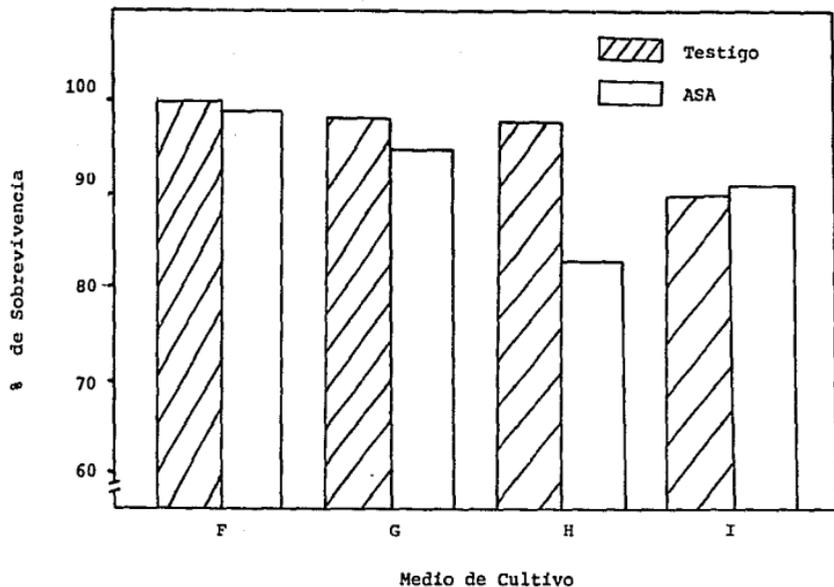


Figura 6. Porcentaje de supervivencia de explantes de *Solanum tuberosum*, incubados en diferentes medios de cultivo por 30 días, previamente almacenados en ASA $10^{-4}M$ durante 240 días. Los datos son el promedio de 39 clones con 8 repeticiones por clon.

La longitud del tallo, en los clones tratados con ASA, resultó ligeramente mayor que las plantas testigo por 0.5 cm (figura 7 y cuadro 4.3). Mientras que para el caso del peso fresco fue mayor en el testigo que en el tratamiento (figura 8 y cuadro 4.4). Por otro lado, el porcentaje de explantes brotados disminuyó en un 10% en plantas tratadas con ASA respecto a las testigo, pero el número de brotes por planta fue similar en tratamiento y en testigo (cuadro 4.3).

Al finalizar la fase II, la recuperación de los 43 clones, en medio F presentó un porcentaje de sobrevivencia de 100% tanto para las plantas provenientes de ASA como las testigo. Por lo que toca a la longitud del tallo y al peso fresco, en plantas provenientes de ASA, se obtuvieron valores bajos con respecto a las testigo (cuadro 4.3). Lo cual implica que la recuperación se llevó a cabo más lentamente en los clones tratados con ASA previamente (Figuras 9 y 10). Los valores de longitud en plantas tratadas con ASA, se incrementaron en 80.7%, con respecto a su longitud reportada al final del almacenamiento, mientras que las testigo en un 147%. En cuanto al peso fresco el testigo incrementó en 92.8% y las tratadas con ASA en un 70.8%, con respecto al peso fresco reportado al final del almacenamiento.

Experimento 3

Este experimento fue planteado tomando en cuenta los resultados obtenidos en fase I, en la recuperación con medio de cultivo G de clones almacenados en ASA por ocho meses, por lo que

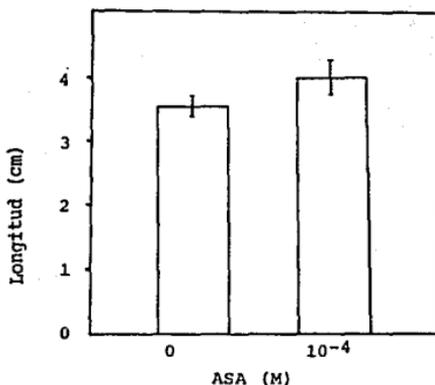


Figura 7. Longitud de explantes de *Solanum tuberosum* después de un almacenamiento de 360 días en ASA 10^{-4} M. Los resultados son el promedio de 43 clones con 5 repeticiones por clon \pm error estándar.

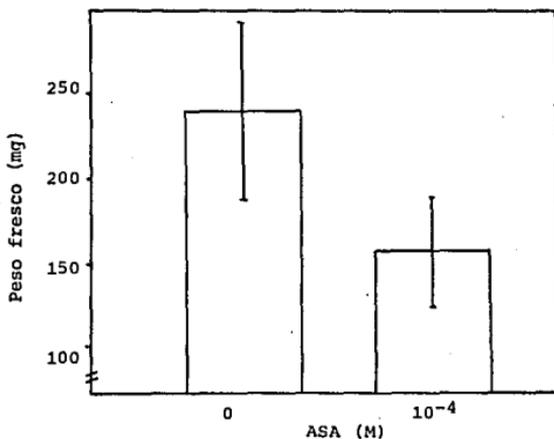


Figura 8. Peso fresco de explantes de *Solanum tuberosum* después de un almacenamiento de 360 días en ASA 10^{-4} M. Los resultados son el promedio de 43 clones con 5 repeticiones por clon \pm error estándar.

Cuadro 4.3 Porcentaje de sobrevivencia, longitud de tallo, peso fresco, porcentaje de explantes brotados, número de brotes por explante y porcentaje de explantes con raíz en yemas axilares de 43 clones Solanum tuberosum cultivados in vitro durante 12 meses en ASA (1), y posteriormente subcultivadas durante 30 días a medio F (2).

Tratamiento (medio de cultivo)	% de sobrevivencia	X Peso fresco (mg)	X Longitud de tallo	% de explantes con raíz	% de explantes brotados	No. de brotes por explante
(1) A	98.9	243.1 \pm 49.7	3.49 \pm 0.27	100	53.3	2.01 \pm 0.2
(2) F	100	261.7 \pm 35.7	5.14 \pm 0.17	100	66.6	1.62 \pm 0.1
(1) B	97.3	157.6 \pm 31.7	3.95 \pm 0.27	100	43.3	2.15 \pm 0.3
(2) F	100	222.3 \pm 35.5	4.89 \pm 0.21	100	50.0	1.37 \pm 0.1

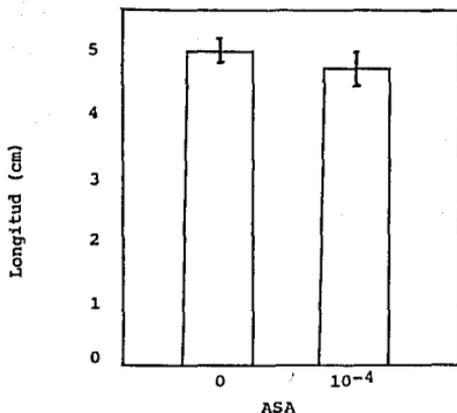


Figura 9. Longitud de explantes de *Solanum tuberosum*, recuperados en medio F durante 30 días. Previamente almacenados durante 360 días en ASA 10^{-4} M. Los resultados son el promedio de 43 clones con 8 repeticiones por clon \pm error estándar.

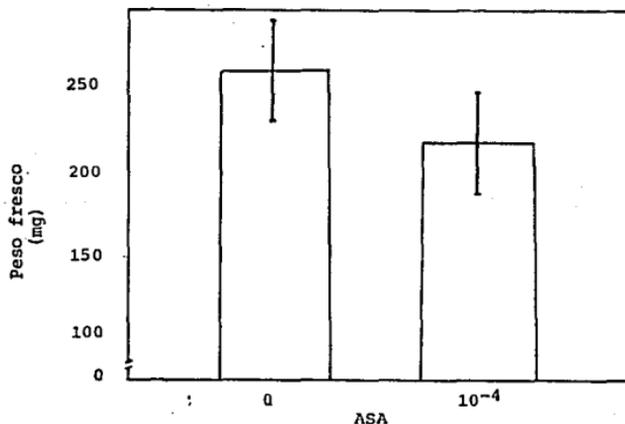


Figura 10. Peso fresco de explantes de *Solanum tuberosum*, recuperados en medio F durante 30 días. Previamente almacenados durante 360 días en ASA 10^{-4} M. Los resultados son el promedio de 43 clones con 8 repeticiones por clon \pm error estándar.

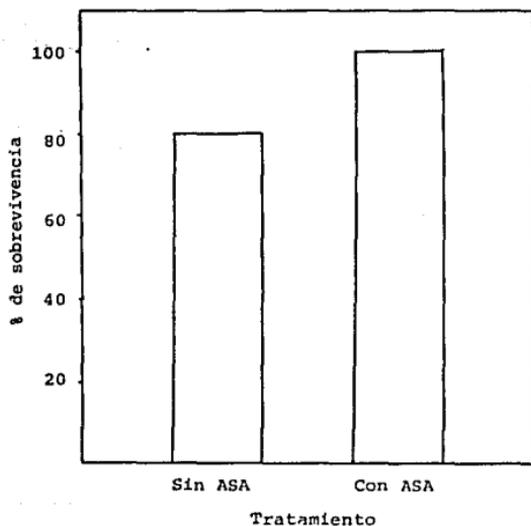


Figura 11. Porcentaje de sobrevivencia de explantes de Solanum tuberosum (clon 575045), en invernadero, previamente almacenados en ASA $10^{-4}M$ durante 365 días in vitro y subcultivadas en medio G durante 30 días in vitro. Los resultados son promedio de 10 repeticiones.

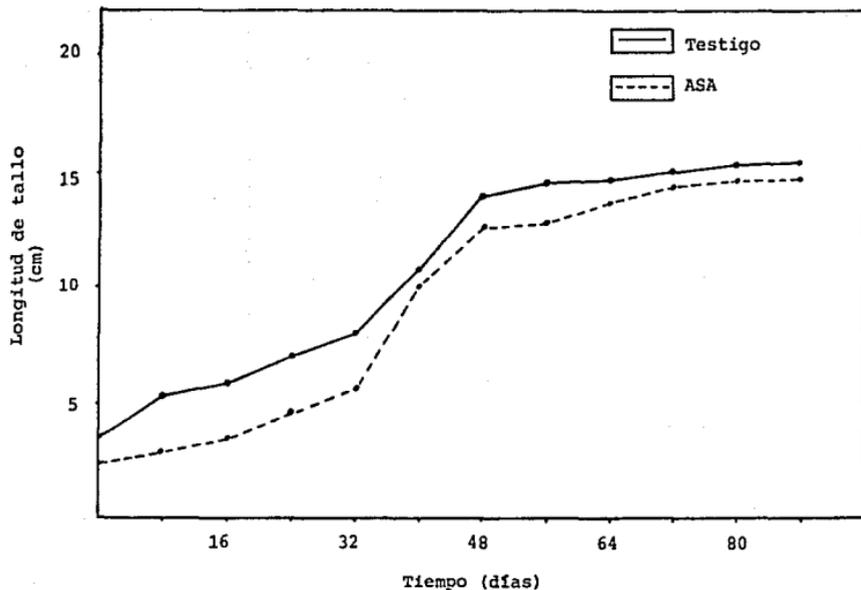


Figura 12. Longitud de Solanum tuberosum (575045) bajo condiciones de invernadero durante 90 días previamente almacenadas en ASA *in vitro* en medio B ($ASA 10^{-4}M$) testigo en medio A, posteriormente recuperadas en medio G ($ASA 2.5 \times 10^{-4}M$) y el testigo en medio F. Cada punto es promedio de 10 repeticiones.

se quiso determinar si se podría obtener la respuesta de su recuperación antes vista con un clon (575045) almacenado con ASA durante 12 meses. Dicho clon presentó una sobrevivencia de 100% después de la recuperación, tanto para el testigo (medio F) como para el tratamiento (medio G). Al ver dichos porcentajes de sobrevivencia, los explantes fueron trasplantados en suelo y llevados a invernadero; para conocer su comportamiento bajo condiciones de invernadero y determinar la producción de tubérculo. Bajo estas condiciones la sobrevivencia fue de 100% para el caso de las plantas tratadas con ASA mientras que las plantas testigo presentaron 80% de sobrevivencia (figura 11), por otra parte las plantas tratadas con ASA presentaron una velocidad de crecimiento ligeramente más lenta en un principio aunque posteriormente fue adquiriendo una velocidad de crecimiento normal (figura 12), cabe destacar que antes del subcultivo a suelo, los explantes tratados con ASA presentaban un menor tamaño en longitud de tallo, poco desarrollo de raíz y un color amarillo-verdoso; características ya clásicas para las plantas tratadas con ASA. Respecto a la producción de tubérculo, se obtuvieron un mayor número de tubérculo en plantas tratadas con ASA que en las plantas testigo (figura 13), pero tanto el tamaño y el peso de los tubérculos fueron mayores en las plantas testigo como se muestra en las figuras 14 y 15.

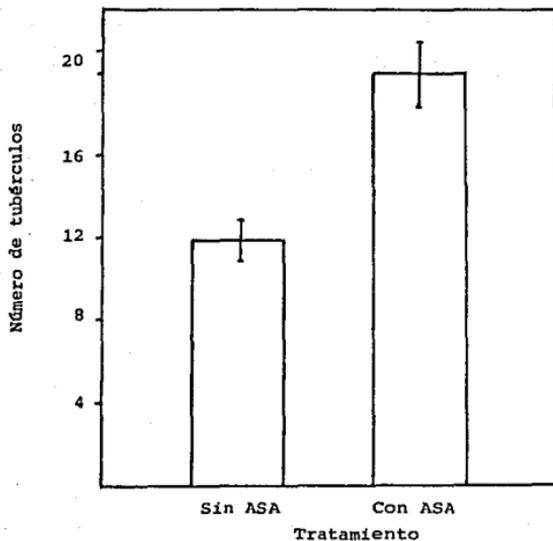


Figura 13. Número de tubérculos de *Solanum tuberosum* (clon 575045), obtenidos en invernadero, a partir de explantes almacenados previamente en ASA $10^{-4}M$ durante 360 días *in vitro* y subcultivados en medio G durante 30 días *in vitro*. Los resultados son promedio de 10 repeticiones \pm error estándar.

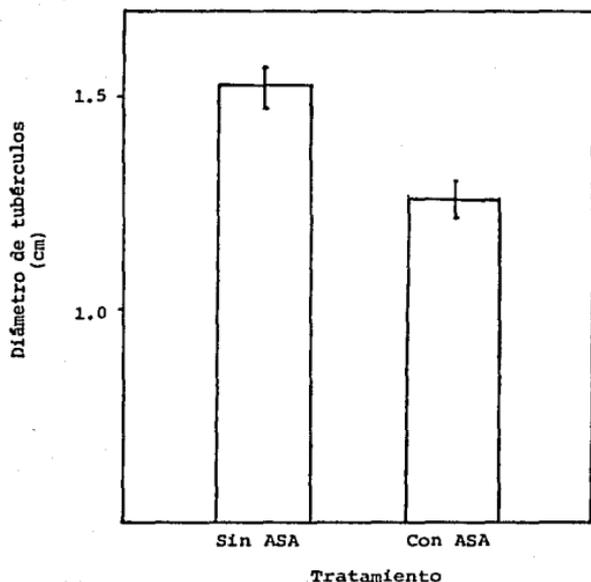


Figura 14. Diámetro de tubérculos de *Solanum tuberosum* (clon 575045), obtenidos en invernadero, a partir de explantes almacenados previamente en ASA $10^{-4}M$ durante 360 días in vitro y subcultivados en medio G durante 30 días in vitro. Los resultados son promedio de 10 repeticiones \pm error estándar.

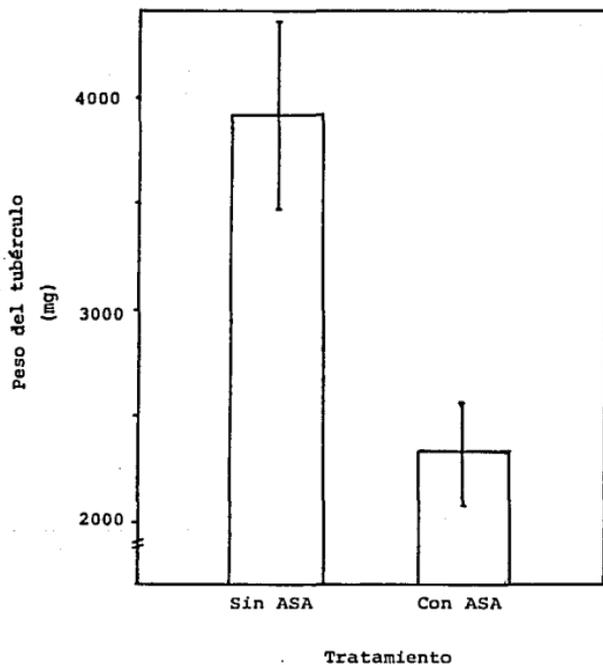


Figura 15. Peso de tubérculos de *Solanum tuberosum* (clon 575045) obtenidos en invernadero, a partir de explantes almacenados previamente en ASA $10^{-4}M$ durante 360 días in vitro y subcultivados en medio G durante 30 días in vitro. Los resultados son promedio de 10 repeticiones \pm error estándar.

V. DISCUSION

Los resultados del experimento 1, muestran que el ASA inhibe el crecimiento de yemas axilares de Solanum tuberosum siguiendo un patrón de dosis respuesta, patrón semejante al encontrado en otros trabajos (López-Delgado, 1987 y Mora 1991), de tal forma que en concentraciones de $5 \times 10^{-4}M$ (D) y $7.5 \times 10^{-4}M$ (E) se registraron los valores de inhibición más altos del experimento, a tal grado que se afectó el desarrollo y sobrevivencia de los explantes; lo cual hace pensar que concentraciones elevadas de ASA resultan tóxicas para la conservación in vitro de Solanum tuberosum. Mientras que los explantes sembrados en $10^{-4}M$ (B) presentaron una sobrevivencia de 100% y valores de crecimiento similares a los valores de explantes testigo, por lo tanto se escogió la concentración de $10^{-4}M$ (B) para aplicarla en el experimento 2.

Las concentraciones de ASA usadas en el experimento 1 se eligieron en base a los resultados obtenidos por Mora (1991), en Solanum tuberosum, donde encontró alargamiento de tallo a concentraciones de ASA de $10^{-5}M$ y $10^{-6}M$ y $10^{-7}M$; mientras que en $10^{-4}M$ la longitud del tallo se inhibió, por lo que se decidió trabajar con las concentraciones ya conocidas.

En el experimento 2, después de ocho meses de almacenamiento 39 clones mostraban síntomas de senescencia, presentando tejido necrótico, hojas y raíces reducidas así como tallo curvado y engrosado mientras que el testigo sin ASA mostraba explantes vigorosos, cabe señalar que las características antes mencionadas

son normales en plantas bajo preservación in vitro, después de un periodo de almacenamiento prolongado y cuando las plantas ya requirieren subcultivo a medio fresco, Por tal motivo se sacaron dichos clones del almacenamiento para conocer su respuesta a la recuperación en cuatro medios de cultivo (F, G, H, I) con reguladores del crecimiento. Cabe señalar que al salir del almacenamiento los 39 clones tratados con ASA presentaron mayor inhibición del crecimiento, mostrado por el menor peso fresco y menor longitud, que las plantas testigo. Sin embargo en los cuatro medios de cultivo usados para la recuperación, los explantes tratados con ASA incrementaron los valores de peso fresco y longitud de tallo con respecto a su testigo, y la sobrevivencia fue similar entre explantes tratados con ASA y testigo con excepción del medio I que presentó los valores de sobrevivencia más bajo (83%) para las plantas tratadas con ASA. Estos resultados demuestran que a pesar del fenotipo alterado a causa de la inhibición provocada por el salicilato, los explantes presentan una aceptable capacidad de recuperación, con un buen porcentaje de sobrevivencia, semejante a los explantes testigo.

En la recuperación de los 39 clones se usaron los medio H y el I en base a que en algunos trabajos, plantas de papa incubadas in vitro con ASA respondieron al ser subcultivadas en dichos medios positivamente al grado de desarrollar nuevos brotes (López-Delgado, 1987 y Mora, 1991). El medio F por su utilización rutinaria en la propagación de explantes en el laboratorio de cultivo de tejidos del Programa Nacional de Papa se consideró en la recuperación, el medio G se tomó en cuenta por los resultados obtenidos con otros trabajos con ASA en el laboratorio.

Cabe señalar que en medio F se obtuvo el mayor porcentaje de sobrevivencia (99.0%), mientras que valores de incremento de peso fresco, porcentaje de explantes brotados y longitud de tallo fueron intermedios a los encontrados en otros medios. El incremento en peso fresco registrado en medio G, de 486.8% con respecto al testigo, ocurrido en explantes tratados con ASA, probablemente se debe a que desarrollaron una capacidad de tolerancia al compuesto, de tal forma que al recuperarlas en un medio que contiene una mayor concentración de ASA, la respuesta de crecimiento fue favorable, por otra parte los reguladores del crecimiento favorecieron la respuesta, dicha respuesta no se dió en el testigo, por el contrario, éste se inhibió ya que nunca antes había estado en contacto con ASA. El medio H y el I presentaron valores elevados de peso fresco, lo cual se explica por el desarrollo de callo y el número de brotes desarrollados en dichos medios en los explantes tratados con ASA. De acuerdo con estos resultados se eligió el medio F para recuperar a los próximos clones que salieran de la conservación con ASA 10⁻⁴M.

El incremento observado tanto en peso como en longitud en explantes recuperados en los cuatro medios de cultivo, previamente almacenados en ASA, resulta semejante a lo observado por López-Delgado y Carrillo (Ciencia Agronómica, en revisión) sobre la inhibición de la actividad fosfatasa provocada por el ASA en Solanum cardiophyllum, donde en presencia de ASA la actividad de la enzima fosfatasa disminuye con respecto al testigo, pero cuando las plantas tratadas con ASA pasan a un medio sin ASA, la actividad de la enzima fosfatasa aumenta tres veces la actividad normal.

Después de un año de conservación 43 clones se sacaron del almacenamiento por presentar las mismas alteraciones fenotípicas de los clones sacados anteriormente. Los 43 clones al salir del almacenamiento presentaron un elevado porcentaje de sobrevivencia, 98.9% para los testigo y 97.3% para los tratados con ASA. Cabe señalar que estos clones tratados con el salicilato mostraron mayor longitud y menor peso que las plantas testigo; sin embargo, la recuperación realizada en medio F presentó el 100% de sobrevivencia en testigo y en tratamiento con ASA. Lo cual reafirma los resultados anteriores con los 39 clones, donde plantas con el fenotipo alterado por el ASA muestran capacidad de recuperación.

Por otro lado, los explantes de 18 clones trasplantados al mismo medio de cultivo ASA 10⁴M (B), provenientes de una conservación de un año, presentaron después de dos meses del subcultivo a medio fresco 100% de sobrevivencia por lo cual se continuará en el laboratorio con su conservación rutinaria en este medio (B) a fin de continuar con otros estudios encaminados a trabajos de caracterización de estos materiales, para conocer si se mantiene la estabilidad genética y fenotípica (color de piel del tubérculo, forma y tamaño de tubérculo, calidad culinaria, etc.).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la recuperación, de los clones subcultivados a los ocho meses en medio G, se planteó conocer si la misma respuesta se podría obtener después de un año en almacenamiento con ASA, para lo cual se eligió al azar el clon 575045 tratado con ASA durante un año, se transfirió

a medio G (ASA $2.5 \times 10^{-4}M$) donde se obtuvo una sobrevivencia del 100% al igual que las plantas testigo (transferidas a medio F, sin ASA). Sin embargo, las plantas tratadas con ASA, tanto en almacenamiento como en recuperación presentaron clorosis y raíz reducida, dichas plantas posteriormente fueron sembradas en suelo y llevadas a invernadero, donde el ASA favoreció la alta sobrevivencia en invernadero ya que presentaron el 100% de sobrevivencia mientras que las plantas testigo (nunca antes en ASA) tuvieron 80% de sobrevivencia, tal vez el estres provocado por el salicilato favoreció la rápida adaptación de las plantas al medio ambiente de invernadero probablemente evitando la transpiración excesiva de la planta; ya que en las plantas testigo los primeros días en invernadero mostraron cierto grado de deshidratación, incluso caída de hojas, cabe señalar que algunos trabajos han demostrado que los salicilatos tienen efecto antitranspirante sobre algunas plantas (Larqué-Saavedra, 1978), y que en plantas previamente expuesta a ASA, muestran mayor actividad enzimática al salir del salicilato (López-Delgado y Carrillo en revisión); quizá alguna proteína esté involucrada como lo mencionan algunos trabajos como el de Roggero y Pennazio (1988), donde se señala la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) sintetizadas a consecuencia del salicilato.

Por otra parte el ASA afectó la producción de tubérculo ya que las plantas tratadas con ASA (almacenamiento (B) y recuperación (G) produjeron tubérculos de menor peso y tamaño, pero en mayor número que los producidos por las plantas testigo (almacenamiento (A) y recuperación (F)). Lo cual resulta interesante y representa una ventaja ideal bajo un esquema de

producción de semilla, debido a que el mismo número de plantas propagadas, que las testigo, nos dá una mayor producción de tubérculo semilla y sumando la mayor sobrevivencia en invernadero que las testigo resulta una gran ventaja, sobre todo si provienen de una recuperación después de un almacenamiento en el banco de germoplasma in vitro, ya que al salir un clon del banco in vitro es deseable su rápida propagación y producción de tubérculo semilla.

Es importante señalar que el experimento 3 en un principio se planteó para conocer, si la respuesta obtenida en medio G (ASA 10⁻⁴M) en la recuperación de fase I se podía obtener en fase II en el clon 575045 (elegido al azar) conservado con ASA durante un año, pero al observar que a pesar de obtener el 100% de sobrevivencia en medio G, los explantes de dicho clon mostraron cierto grado de clorosis, es decir, el tejido mostraba una coloración amarillo-verdoso; por otro lado la raíz era reducida, entonces se decidió trasplantar estas plantas a suelo para conocer su comportamiento en invernadero y posteriormente la producción de tubérculo, para compararlo con los explantes que nunca estuvieron en ASA.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el ASA presenta ventajas importantes debido a que por un lado los clones almacenados con ASA se comenzaron a subcultivar a los ocho meses, lo cual es aceptable si pensamos que los clones con los que cuenta el banco de germoplasma in vitro del Programa Nacional de Papa algunos requieren subcultivo aproximadamente a los seis meses, y la sobrevivencia observada en invernadero fue superior

a las plantas que nunca estuvieron en contacto con el ASA, al igual que la producción de tubérculo, importante para la producción de tubérculo semilla; además de disminuir los costos del mantenimiento del banco de germoplasma.

En base a los resultados señalados, los efectos del ASA en la inhibición del crecimiento in vitro y en la producción de tubérculo, así como en la sobrevivencia en invernadero, que se obtuvieron en los experimentos I, II y III; se podrían explicar en base a que el ASA podría estar actuando a nivel molecular al afectar determinadas actividades enzimáticas, como lo mencionado con la actividad fosfatasa y la aparición de las proteínas relacionadas a la patogénesis, el ASA pudo haber inhibido, el crecimiento, favoreciendo la producción de enzimas que degradan o inactivan a las auxinas endógenas, esta inhibición del crecimiento estuvo en función de la concentración de ASA presente por lo que siguió un patrón de dosis-respuesta en todos los parámetros evaluados en el experimento I (cuadro 4.1). Esto se apoya en que algunos autores consideran que los compuestos fenólicos, incrementan la actividad de enzimas que degradan o inactivan la actividad del AIA (ácido indolacético) (Cassab et al; 1988).

Es posible que el ASA esté actuando a varios niveles en la planta por lo que se requiere llevar a cabo trabajos enfocados a varios aspectos. En la presente investigación se confirma que el ASA es una alternativa para la conservación de germoplasma in vitro de Solanum tuberosum, pero todavía queda por conocer varios aspectos como:

Llevar a cabo análisis de proteínas para conocer si existen cambios en actividades enzimáticas.

Análisis a nivel DNA, con el fin de averiguar si se produce variación por efecto del tratamiento.

Llevar a cabo investigación con los materiales tratados con ASA, sobre posible resistencia a patógenos.

Conocer el comportamiento y producción de tubérculo al sembrar los tubérculos (semilla) producidos en el experimento 3.

De esta manera se podría definir los alcances y limitaciones del uso del ASA en el mantenimiento de germoplasma in vitro de Solanum tuberosum.

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos lo más relevante de la investigación fue:

El ASA es una alternativa real en la preservación a mediano plazo de germoplasma in vitro de Solanum tuberosum.

EL ASA inhibió el crecimiento de yemas axilares de Solanum tuberosum alterando el desarrollo de los explantes, sin afectar la sobrevivencia en la etapa de recuperación y la capacidad de micropropagación.

El ASA favoreció la sobrevivencia en invernadero y modificó la producción de tubérculos al aumentar el número y disminuir su peso y tamaño.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abello, J.P. 1985. La papa como alternativa para una buena nutrición. (Reporte No. 56) SARH.
- Albarenga, S. y Villalobos, V. M. 1988. Efecto del ácido acetil salicílico en el crecimiento *in vitro* de ápices de camote. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica. Informe Anual No. 9, 45-46.
- Brown, D.C., Leung, D.W. and Thorpe, T.A. 1979. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. *Physiol. Plant* 46:36-41.
- Carwell, G.K., Johnson, C.M., Shillito, R.D. and Harms, C.T. 1989. O-acetyl-salicylic acid promotes colony formation from protoplasts of an elite maize inbred. *Plant Cell Reports* 8:282-284.
- Cassab, G. 1984. Control hormonal de la morfogenesis de células vegetales en cultivo. Cuadernos de postgrado. Depto. de bioquímica vegetal, UNAM. 11:140-175.
- Collige, D. and Slusarenko, A. 1987. Plant gene expression in response to pathogens. *Plant Molecular Biology*. 9: 389-410.
- Coolier, H. 1963. Aspirin. *Scientific American* 209:193-200.
- Cram, W.J. 1984. Mannitol transport and suitability as osmoticum in root cells. *Physiol. Plant*. 61:396-404.
- Dekkers, A. J. Rao, A.N. and Goh, C.J. 1991. *in vitro* storage of multiple shoot cultures of gingers of ambient temperatures of 24-29°C. *Sci. Hortic (AMST)*. 47 (1/2): 157-168.

- Dodds, J.H. 1987. review of in vitro propagation and maintenance of sweet potato germoplasm. Report of the first sweet potato planning conference. CIP. 323-329.
- Dodds, K.S. 1962. Classification of cultivated potatoes. In D.S. Correll, Renner Texas Research Foundation, 517, 539 p.
- Doherty, H. Selvendran, R. and Bowles, D. 1988. The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxy-benzoic acids. Physiological and Molecular Plant Pathology. 33:377-384
- Ducreux, G. Rossignol, L. and Mathias Rossignol. 1986. La patata. Mundo Científico. 57:408-423.
- Espinoza, N., O., Estrada, R., Silva-Rodríguez, D., Tovar, P., Lizárraga, R. and Dodds, J.H. 1986. The potato: A model crop plant for tissue culture. International Potato Center. En: Outlook on agriculture. Pergamon Press. Great Britain. Vol. 15(1): 21-26.
- Espinoza, N., O., Estrada, R. Tovar, P., Bryan, J., Dodds, J.H. 1985. Cultivo de tejidos: micropropagación, conservación y exportación de germoplasma de papa. Documento de tecnología especializada 1. Centro Internacional de la Papa (CIP). 20 p.
- Espinoza, N. 1988. Los múltiples viajes y migraciones de la papa latinoamericano. Revista Latinoamericana de Papa. 1:7-8.
- Fernández, G.C. and y Lu, J.H. 1987. Current strategies for conservation of sweet potato germoplasm at AVRDC. Report of the first sweet potato planning conference, CIP. 323-329 p.
- Huaman, Z. 1986. Botánica sistemática y morfología de la papa. Boletín de información técnica 6. Centro Internacional de la Papa (CIP).

- Harris, P.M. 1978. The potato Crop. ed. Chapman and Hall. N.Y. Department of Agriculture and Horticulture Reading University. 324 p.
- Henshaw, G.G. 1982. tissue culture methods and germoplasm storage. Proc 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture Plant Tissue Culture.
- Henshaw, G.G. 1975. Technical aspects of culture storage for genetic conservation. In crop genetic resources for today and tomorrow. Ed. by H. Frankel and J.A. Hawkes. Cambridge. 349-358 p.
- Horton, D.E. 1988. Las papas en los países en desarrollo. Revista Latinoamericana de Papa. 1:9-17.
- IBPGR, 1982. Report of the first meeting of the IBPGR Advisory Committee on in vitro Storage. International Board for plant genetic resources, Rome, 20 p.
- IBPGR, 1983. Report of the first meeting of the IBPGR Advisory Committee on In vitro Storage. AGPG:IBPGR782/84. International Board for plant genetic resources, Rome, 11 p.
- IBPGR, 1987. Survey database of in vitro research. international board for plant genetic resources, Rome, 257 p.
- INTA, 1984. La papa. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Folleto, Balcarce Argentina, 5 p.
- Ireland, C.R. and Glowin, H.S, 1979. Are the in vitro effects of disalicylidonepropanediamine mediated by salicylaldehyde. Plant Physiol. 63: 1210: 1211.
- Jarret, R.I. and N. Gaweł. 1991. Chemical and environmental growth regulation of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) (Lam) in vitro.

- Kartha, K.K. 1981. Meristem culture and cryopreservation; methods and application. In plant tissue culture; Methods and application in agriculture, 181-211 p.
- Kumar, S. and Nanda, K.K. 1981. Effect of gibberelic acid and salicylic acid on the activities and electrophoretic patterns of alkaline and acid phosphatases during floral induction in Impatiens balsamifera Z. Pflanzphysiol. 101: 159-168.
- Larqué-Saavedra, A. 1975. Studies on hormonal aspects of plant growth in relation to chemical environmental treatments. Ph.D. Thesis. London University.
- Larqué-Saavedra, A. 1978. The antitranspirant effect of acetylsalicylic acid on Phaseolus vulgaris. Physiol plant. 43, 126-128.
- Larqué-Saavedra, A. 1979. Stomatal closure in response to acetylsalicylic acid treatments, Z. Pflanzphysiol. 93: 371-375.
- Leasch, N., Kaiser, W. and Urbach, W. 1979. Effects of disalicydenepropanediamines on photosynthetic electron transport of isolated spinach chloroplasts. Plant physiology. 63: 605-608.
- López, D.H. 1987. Efecto del ácido acetil salicílico de yemas de Solanum cardiophyllum (Lindl) cultivadas in vitro. Tesis maestría, Colegio de Posgraduados.
- López, D.H. 1988. Banco de germoplasma in vitro del programa de papa del Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Agric. Tec. Mex., 14 (1).
- López, D.H. y Carrillo, C.C. Efectos del ácido acetil salicílico (ASA) en fosfatasa de desarrollo de Solanum cardiophyllum. Ciencia Agronómica, Malaga, España. En revisión.

- Miranda, D., Van Kan, J., González-Jaen, M. and bol, J. 1990. Analysis of Regulatory Elements Involved in the Induction of Two tobacco Genes by Salicylate Treatment and Virus Infection. *The plant cell*, 2:357-366.
- Montaldo, A. 1984. Cultivo y mejoramiento de la papa. San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Mora, H.M. 1991. Efecto del ácido acetil salicílico en el crecimiento de yemas axilares de Solanum tuberosum cultivadas in vitro. Tesis licenciatura biólogo, Facultad de Ciencias U.N.A.M.
- Murashige and Skoog, F. 1962. Revised medium for rapid growth and Bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 15: 473-497.
- Petiard, V. and Bariaud-Fontanel, A. 1984. El cultivo de células vegetales. *Mundo científico*. 77:730-739.
- Pritchard, J., Jones Wyn R.G. and A.D. Tomos. 1991. Turger, growth and rheological gradients of wheat roots following osmotic stress. *J. Exp. Bot.* 42 (241):1043-1050.
- Roberts, E.H. 1973. Predicting the viability of seeds. *Seed Science and Technology* 1:499-514.
- Roberts, E.H. and M.W. Kings, 1982. Storage of recalcitrant seeds. INBS Serie B42. IUBS/IBPGR, Paris, 39-48 p.
- Roca, W.M., Chávez, R. Martin, M.L. and Arias, D.I. 1989. In vitro methods of germ-plasm conservation. National Research Council Canada. *Genome*, 31:813-817.
- Roggero, P. and Pennazio, S. 1988. Effects of Salicylate on Systemic Invasion of Tobacco Plants by Various Viruses. *J. Phytopatology* 123: 207-216.

- Saeedi, S., Gaillochet, J., Bonmort, J. and Roblin, G. 1984. Effects of Salicylic and Acetylsalicylic Acids on the Scotonastic and Photonastic Leaflet Movements of *Cassia fasciculata*. *Plant Physiol.* 76:851-853.
- SARR, 1990. Producción de papa en México, CONPAPA. Central de Abasto; D.F. Información directa 1990.
- Scowcroft, W.R. 1984. Genetic variability in tissue culture: Impact on germoplasm conservation and utilization. A technical report, Rome; IBPGR.
- Shapiro, S. 1986. Aspirin. *Science Digest.* June 51-55.
- Thompson, R.M., Douglas T.J., Sasamoto h. and Thorpe, A.T. 1986. Mannitol metabolism in cultured plant cells. *Physiol. Plant.* 67:365-369.
- Villalobos, V.M. 1987. The use of biotechnology in the conservation of tropical germoplasm. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE.
- Villalobos, V.M. and Abdelnour, A. 1989. Cryoconservation of *Musa* spp. and its potential for long-term storage of other tropical crops. CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- Vuyksteke, D.R. 1989. Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of musa germoplasm. IBPGR, Rome, 56 p.
- Weissmaann, G. 1991. Aspirin, *Scientific American.* 264:58-64.
- Westcott, R.J. 1981. Tissue culture storage of potato germoplasm. 2. Use of growth retardants. *Potato Research* 24. 343-352.
- White, R. 1979, Acetylsalicylic Acid (Aspirin) Induces Resistance to Tobacco Mosaic Virus in Tobacco. *Virology* 99, 407-410.

- Whiters, L.A. 1986. Cryopreservation and genebanks. In: M.M. Yeoman, (Ed.) Plant cell culture technology. Blackwell, Oxford, 96-140.
- Withers, L.A. 1985. Cryopreservation of cultured cells and meristems. In: I.K. Vasil, (Ed.), Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 2. Academic. Press, New York. 254-316 p.
- Withers, L.A. and Williams J.T. 1986. In vitro conservation. IBPGR, rome, 21 p.
- Withers, L.A. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation, AGP:IBPGR/80/8. IBPGR, Rome. 91 p.
- Withers, L.A., Wheelans, S.K., and Williams, J.T., 1990. In vitro conservation fo crop germoplasm and the IBPGR databases. IBPGR/FAO, Rome. Euphytica 45:9-22.
- Woolf, J.A. 1987. The potato in the human diet. Cambridge University. Press Cambridge.

VIII. APENDICE

Elementos mayores y menores del medio básico (Murashige-Skoog 1962).

Para dos litros de agua destilada

$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	33 gr
KNO_3	38 gr
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.8 gr
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	3.4 gr
$\text{H}_3 \text{BO}_3$	0.124 gr
$\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Mn SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.446 gr 0.338 gr
($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.122 gr
KI	0.0166 gr
$\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.005 gr
$\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0005 gr *
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0005 gr *

* Preparar previamente una solución concentrada de la siguiente manera: pesar 5 mg de cada una de estas dos sales y disolverlos en 10 ml de agua destilada y tomar 1 ml = 0.0005 gr.

Soluciones madre para preparar los medios de cultivo, utilizados en el Programa Nacional de Papa (recomendado por el CIP).

Mg SO₄ · 7H₂O

3.7 gr de Mg SO₄ se disuelven en 100 ml de agua destilada. Para preparar un litro de medio de cultivo se necesitan 10 ml de esta solución.

Hierro

-Na EDTA	0.745 gr
-Fe SO ₄ · 7H ₂ O	0.557 gr

El FeSO₄ · 7H₂O se disuelve en 20 cm³ de agua destilada; el Na₂ EDTA se disuelve en 20 cm³ de agua destilada a medida que se calienta. Se mezclan el Fe SO₄ · 7H₂O y el Na₂ EDTA, se deja enfriar y se agrega agua hasta completar 100 ml.

Tiamina

40 mg de tiamina- Hcl se disuelven en 100 ml de agua destilada. Para preparar un litro de medio de cultivo se necesita 1 ml de esta solución.

Inositol

1 gr de inositol se disuelve en 100 ml de agua destilada. Para preparar un litro de medio de cultivo se necesitan 10 ml de esta solución.

Acido Giberélico (GA₃)

10 mg de ácido giberélico se disuelve en KOH o alcohol (unas gotas) y se afora a 100 ml de agua destilada.

Acido Indolacético (AIA)

10 mg de AIA se disuelven con unas gotas de KOH y se afora en 100 ml de agua destilada.

Glicina

10 mg en 100 ml de agua destilada.

Acido Nicotínico

50 mg en 100 ml de agua destilada.

Piridoxina

50 mg en 100 ml de agua destilada.