



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA**

**EFFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO IN VITRO SOBRE  
EL POTENCIAL OSMOTICO Y LA SINTESIS DE PROLINA  
EN PAPA ( *Solanum spp.* ) L.**

**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 :  
**MA. AURELIA MALDONADO VELAZQUEZ**



**LOS REYES IZTACALA EDO. MEX.**

**ENERO DE 1994**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

Dedico esta tesis :

A mis padre: Carmen y Marcelino

Quienes desde mi nacimiento han cuidado de mi llenándome de amor y cariño, mostrándome el camino del deber, la responsabilidad y la esperanza.

Quienes han sabido encaminarme al éxito de mis metas apoyándome siempre en todo lo que hago.

Les dedico esta tesis tan esperada por ellos como el principal fruto que han cosechado dentro de mi agradeciendoles siempre los momentos tan felices que hemos pasado, el amor con que siempre me han educado pero sobre todo, el hecho de ser mis padres.

## AGRADECIMIENTOS

A mis hermanos Maricarmen, Rocío, Angeles y Luis, por el apoyo y cariño que me han dado siempre.

A el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la U.M.F. de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. U.N.A.M. en donde se realizó este trabajo.

A el Biol. Gerardo Ortíz Montiel por su incondicional asesoría, apoyo y amistad durante el desarrollo de esta tesis.

A el Dr. Alfonso Larqué Saavedra y al Biol. Rubén San Miguel Chávez del Laboratorio de Fisiología Vegetal del Colegio de Posgraduados por su colaboración y ayuda.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera participaron en mi preparación profesional.

La fe es el anhelo que DIOS mismo ha puesto en el ánimo del hombre para que el hombre le busque, le llame y le encuentre...la fe es camino y meta...DIOS

## I N D I C E

RESUMEN.....	i
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	6
2.1. LA PAPA.....	6
2.2. BIOLOGIA Y ECOLOGIA.....	7
2.3. CULTIVO DE TEJIDOS.....	9
2.4. AJUSTE OSMOTICO.....	13
2.5. POTENCIAL HIDRICO.....	14
2.6. PROLINA.....	17
III. OBJETIVOS.....	23
IV. MATERIALES Y METODOS.....	24
4.1. SELECCION DEL MATERIAL.....	24
4.2. OBTENCION DE PLANTAS IN VIVO.....	24
4.3. PROPAGACION IN VITRO.....	25
4.4. CONCENTRACION DE PROLINA.....	26
4.5. POTENCIAL OSMOTICO.....	26
4.6. CONTENIDO DE AGUA.....	27
4.7. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.....	27
4.8. ANALISIS ESTADISTICO.....	28
4.9. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	28
V. RESULTADOS Y DISCUSION.....	29
VI. CONCLUSIONES.....	47

VII. BIBLIOGRAFIA.....	50
VIII. APENDICE.....	59

## R E S U M E N

El cultivo de papa en México ha sido considerado como un cultivo potencial ya que es uno de los alimentos más importantes del mundo, después del arroz, trigo y maíz, en términos de producción. Dicho potencial incluye tanto materiales silvestres y materiales logrados a través de selección como materiales obtenidos a través de Centros de Cobertura Internacional. No obstante, el método convencional por sí solo, no es suficiente, por lo que se ha hecho necesario el manejo de nueva tecnología.

Actualmente el uso del cultivo de tejidos vegetales junto con las prácticas tradicionales, ha logrado grandes avances. Dicha técnica, considera que uno de los aspectos más importantes es el desarrollo de la composición de medios de cultivo óptimos para la especie en estudio.

La evaluación de las condiciones de dichos cultivos ha sido muy estudiada, sin embargo, se sabe poco acerca del efecto estresante que un medio de cultivo inadecuado, pueda causar a una planta en especial.

La presente investigación, fue realizada con el objeto de conocer el grado de estrés provocado por diferentes medios de cultivo (específicos para papa) en plantas de Solanum tuberosum var. Tollocan, utilizando como indicadores al contenido de prolina, potencial osmótico, contenido de agua, peso seco del tejido y presencia de diferentes órganos en las plantas desarrolladas.

En los medios de cultivo se utilizaron diferentes concentraciones de sales básicas, sacarosa y medios de soporte. Los periodos de incubación fueron de 15 y 30 días.

Los resultados obtenidos indicaron que el contenido de prolina, el potencial osmótico y el peso seco del tejido, presentaron una correlación positiva entre el contenido de sales y el contenido de sacarosa en el medio de cultivo. El contenido de agua por otro lado, disminuyó al incrementar la cantidad de sacarosa. La presencia de los diferentes órganos en las plantas desarrolladas, se vieron afectados por la cantidad de sacarosa y de sales básicas presentes en el medio. Finalmente los agentes solidificantes utilizados, influyeron ligeramente en las variables ya mencionadas.

Por lo anterior se llegó a la conclusión de que la concentración de sales básicas y la cantidad de sacarosa normalmente utilizadas en los medios de cultivo IN VITRO establecidos para papa, provocan en mayor o menor grado un estado de estres en la planta.

## I. INTRODUCCION

La problemática que afronta el mundo actual, al incorporar anualmente millones de individuos a su población, hace posible contemplar cualquier posibilidad que pueda actuar como recurso potencial para incrementar los rendimientos y mejorar la calidad de las especies vegetales comestibles y de los productos derivados (Espinoza y col. 1984, Maldonado 1982 y Sosa y Villareal 1978).

Entre los cultivos importantes económica y socialmente en México, se encuentra la papa por considerarse un alimento con una alta calidad nutricional (Flores 1969 y Maldonado 1982).

Las especies silvestres mexicanas de papa, forman parte del amplio y complejo género Solanum L. las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en ambos hemisferios, entre los 15 y 32 grados latitud norte y entre los 1500 y 3800 metros de altitud; se les puede encontrar en climas tropicales, secos y templados y en suelos rocosos o de textura arenosa o arcillosa (Flores 1969 y Sosa y Villareal 1978).

La importancia de la papa como alimento es fundamental, ya que es altamente nutritiva y puede producir rápidamente energía y proteínas. En países desarrollados, se le ha dado a la papa múltiples usos, desde alimentos bajos en grasa y sodio, alimentos en forma de frituras, alimento para animales y hasta combustible (Bajaj 1987 y Maldonado 1982).

Es conocida la dificultad cada vez mayor para lograr avances en la rama de la alimentación de manera tradicional, por lo que la Biotecnología, a través del cultivo de tejidos y la manipulación

genética IN VITRO. trabaja para encontrar respuestas a las demandas específicas y satisfacer las necesidades de la población, proporcionando grandes beneficios en la propagación vegetal (Op. cit.).

El cultivo de tejidos vegetales comprende técnicas para la propagación de nuevas plantas en un medio artificial bajo condiciones asépticas, a partir de células, tejidos u órganos de una planta; presentando ventajas principalmente, en plantas económicamente importantes y como modelos en estudios bioquímicos, fisiológicos, morfológicos y genéticos, entre otros.

Estas técnicas, se han vuelto prácticas y sus aplicaciones se refieren a:

- Cultivo de meristemos.
- Cultivo de anteras, polen y óvulos.
- Cultivo de callos.
- Cultivo de células en suspensión.
- Cultivo de protoplastos.
- Neoformación de órganos.
- Embriogénesis somática.

Las condiciones requeridas para establecer un cultivo, presentan una gran importancia (Baja 1987, Espinoza y col. 1984 y Maldonado 1982).

• En condiciones naturales, las plantas necesitan tomar del suelo, iones inorgánicos en menores o mayores cantidades, conocidos como macronutrientes (nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio y

azufre) y micronutrientes (fierro, manganeso, zinc, boro, cobre, molibdeno y cobalto), no obstante, en condiciones IN VITRO, el medio de cultivo no solo está formado por macro y micro nutrientes, sino que contiene, carbohidratos (sacarosa), y compuestos orgánicos como vitaminas, aminoácidos y reguladores del crecimiento, cuya adición en diferente concentración sugiere mejores resultados (López 1985 y Ochoa 1985).

Las distintas especies vegetales presentan diferentes requerimientos nutricionales para un crecimiento óptimo, de manera que es difícil encontrar un medio de cultivo satisfactorio de uso general, cuya composición esté dada en función del conocimiento de la fisiología de la especie con respecto a su nutrición.

La elección adecuada de los componentes del medio de cultivo permite al tejido, una mejor disponibilidad de agua y nutrientes, la cual está además en relación a factores tales como: agentes solidificantes, pH, intercambio gaseoso, potencial hídrico, etc. (Boccon 1986 y Ochoa 1985).

De manera que muchos investigadores, utilizan diferentes diluciones de los medios básicos ya establecidos (principalmente sales básicas MS 1/2, 1/3 y 1/4 de su concentración total) en estudios de propagación vegetal. (George y Sherrinton 1984).

En general cuando el inóculo (tejido u órgano) utilizado, tiene un tamaño adecuado (del orden de 0.5 cm o más), contiene sustancias (hormonas, aminoácidos, etc.) suficientes como para continuar el desarrollo al principio del cultivo; no obstante, en un medio

diferente al óptimo. su desarrollo posterior indica que se está realizando un ajuste osmótico como parte integral del crecimiento celular en plantas superiores. (Boccon 1986 y Handa 1983).

• Por lo que si una planta (tejido, órgano o células) en condiciones IN VITRO, es mantenida en un medio diferente al óptimo, sufre cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos como resultado de alteraciones en la tasa fotosintética y de respiración, condición de turgencia y efectos en el potencial hídrico de la célula. (Ahmad 1988, Cram 1984, Fricke 1990 y Singh y Paleg 1972)

La correlación positiva entre la presencia de estrés (hídrico, salino, congelación, etc.) y la acumulación de diferentes solutos se ha demostrado principalmente para aminoácidos libres, siendo una de las más importantes, la acumulación de prolina. Dicha acumulación, ocurre básicamente en el citoplasma y se basa en las propiedades particulares de estos solutos, (alta solubilidad en agua, no tóxica en altas concentraciones (superiores a 1 M) y estables en membranas y proteínas). Se ha observado con mayor frecuencia que los niveles de prolina parecen cambiar drásticamente durante el ajuste osmótico, en algunas especies vegetales como es el caso de la papa, pudiendo representar el evento metabólico más altamente regulado durante un estado de estrés o adaptación.\*

El potencial hídrico del medio de cultivo juega un papel muy importante en el desarrollo del sistema, pues de éste dependerá la disponibilidad de los componentes para el tejido y por consiguiente determinará si se presenta un grado de estrés en el mismo. (Debergh 1981)

Así, estos eventos pueden ser considerados para evaluar el grado de estrés que pueden representar diferentes medios de cultivo, donde la composición del mismo no ha sido cuidadosamente seleccionada en función a los diferentes factores antes mencionados, de manera que el ajuste osmótico, sería para el tejido, una de las mejores opciones de adaptación.

Por lo anterior, es claro que índices tales como el contenido de prolina, el potencial osmótico y el contenido de agua principalmente, son importantes para evaluar la presencia de estrés en micropropagación en relación a la composición del medio de cultivo utilizado.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. LA PAPA

La papa. (Solanum tuberosum, L.) es uno de los alimentos más importantes del mundo, después del arroz, trigo y maíz en términos del total de la producción de alimentos; surge y se domestica en los Andes, donde al igual que el maíz, constituyó el cultivo básico para el asentamiento de los incas y de diversas culturas locales. Se introduce en Europa a fines del siglo XVI y en Norteamérica a mediados del siglo XVIII. En México, al igual que en otros países, la papa es considerada como un cultivo potencial. (Bajaj 1987, Maldonado 1982, Martínez 1990 y Sosa 1978).

Su valor radica en la capacidad de producir más energía y proteínas por unidad de superficie que cualquier otro alimento, contiene uno de los mejores balances de aminoácidos esenciales, (principalmente lisina) y la combinación y forma química en la que los minerales están presentes, es disponible para los humanos. Es principalmente consumida como fuente de carbohidratos en lugar de arroz y trigo; es de fácil digestión, puede ser consumida por ancianos y niños, y es utilizada como alimento para cerdos. El alcohol preparado de papa posee una porción considerable de energía nutricional, además de que se emplea para producir alcohol combustible. El carácter que presenta la papa en el contenido bajo de sodio y alto de potasio, en contraste con el trigo, arroz, huevo y proteínas animales (los cuales son ácidos); la hace útil en la

alimentación de personas con problemas de presión sanguínea alta y en problemas de cálculos renales. (Bajaj 1987, Maldonado 1982 y Sosa 1978).

En los últimos 150 años la papa se ha desarrollado tanto en regiones templadas, como en regiones tropicales y subtropicales del mundo. (Bajaj 1987 y Martínez 1990).

México es, en el continente americano, uno de los centros más importantes de origen de especies tuberíferas del género Solanum por lo que puede considerarse como un banco natural de germoplasma. La distribución de las especies tuberíferas del género Solanum L. en nuestro país, ha sido dada por diversos autores (Bukasov 1930 y 1933, Correl 1962, Hawkes 1966 y Flores 1969), ya que pocos son los estados de la República en los que no se hayan encontrados estas especies. (Flores 1969 y Sosa 1978 )

El potencial existente en México, incluye el material silvestre, el material logrado a través de selecciones realizadas durante un periodo no menor de 25 años y el material obtenido a través de Centros de Cobertura Internacional entre los que destaca el Centro Internacional de Papa. (Sosa 1978)

## 2.2. BIOLOGIA Y ECOLOGIA

La papa es una planta anual de 30 a 100 cm de altura, presenta flores con ovario ínfero que dan lugar a una baya de dos cavidades (lóculo) con numerosas semillas muy pequeñas (1450 a 1750 semillas)

que solamente pesan 1 g.: la planta puede ser propagada por semilla o por tubérculo (vegetativamente). (Bukasov 1966, Beukema y Van Der Zaag 1979, Ludmila Gorbatenko, Arzuaga y Ana Estévez 1986 reportados por Martínez 1990)

El tamaño de los tubérculos, difiere según la edad y el cultivo: estos se desarrollan cuando la planta florece y su crecimiento cesa cuando la formación del fruto comienza. (Bajaj 1978)

El cultivo se adapta a diferentes regiones agroecológicas del país, donde se siembra en asociación con maíz, produciendo buenos rendimientos. (Bukasov 1960 y 1966 citado por Martínez 1990, Maldonado 1982 y Sosa 1978).

El cultivo tradicional de papa es una tarea difícil, ya que involucra, la selección, el cruzamiento para recombinación y la mutación. (Bajaj 1987)

El Centro Internacional de Papa en Lima (Perú), ha realizado diversos trabajos relacionados con la colección, almacenamiento, mejoramiento y distribución del germoplasma de papa; sin embargo, el método convencional para el cultivo por si solo no es suficiente; por lo que estas prácticas combinadas con los avances biotecnológicos han permitido la inducción de diversidad genética y de nuevas variedades mejoradas. (Bajaj 1987 y Martínez 1990)

### 2.3. CULTIVO DE TEJIDOS

Por muchos años, la Biotecnología ha estado al servicio de la industria alimenticia logrando avances en aspectos tales como color, sabor, textura, adaptación ambiental, cambio en el contenido de vitaminas, palatabilidad, relación proteínas/carbohidratos y en la producción en campo. (Bajaj 1987)

Actualmente, la tecnología IN VITRO y las prácticas tradicionales del cultivo de papa, han permitido la producción comercial de semillas libres de virus (microtubérculos), el almacenamiento de germoplasma a través de criopreservación y a través de la producción de "semillas sintéticas", la manipulación genética por medio de cultivo de células y la recombinación del ADN como una vía para mejorar la calidad nutricional e incrementar la energía del cultivo. Así, la inducción de variabilidad genética ha implicado la producción de futuras papas nuevas. Algunos avances y prospectos enfocados al cultivo de papa, son enumerados a continuación:

1. Plantas libres de virus.
2. Propagación a través de microtubérculos.
3. Haploides y fácil relación de variedades.
4. Mutación IN VITRO.
5. Somaclones para producción de nuevas variedades.
6. Híbridos somáticos y cybridos.
7. Resistencia a tizón temprano y tardío.
8. Resistencia a la roña común.

9. Resistencia a virus y nemátodos.
10. Resistencia a herbicidas.
11. Resistencia a heladas, sequías y suelos adversos.
12. Alta nutrición de papa.
13. Papa para energía combustible..
14. Bibliotecas de ADN y clones.
15. Conservación de germoplasma.
16. Semillas sintéticas para almacenamiento.
17. Intercambio de germoplasma internacionalmente.
18. Tecnología postcosecha.

(Bajaj 1987 y Espinoza 1984).

El medio de cultivo ha sido uno de los aspectos más importantes desde el inicio de estas nuevas técnicas. En 1860 y 1861 se descubrió que las sustancias más importantes absorbidas por las plantas, eran los compuestos inorgánicos, lo que llevó a la elaboración de un componente básico de los medios de cultivo conocido como sustancia nutritiva o solución Knops. (Beauchesene 1986 y Espinoza 1984).

En esa época, la mayoría de los experimentos al respecto utilizaban principalmente la solución de Knops como medio básico, junto con otros componentes como sacarosa, extractos de levadura y cisteína; por lo que desde 1935 cuando se conocieron las condiciones del crecimiento ilimitado de células homogéneas, aparecieron numerosas investigaciones en las que se observaron mejoras en función a una rápida división celular, una mayor velocidad de crecimiento y mejores componentes de los medios de cultivo. (Espinoza 1984 y López 1985).

En 1936 Robbins, estudió el efecto de los microelementos inorgánicos y señaló que el Zinc, Magnesio y Boro eran necesarios para el cultivo de ápices radicales. (Espinoza 1984).

Para 1962, Murashige y Skoog, propusieron la composición del medio de cultivo para obtener una mayor velocidad de crecimiento en células de Nicotiana tabacum IN VITRO. (López 1985).

A partir de que se conocieron los efectos del extracto de levadura sobre las células cultivadas IN VITRO, muchos investigadores comenzaron a buscar sustancias orgánicas que presentaran efectos en la morfogénesis. (Op. cit.).

En esta década, otro evento muy significativo fue el descubrimiento de las cualidades nutricionales del endospermo líquido del coco, en 1941, este extracto natural, fue rápidamente adaptado por otros investigadores; de manera que la combinación de sustancias reguladoras del crecimiento con agua de coco, mostró un sorprendente efecto en el crecimiento de tejidos cultivados de diferentes plantas entre las cuales se encontraban la zanahoria y la papa. (López 1985 y Ochoa 1985).

Actualmente, en muchas investigaciones se utiliza el medio básico MS en diferentes diluciones (un medio, un tercio y un cuarto de su concentración total); con la finalidad de encontrar una concentración adecuada para el desarrollo de las diferentes especies en base a los requerimientos de las mismas.

En relación a el medio de soporte se tiene que en 1945 Muir y colaboradores, encontraron que al utilizar medios de cultivo líquidos en agitación se producía una suspensión de células que podía propagarse a través de subcultivos. (López 1985)

Más tarde, se continuó con el desarrollo de estudios sobre los medios líquidos, para la obtención de masas celulares genéticamente homogéneas, células clonales a partir de células individuales, obtención de algunos mutantes y aspectos fisiológicos y bioquímicos en cultivos masivos. (Op. cit.).

Melcher y Bergman (1959) investigaron los efectos del abastecimiento de aire, el control del pH, la remoción del medio de cultivo y otros aspectos. (Op. cit.).

White en 1976 y Miller y Murashige en 1976, observaron que cambios en la consistencia del medio de cultivo puede controlar la diferenciación o influir en la propagación de las plantas. (Debergh 1981).

En 1977 Quoirin y Lepoivre realizaron cambios en las concentraciones de macronutrientes, reduciendo así la frecuencia de turgencia del tejido a nivel microscópico. (Op. cit.).

Thorpe y colaboradores, en 1980, reportaron que los carbohidratos en los medios de cultivo, son necesarios para los altos requerimientos de energía en los procesos de formación de meristemoides y primordios, además de enfatizar el papel osmoregulador por parte del contenido de carbohidratos en la diferenciación de yemas. (Op. cit.).

En el mismo año, Thorpe y Brown, llegan a la conclusión de que los callos formados a partir de tallos, presentan diferentes potenciales hídricos en comparación a los callos formados a partir de tejidos diferentes al tallo; sí mismo, Thorpe y colaboradores,

reportaron la influencia de los carbohidratos del medio de cultivo en el sistema productor de yemas adventicias y Debergh en 1981 en el desarrollo de yemas axilares. (Op. cit.).

Mas tarde, en 1981, Debergh reporta que dentro de los componentes del medio de cultivo, la utilización de los medios líquidos y las concentraciones inadecuadas de los agentes solidificantes producen diferentes efectos en el tejido, así, observa cambios en el color, longitud y turgencia del tejido principalmente en etapas de iniciación, elongación y propagación, presentando un efecto negativo en la tasa de propagación. (Op. cit.).

Las investigaciones antes mencionadas, han realizado numerosas aportaciones en las principales condiciones nutricionales para el crecimiento de células, tejidos y órganos en condiciones IN VITRO.

#### 2.4. AJUSTE OSMOTICO

El ajuste osmótico se ha estudiado desde hace mucho tiempo, como una parte integral del crecimiento celular en plantas superiores, sobre todo bajo condiciones de resistencia a estrés hídrico y salino. La importancia del ajuste osmótico es mantener el crecimiento bajo diferentes circunstancias de estrés. (Cram 1984, Handa y col. 1983, Moore 1981 y Rodas y col. 1986).

El uso de células en cultivos vegetales, ha permitido caracterizar cuidadosamente los procesos celulares y bioquímicos del crecimiento en respuesta a varios cambios osmótico en el medio. (Sangita 1983).

El mantenimiento de la actividad fisiológica en células individuales y en plantas completas, depende básicamente de la relativa constancia de un número de condiciones, una de las cuales es el balance hídrico adecuado. Cuando en una parte del curso normal del desarrollo de una planta existe un inadecuado suplemento de agua, la planta como consecuencia reduce su contenido de agua, la tasa de desarrollo y en general, la tasa de todas sus funciones vitales; si la reducción del agua es extremadamente prolongada, la desecación llega a ser letal. (Moore 1981).

## 2.5. POTENCIAL HIDRICO

En las células vegetales se pueden observar las dos características esenciales de un sistema osmótico; por un lado, las soluciones o el agua pura están separadas o aisladas por una membrana que restringe tanto el paso de partículas de solutos como de solvente y por otro, existe realmente una presión dada por la rigidez de la pared celular. Así, en la mayoría de las células maduras de tejidos vegetales la vacuola juega un papel muy importante en el balance osmótico celular; ya que contienen usualmente una solución acuosa de sales inorgánicas, azúcares, ácidos orgánicos, proteínas, etc., que actúan cuando hay cambios en las concentraciones de las soluciones de ambas partes ya mencionadas. (Kramer 1974 y Moore 1981).

Como la actividad fisiológica de la estructura celular es dependiente principalmente de los niveles de hidratación, expresada como el potencial químico del agua; el movimiento del agua de célula a célula y de tejido a tejido, está básicamente controlado por un potencial químico más que por un gradiente osmótico. (Jeréz 1986 y Kramer 1974).

El potencial hídrico, conocido en términos de energía como calorías/mol, generalmente se expresa en términos de presión (bars) y se define como la diferencia de la energía libre o potencial químico por unidad de volumen molal entre el agua pura y el agua en la célula a la misma temperatura. (Kramer 1974 y Moore 1981).

Así, el potencial hídrico de una planta en condiciones IN VITRO, puede ser incrementado (menos negativo) por el desarrollo de la turgencia y por el incremento en la temperatura, o reducido (más negativo) por la adición de solutos al medio de cultivo, por las fuerzas mátricas que absorben agua, por las presiones negativas (tensiones) y por la reducción en temperatura en su entorno. (Moore 1981, Jeréz 1986 y Slavik 1974).

En un medio de cultivo IN VITRO, el contenido de sales, los carbohidratos y la concentración de agar, influyen en el potencial hídrico del mismo, de manera que en un medio con agar, el potencial de presión no existe, el potencial osmótico está dado por los solutos (carbohidratos y sales minerales principalmente) y el potencial mátrico es la contribución de los coloides (agar). (Dembergh 1981)

Se ha señalado que el déficit hídrico produce severos efectos en el crecimiento vegetal, encontrándose cambios en las variables de longitud de tallo, longitud radical, número de flores, número de hojas, espacio entre nudos y producción de materia seca, velocidad de alargamiento celular, cambios en la actividad enzimática, actividad del ARN y ADN, síntesis de proteínas, entre otros, aunque de diferente manera, como respuesta a un mismo grado de estrés; así, la elongación de la hoja es más sensible al déficit hídrico que la fotosíntesis, siendo afectada de gran manera por potenciales hídricos bajos. (Jeréz 1986 y Sigh 1973).

La actividad del agua en las células, la reducción de la presión de turgencia, los cambios de la reducción de espacios intermembranas y orgánulos que resultan en una reducción de volumen, el efecto en la concentración de sales al disminuir el volumen, la alteración en la estructura de las macromoléculas a causa de la deshidratación y la acumulación de metabolitos dan como resultado una disminución del crecimiento. (Jeréz 1986).

En relación a la respiración y la fotosíntesis, algunos investigadores han observado que la deficiencia de agua en la planta afecta a la mayoría de las reacciones químicas involucradas; se sabe que la respiración presenta un incremento anormal inicial seguido de una súbita caída producto del mal funcionamiento de las mitocondrias; para la fotosíntesis, se tiene que la tasa fotosintética de una planta (equivalente a la producción de biomasa) declina bajo estrés hídrico, a causa del cierre estomatal y de los efectos en los

procesos del cloroplasto. En general, la producción de biomasa parece ser directamente proporcional al abastecimiento y uso de agua. (Kramer 1974 y Jeréz 1986)

Otro efecto del déficit hídrico es la reducción de reguladores del crecimiento, tales como la citocinina en la exudación radicular y el incremento del ácido abscísico en las hojas, afectando la síntesis de proteínas y el cierre estomático, respectivamente. (Jeréz 1986).

Los compuestos nitrogenados solubles juegan un papel muy importante y esencial en el metabolismo vegetal bajo condiciones de estrés. En muchas especies vegetales, la disminución en la cantidad de agua trae como consecuencia cambios en la concentración y composición de la fracción de compuestos de nitrógeno solubles, particularmente cambios en el contenido de prolina. (Ahmad y Hellebust 1988, Hellergren y Li 1981, Levy 1983, Singh y col. 1972, Stewart 1978, Stewart 1981, Stewart y Boggess 1978 y van Swaaij y col 1987).

## 2.6. PROLINA

El significado fisiológico de los cambios en la concentración de prolina en plantas en estrés hídrico no se conoce con exactitud, sin embargo, se considera ya sea como un síntoma o como una consecuencia de la reducción en la cantidad de agua en la planta; representando un mecanismo compensador para la mejor sobrevivencia vegetal, argumento basado en el papel de la prolina como un regulador

osmótico, un protector de la desnaturalización de enzimas, un reservorio de nitrógeno, una fuente de carbono y un estabilizador del mecanismo de la síntesis de proteínas. (Ibarra 1988, Jeréz 1986, Singh 1973, Stewart 1981 y Widholm 1987).

El papel de la prolina en la resistencia a estrés está también correlacionado con la capacidad de las especies, variedades o ecotipos y la capacidad de resistencia. Al respecto, muchos autores han reportado que algunas especies vegetales muestran sustanciales incrementos en la acumulación de prolina libre cuando son sometidas a estrés hídrico, mientras que en otras hay poca o ninguna acumulación de esta. En la mayoría de las plantas en las que ha sido estudiada esta acumulación, se ha observado como respuesta a un estrés hídrico severo y es usualmente acompañada por un marchitamiento visible; los niveles de prolina encontrados han sido mayores a 200 veces el presente en plantas no estresadas, teniendo que reducciones del potencial de la hoja de -10 a -15 bars son necesarios antes de cualquier acumulación. (Ibarra 1988 y Stewart 1981).

Singh y colaboradores en 1972, observaron que la presencia de prolina parecía estar en función de los diferentes órganos vegetales como resultado de las diferentes condiciones hídricas en la planta.

Hellergren y Li en 1981, trabajaron con cultivo de células de papa (*Solanum tuberosum*) sometidas a bajas temperaturas, y observaron el papel de la prolina y de la sacarosa como crioprotectores, tanto en su producción como en su aplicación exógena.

Los incrementos en la acumulación de prolina libre en tubérculos de algunos cultivares de papa, observaron diferente susceptibilidad en cultivares no resistentes a sequía y en cultivares resistentes a esta, llevando a la conclusión de la importancia de las variedades. (Levy 1983), por lo que en 1985, se estudió la correlación positiva entre los niveles de prolina y la tolerancia a congelación en varios genotipos de papa. (van Swaaij y col. 1985).

Más tarde, en 1988, Ibarra y colaboradores, estudiaron la acumulación de prolina en diferentes variedades de maíz bajo condición de sequía, observando que esta acumulación, no parece ser un indicador de resistencia a sequía sino un síntoma de esta, y que además, la biosíntesis de prolina, está influenciada por la presencia de cloroplastos y el desarrollo sistémico de la planta.

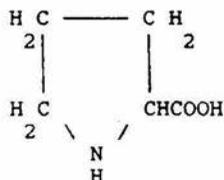
Corcuera y colaboradores, en 1989, estudiaron el metabolismo de la prolina en células en suspensión de Solanum tuberosum bajo condiciones de estrés, obteniendo que los cambios en el microambiente del citoplasma acuoso, probablemente alteran la eficiencia de la cadena de reacciones multienzimáticas involucradas en la biosíntesis de prolina. (Corcuera y col. 1989).

En 1990 se observa el efecto del estrés hídrico en la compartimentalización de prolina en vacuolas de células de papa en cultivo, apreciando una correlación negativa entre el contenido total de prolina celular y su porcentaje en las vacuolas, tanto para cultivos estresados como para no estresados. (Fricke y Pahlich 1990).

En 1991, se observa nuevamente la correlación entre el potencial osmótico y los niveles de prolina en la selección de líneas celulares resistentes a congelación en trigo. (Tantau y Karl 1991).

Por lo anterior se puede pensar que los incrementos en el contenido de prolina, utilizados como un indicador de condiciones adversas en plantas, pueden servir también como estimadores del grado de estrés provocado por composiciones no adecuadas de medios de cultivo en condiciones IN VITRO.

En cuanto a la química de la prolina se sabe que posee una estructura cíclica, el átomo de nitrógeno en posición alfa se encuentra en el anillo, por lo que no es una amida primaria. (Jeréz 1987).

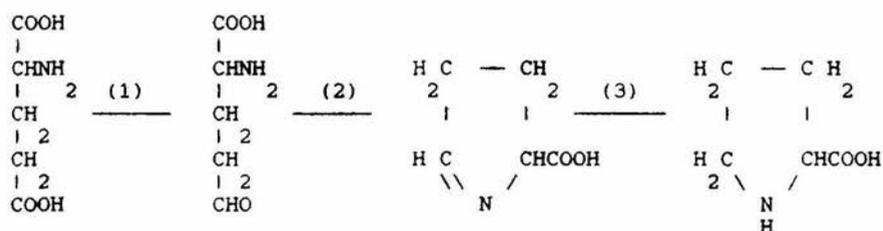


L-PROLINA

La biosíntesis de prolina en plantas es similar a la de procariotes, plantas inferiores y animales, donde de manera resumida, el glutamato es convertido por la glutamato-kinasa y la deshidrogenasa a glutamato semialdehído (1), el que espontáneamente es convertido a pirrolina-5-carboxilato (2). La pirrolina-5-

carboxilato a su vez es convertida a prolina por la pirrolina-5-carboxilato reductasa (3), sin embargo, la primer reacción no ha sido caracterizada aun en plantas superiores. (Thompson 1980 y Widholm 1987).

#### SINTESIS DE PROLINA A PARTIR DE AC. GLUTAMICO



En plantas superiores, la principal vía biosintética de prolina ha sido localizada en el cloroplasto, aunque también se ha encontrado una vía citoplásmica en algunas especies. (Stewart 1981).

Con respecto a la degradación de la prolina, se cree que se lleva a cabo en la mitocondria; existiendo evidencias de que su concentración está regulada por: 1) el cierre de las relaciones metabólicas entre la prolina y el ácido glutámico, 2) su propia síntesis, y 3) la tasa de oxidación, pues la oxidación de la prolina es inhibida por los carbohidratos en varias plantas superiores (Bogges y col. 1976, Dougall 1965, Thompson 1980 y Widholm 1976).

El proceso de oxidación, parece estar relacionada con la acción de la enzima prolina-oxidasa que puede disminuir la acumulación de prolina y con la pirrolin-deshidrogenasa activa, que puede oxidar a

la prolina para llegar a formar una vez más ácido glutámico. Estas enzimas, se encuentran en la mitocondria, y son importantes en la aceleración de los mecanismos por los que la planta acumula prolina bajo condiciones de estrés. (Barnard y Oaks 1970, Corcuera y col 1989, Durzan y Ramaiah 1971, Jeréz 1987, Stewart 1972 reportados por Mazelis 1980, Stewart y Boggess 1978, Thompson 1980 y Widholm 1976).

## III. OBJETIVOS

Tomando en cuenta el contexto anterior, se planteo el siguiente objetivo general:

-Evaluar la presencia de estrés en plantas de papa Solanum tuberosum var. Tollocan propagadas en diferentes medios de cultivo IN VITRO, considerando como indicadores a el contenido de prolina, el potencial osmótico, el contenido de agua y el peso seco del tejido.

Para el logro del objetivo general se proponen los siguientes objetivos particulares:

-Propagar en condiciones IN VITRO, plantas de papa Solanum tuberosum var. Tollocan, a partir de yemas.

-Determinar la concentración de prolina, el potencial osmótico y el peso seco de plantas de papa propagadas en diferentes medios de cultivo a diferentes periodos de incubación.

-Determinar el potencial osmótico final de los medios de cultivos utilizados para la propagación de las plantas de papa. y

-Evaluar la presencia de diferentes órganos en las plantas desarrolladas.

## V. MATERIALES Y METODOS

### 4.1. SELECCION DEL MATERIAL

Para la realización del presente trabajo, el tejido vegetal de papa Solanum tuberosum var. Toluacan (tubérculos) fue proporcionado por la empresa "Gota de Vida" Toluca. México.

Los reactivos utilizados fueron: Ac. sulfosalicilico, Ac. Indolacético, Agar, Cinetina, 6-Dimetil-aminopurina (2ip), Fitagel, L-prolina, Mio-inositol, Ninhidrina, Sacarosa y Medio Murashige y Skoog (M5519) marca Sigma Chem. Co. Missouri, U.S.A

### 4.2. OBTENCION DE PLANTAS IN VIVO

La siembra de los tubérculos en suelo, fue bajo condiciones de invernadero (26-28 grados, 45-80 % de humedad relativa y 200-300 umoles por metro cuadrado por segundo). Las plantas obtenidas se utilizaron a los 30 días después de la siembra para la propagación IN VITRO.

#### 4.3. PROPAGACION IN VITRO

Para la propagación IN VITRO, se aislaron yemas axilares, las cuales fueron desinfectadas y sembradas en medio de cultivo según lo establecido por Wang y Huang 1975.

Una vez propagadas, se continuó con la siembra de las plantas en los diferentes tratamientos; la composición del medio básico Murashige y Skoog (1962) fue utilizada en la concentración total y diluida a un medio, complementado con las diferentes concentraciones de sacarosa y medios de soporte como se muestran en el diseño experimental.

Las condiciones de incubación fueron:

Temperatura de 20 a 25 grados.

Iluminación de 25\_+5 micromoles por metro cuadrado por segundo, producida por lámparas fluorescentes marca Phillips (40 W).

Fotoperíodo de 8 horas luz y 16 oscuridad.

Las evaluaciones fueron realizadas a los 15 y 30 días después de la siembra en los diferentes tratamientos.

Para las plantas en condiciones de invernadero, se realizaron las siguientes evaluaciones a los 30 días después de la siembra de tubérculos.

#### 4.4. CONCENTRACION DE PROLINA.

La determinación de la concentración de prolina; fue realizada mediante el método colorimétrico, el cual consistió en macerar el material vegetal con ácido sulfosalicílico al 3%, filtrarlo y hacer reaccionar este filtrado con una solución de ninhidrina y ácido acético en baño maría para posteriormente leer en el espectrofotómetro a 520 nm de longitud de onda (Bates L. S. y Waldren R. R. en 1973).

#### 4.5. POTENCIAL OSMOTICO.

Para la evaluación del potencial osmótico, se utilizó un microvoltímetro marca Wescor INC. modelo HR-337 (método que se basa en el equilibrio de vapor), en cuya cámara se colocó un pequeño círculo de papel filtro humedecido con el extracto del tejido para finalmente tomar la lectura después de 20 min. de incubación (Jeréz 1986).

La transformación de los datos de microvolts a Bars. se realizó mediante la siguiente formula:

$$\frac{\mu\text{volts}}{- 0.75 \mu\text{volts} / \text{Bar}} = - \text{Bars}$$

#### 4.6. CONTENIDO DE AGUA.

El contenido de agua del tejido, se obtuvo mediante la determinación del peso fresco (peso inicial) y el peso seco del tejido (peso final) utilizando una balanza semianalítica Ohaus.

El tejido fue pesado en fresco y posteriormente secado en una estufa a 60 C durante 48 horas para obtener el valor del peso seco del mismo.

El contenido de agua se obtuvo mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ DE CONTENIDO DE AGUA} = \frac{\text{PESO FRESCO} - \text{PESO SECO}}{\text{PESO FRESCO}} \times 100$$

(Moore 1981)

#### 4.7. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.

Las características morfológicas evaluadas fueron:

Presencia de órganos. Para la presencia de los diferentes órganos (tallo, raíz y hoja), se elaboró una clave en función al tamaño y número de los mismos. (Ver apéndice).

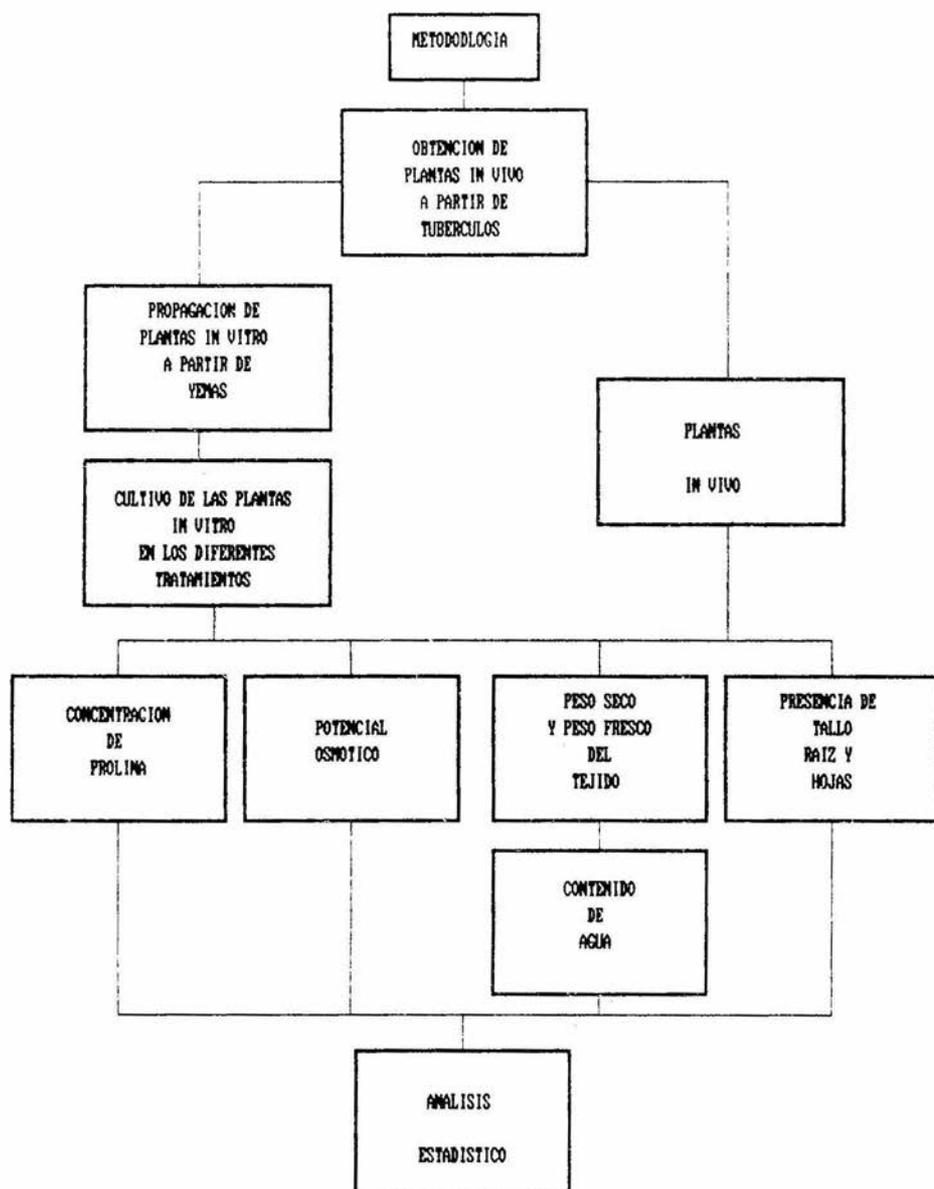
De acuerdo a los datos obtenidos, se realizaron análisis de varianza para dos factores con 3 y 6 niveles. Para estimar la diferencia entre las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de Duncan de comparación de promedios con rango multiple y un nivel de significancia de 0.05. Para los resultados cualitativos de presencia de órganos, se realizó un análisis de varianza por rangos de Friedman. (Daniel 1985)

El trabajo se realizó bajo un arreglo bifactorial cruzado al azar. El número de repeticiones para cada tratamiento fue de tres unidades (frasco con una fracción de tejido).

## 4.9. DISEÑO EXPERIMENTAL

	SACAROSA 5 g/l	SACAROSA 20 g/l	SACAROSA 60 g/l
PAPEL FILTRO	1	7	13
AGAR 6 g/l	2	8	14
AGAR 8 g/l	3	9	15
AGAR 10 g/l	4	10	16
FITAGEL 1 g/l	5	11	17
FITAGEL 2 g/l	6	12	18

NOTA: Los números indican los diferentes tratamientos. Las concentraciones utilizadas, fueron seleccionadas en base a lo reportado para los diferentes medios de cultivo en micropropagación de papa (Espinoza y col. 1984 y Estrada 1982).



CONCENTRACION DE PROLINA μmol/g P.S.	8.890
POTENCIAL OSMOTICO (BARS)	6.700
CONTENIDO DE AGUA (%)	89.740
PESO SECO DEL TEJIDO (g)	0.010

TABLA 1. RESULTADOS DE LAS DIFERENTES VARIABLES PARA LA PLANTA EN CONDICIONES IN VIVO  
(CONDICIONES DE INVERNADERO) PROMEDIO DE 10 REPETICIONES.

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados encontrados se muestran en las gráficas 1 a 13 y representan el comportamiento de las diferentes variables, tanto para los tratamientos en los que se utilizó medio básico MS en su concentración total como para los tratamientos en los que la concentración se utilizó diluida, para los 15 y 30 días de incubación.

Se pudo observar de manera general que las variables de contenido de prolina, potencial osmótico y peso seco del tejido, incrementaron de manera simultánea, mientras que el porcentaje de contenido de agua disminuyó al incrementar el contenido de sacarosa en el medio de cultivo (en relación al comportamiento de la planta en condiciones IN VIVO ver tabla 1).

Los niveles del contenido de prolina fueron en todos los casos superiores al observado para la planta en condiciones IN VIVO (condiciones de invernadero, 0.090  $\mu\text{mol}$  de prolina por g de peso seco); encontrando que el valor más alto fue 43 veces mayor al antes mencionado (3.895  $\mu\text{mol/g}$  peso seco) y correspondió al tratamiento en el que se utilizaron sales básicas MS en su concentración total, 60 g de sacarosa por litro de medio y fitagel 2 g/l a los 30 días de incubación. (Figura 1). Tal concentración de prolina se correlacionó con un valor para potencial osmótico del tejido de -10.6 bars y un potencial osmótico del medio de cultivo de -9.3 bars (Figuras 5 y 6), valores muy superiores al observado para la planta IN VIVO (-6.7 bars).

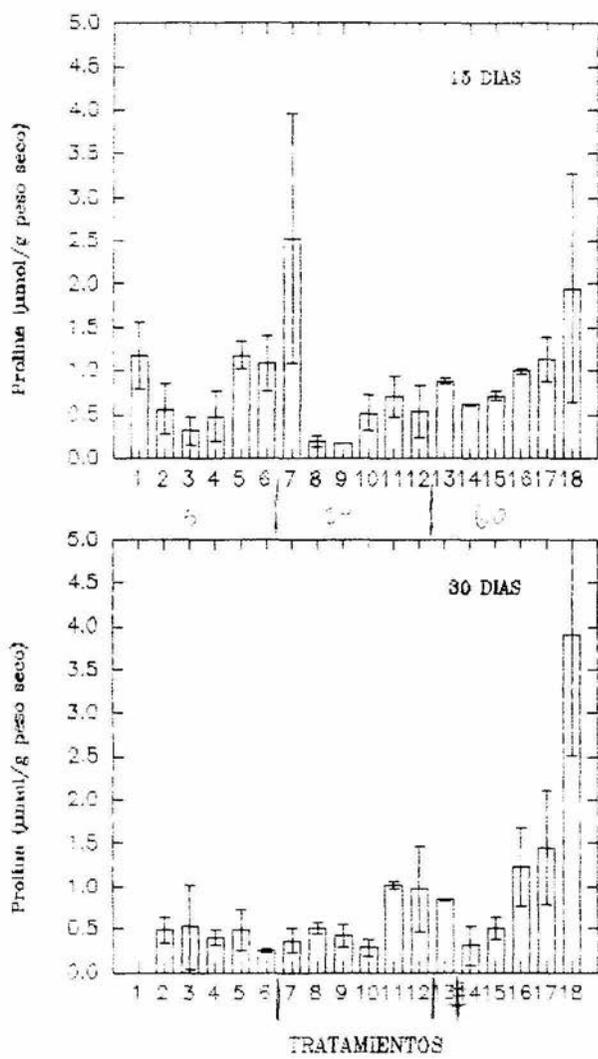
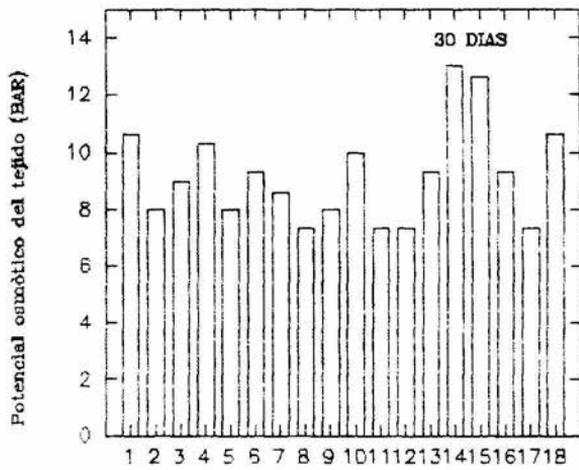
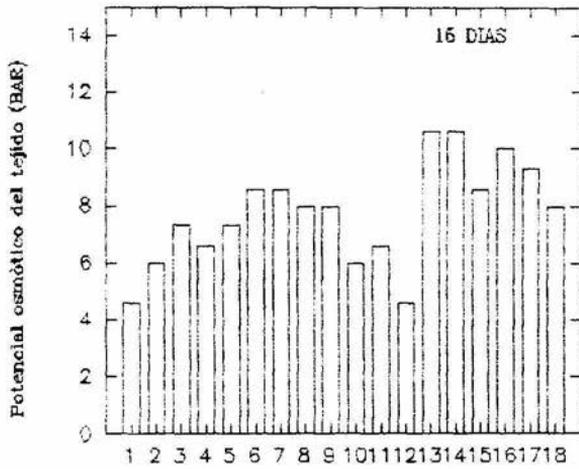


Figura 1. Contenido de prolina para los tratamientos con sales básicas MS totales (promedio de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estandar).



TRATAMIENTOS

Figura 5. Potencial osmótico del tejido para los tratamientos con sales básicas MS totales (resultado de una observación).

Las concentraciones más bajas de prolina (0.160  $\mu\text{mol}$  por g de peso seco) y por lo tanto cercana a la encontrada para la planta IN VIVO, fueron para los tratamientos en los que se utilizaron sales básicas MS diluidas a 1/2 de su concentración total y 5 g de sacarosa; siendo en promedio el doble del presentado para la planta IN VIVO (Figura 2). Para estos casos, el potencial osmótico del tejido presentó un rango entre -4.6 y -7.6 bars, rango dentro del cual podemos encontrar el potencial osmótico registrado para la planta IN VIVO (-6.7 bars); Así mismo, el potencial osmótico del medio de cultivo para estos tratamientos fue de -3 bars en promedio. (Figura 7 y 8).

Para los tratamientos con 20 g de sacarosa en el medio, el contenido de prolina fue superior al presentado por la planta IN VIVO indistintamente de la concentración de sales básicas y del agente solidificante (Figura 1 y 2). El potencial osmótico registró valores superiores a -10 bars como en el caso del tratamiento con sales MS diluidas y papel filtro como soporte a los 15 días de incubación y valores cercanos a -4 bars, cuando se utilizó fitagel 2 g/l en el medio de cultivo para sales MS totales y MS diluidas, 15 y 30 días respectivamente; tales condiciones correspondieron a un contenido de agua superior a 92 %.

El comportamiento antes señalado entre el contenido de prolina y el potencial osmótico del tejido para el total de los tratamientos utilizados en este trabajo, es semejante al observado en cultivo IN VITRO bajo condiciones de estrés en muchas especies vegetales, entre

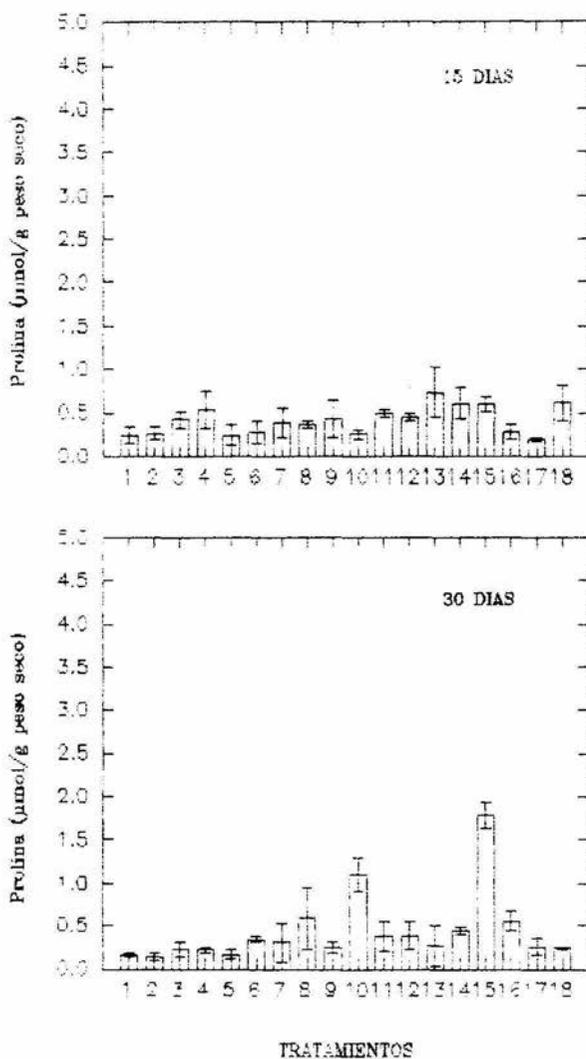


Figura 2. Contenido de prolina para los tratamientos con sales básicas MS diluidas (promedio de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estandar)

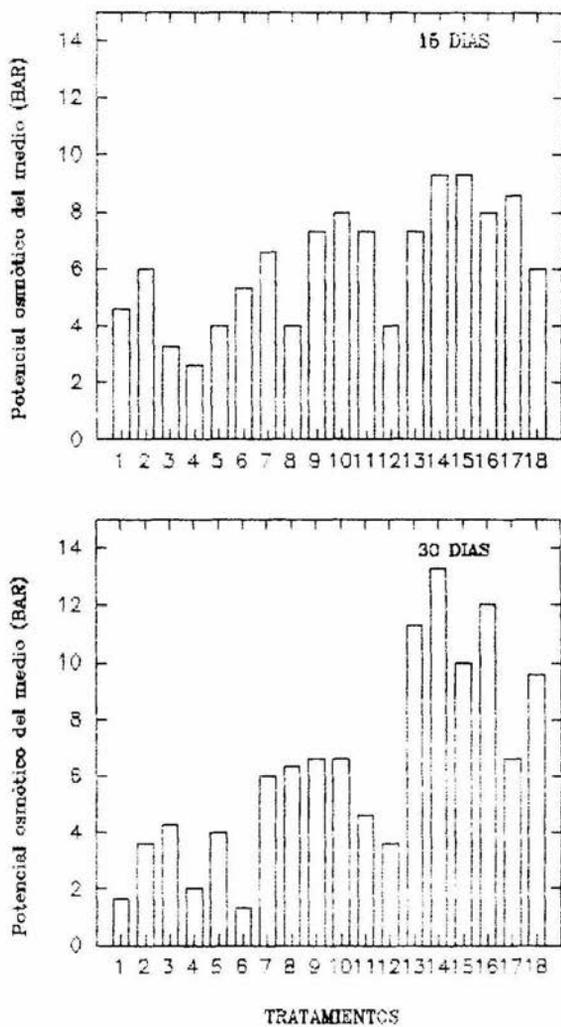


Figura 7. Potencial osmótico del medio de cultivo para los tratamientos con sales básicas MS totales (resultado de una observación).

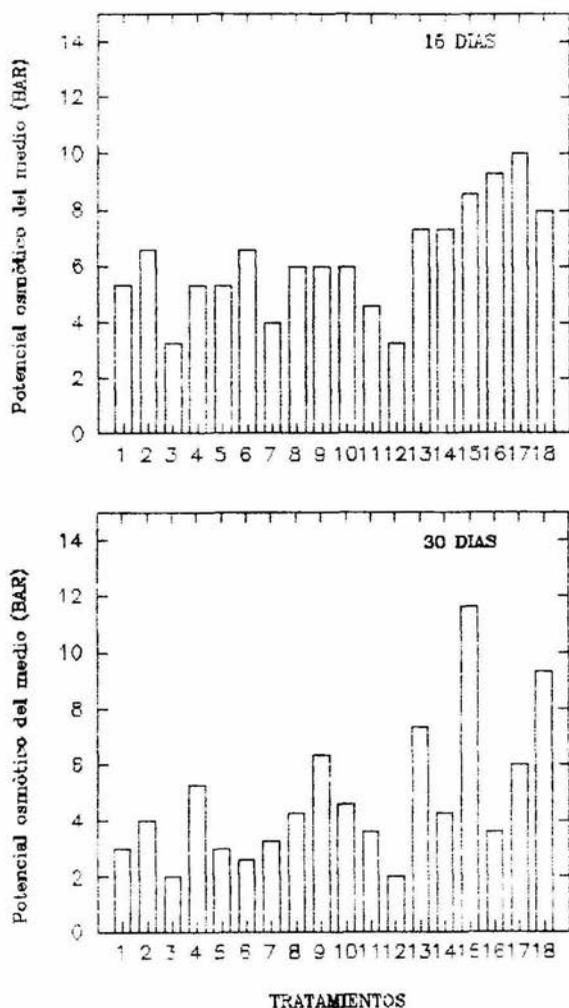


Figura 8. Potencial osmótico del medio de cultivo para los tratamientos con sales básicas MS diluidas (resultado de una observación).

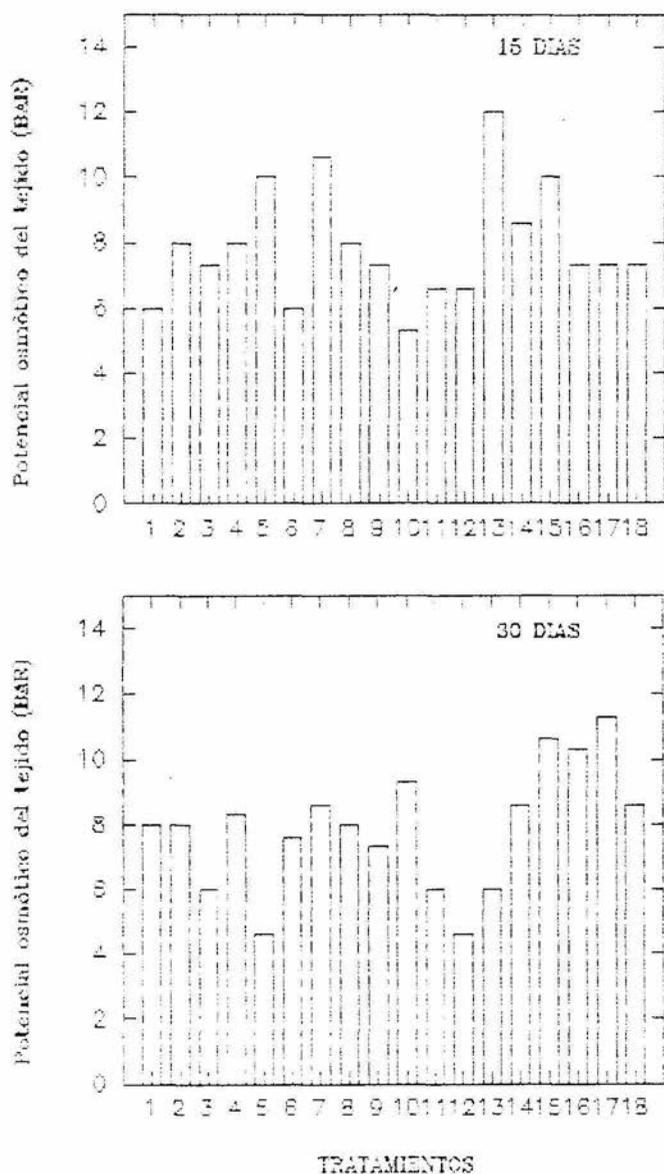


Figura 6. Potencial osmótico del tejido para los tratamientos con sales básicas diluidas (resultado de una observación).

ellas Solanum tuberosum ( Chen y col. 1979, Corcuera y col. 1989, Fricke y Pahlich 1990, Helligren y Li 1981, Nowak y Colborne 1989 y van Suaaij y col. 1987, ), pues se ha demostrado que la disminución en el potencial hídrico del tejido (más negativo) trae como consecuencia cambios en la concentración y composición de la fracción de nitrógeno soluble marcados particularmente en el contenido de prolina (Singh y col. 1972, Stewart y Larher 1980 y Thompson 1980). Lo anterior indicaría, que posiblemente la planta en condiciones IN VITRO, está sujeta a una disminución del potencial hídrico, dado por el incremento en el potencial osmótico del medio de cultivo.

En algunas especies se sabe que es necesaria una reducción del potencial del tejido de -10 a -15 bars antes de cualquier acumulación de prolina observada, y que dicho contenido de prolina disminuye al restaurar la condición hídrica. (Thompson 1980). Además, se han reportado que una progresiva acumulación de prolina es acompañada por una caída del potencial hídrico del tejido. Algunos de los límites más bajos del potencial encontrados como respuesta a esta condición, son: para cebada -7 bars, para algodón -12 bars y para sorgo -24 bars (Lea P 1985).

Dichos incrementos en los niveles de prolina fueron sugeridos inicialmente por Measures en 1975 y han sido estudiados por muchos autores, lo que ha permitido trabajar la acumulación de prolina como una expresión cuantitativa de la resistencia a estrés en plantas cultivadas y en este caso para la presencia de estrés en condiciones IN VITRO. (Ahmad y Hellebust 1988). Todo esto apoyado en la especulación de que la acumulación de prolina representa un mecanismo

compensador para una mejor supervivencia de la planta, jugando un papel importante como regulador osmótico (Aspinall y Paleg 1981), protector de la desnaturalización de enzimas (Paleg, Stewart y Bradbeer 1984), reserva de nitrógeno y fuente de carbono (Fukutaku y Yamada 1984) y como un estabilizador del mecanismo de síntesis de proteínas (Kardpal y Roal 1985, Levy 1983 y Stewart y Lorhel 1980).

El incremento del contenido de prolina como respuesta a estres, es asociado también con la capacidad de las especies, variedades o ecotipos, por lo que se han registrado para algunas especies en condición de estres, niveles mayores a 200 veces el presente en plantas no estresadas, mientras que en otras especies, las acumulaciones son tan bajas como 5  $\mu\text{mol}$  de prolina por g de peso fresco en hojas de algodón en estres osmótico. (Thompson 1980).

En relación al periodo de incubación para el contenido de prolina, no se observaron diferencias marcadas entre los 15 y 30 días ni para los tratamientos con sales MS totales ni para los tratamientos con sales MS diluidas como puede verse en las figuras 1 y 2.

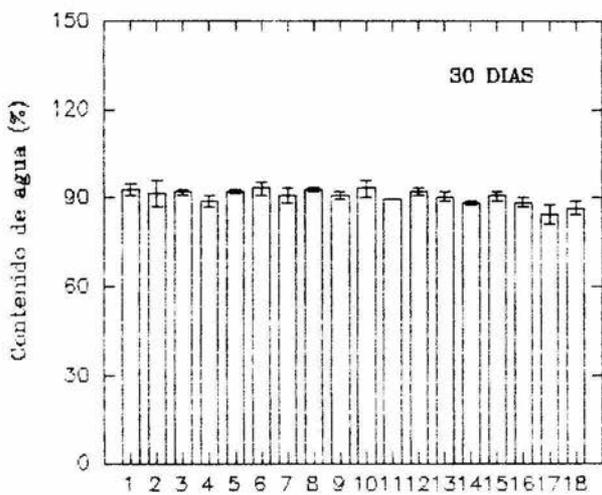
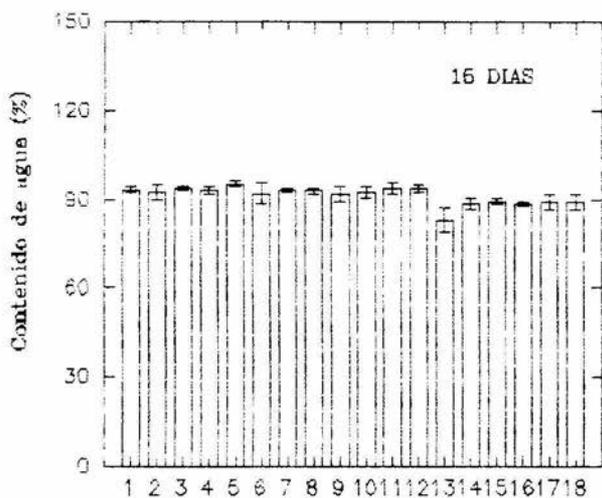
El comportamiento de los resultados obtenidos a los 15 y 30 días de incubación parecen ser explicadas por lo reportado acerca de que la acumulación de prolina es una condición que se atribuye a una adaptación específica de las células a bajos potenciales hídricos, es así que en la mayoría de las plantas cultivadas en las que se ha estudiado la acumulación de prolina, esta ocurre únicamente como respuesta a un estado de estres hídrico, usualmente acompañado de un

marchitamiento visible, no obstante en algunas especies se requieren además de periodos prolongados de estres para poder detectar acumulación de prolina. (Handa y col. 1983, Ibarra 1988).

Por lo que, nuestros resultados pueden considerarse como una respuesta a un estado de estres hídrico no tan severo como para producir marchitamiento visible pero si suficiente como para producir una acumulación de prolina superior a la de una planta en condiciones de invernadero (IN VIVO).

En relación al cultivo de papa, se sabe que existe una correlación positiva entre el incremento de prolina y la tolerancia a estres (hídrico, salino y de temperatura) en diferentes genotipos (Corcuera y col. 1989, Tantau y Dörffing 1991 y van Suaaij 1985,1986,1987), lo que apoyaría la suposición de que las concentraciones de sacarosa de 20 y 60 g y el uso de sales básicas MS en su concentración total en el medio de cultivo, podrían propiciar un estado de estres en mayor o menor grado en el cultivo IN VITRO de papa.

El contenido de agua presentó una disminución del 95 al 83 % en el total de los tratamientos, a medida que se incrementó la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, presentando diferencias significativas (0.05) principalmente entre los tratamientos con 5 y 60 g de sacarosa, como puede verse en la figura 3 y 4, donde los valores más altos ( 94 y 95 %) fueron para los tratamientos con concentraciones de 5 g de sacarosa mientras que los más bajos o el menor contenido de agua (83 %) lo fue para las concentraciones de 60 g de sacarosa por litro de medio. De manera



TRATAMIENTOS

Figura 3. Contenido de agua (%) para los tratamientos con sales básicas MS totales. (promedio de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estandar).

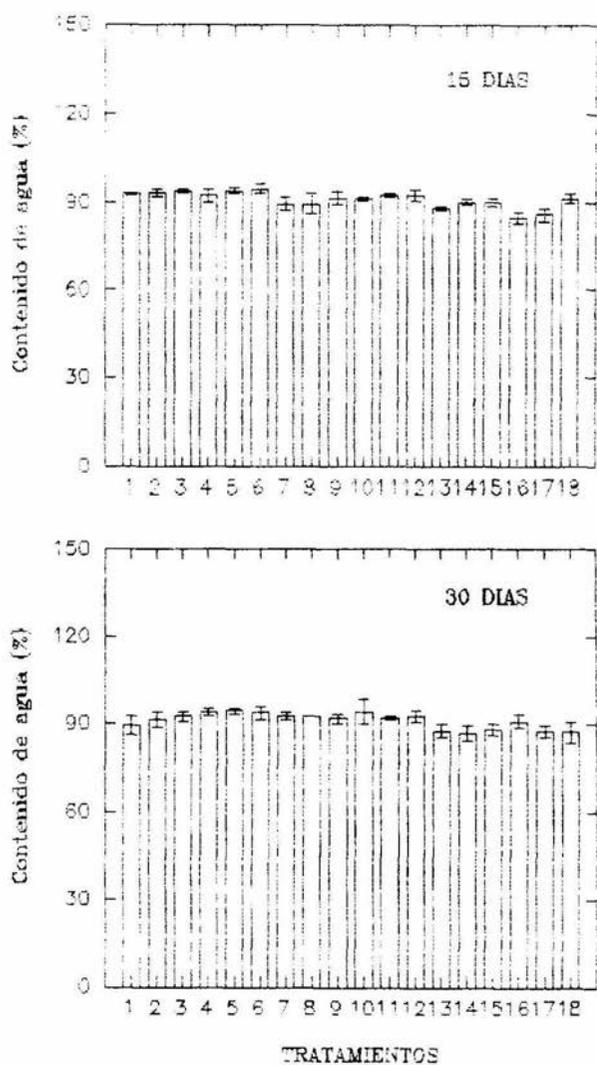


Figura 4. Contenido de agua (%) para los tratamientos con sales básicas MS diluidas (promedio de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estandar).

contraria en las figuras 9 y 10, podemos observar que el peso seco del tejido presentó una reducción de 0.025 g a 0.005 g (por planta) a medida que el contenido de sacarosa disminuyó en el medio de cultivo. El valor máximo encontrado para peso seco (0.025 g) correspondiente a un contenido de agua de 87 % aproximadamente, y se presentó para el tratamiento con sales básicas MS diluidas, sacarosa 60 g /l y fitagel 1 g/l a los 30 días de incubación, mientras que el valor mínimo de 0.005 g correspondió a un promedio de contenido de agua de 93 %, y se presentó en varios tratamientos en los cuales se utilizó 5 g de sacarosa indistintamente de la concentración de sales básicas MS utilizadas y el periodo de incubación (Figura 10).

Las altas concentraciones de sacarosa y de sales minerales en el medio de cultivo en relación al contenido de prolina y el contenido de agua en los resultados anteriores, parece representar un estado de estrés para la planta en condiciones IN\_VITRO, si tomamos en cuenta lo observado por Ibarra 1988 y Kramer 1974 en algunas variedades de maíz sometidas a estrés, donde el contenido de agua de las plantas probadas disminuyó de 88 % a 76 % aproximadamente, incrementando de manera simultánea el contenido de prolina de 10 a 20 veces el normal, por lo que el contenido de agua relativo del tejido, puede considerarse como un buen estimador del estado hídrico de las plantas.

Por otro lado, los resultados mostrados en relación al peso seco del tejido observaron un ligero incremento a medida que la concentración de sacarosa aumentó en el medio de cultivo, contrario a lo que podría esperarse si se sabe que: el peso seco del tejido en

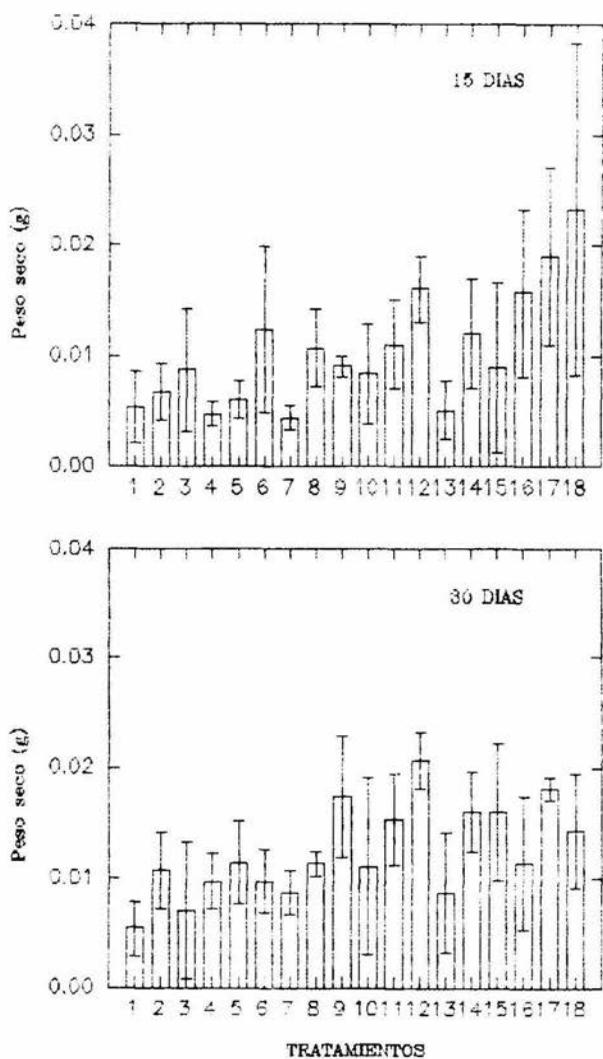


Figura 9 Peso seco (g/planta) para los tratamientos con sales básicas MS totales (promedio de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estandar).

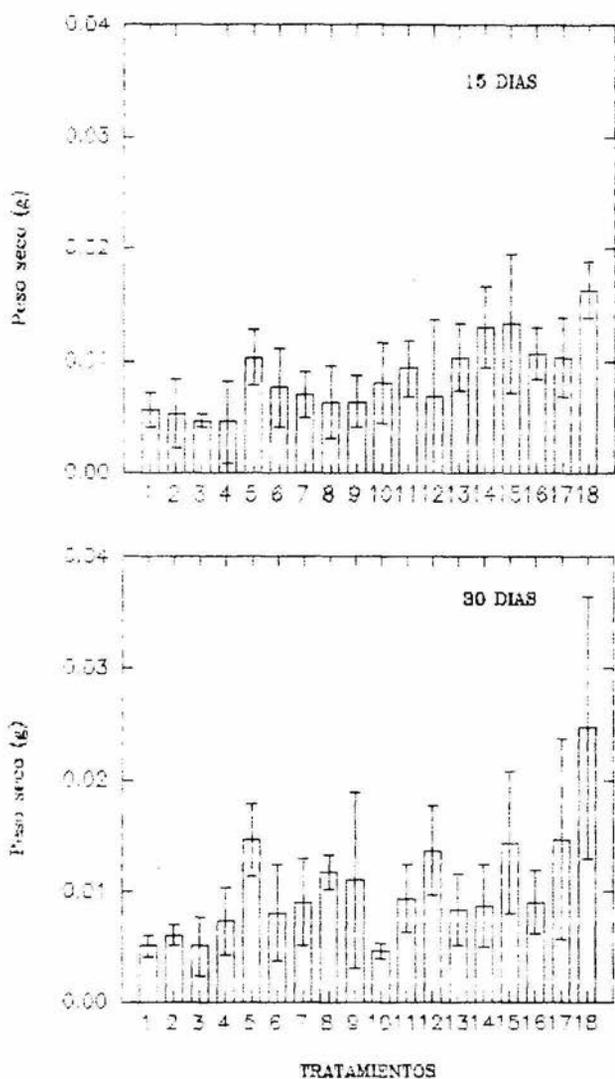


Figura 10. Peso seco (g/planta) para los tratamientos con sales básicas MS diluidas (promedio de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estandar).

plantas sometidas a estrés se relaciona con la producción de biomasa (tasa fotosintética) declina bajo condiciones de estrés hídrico a causa del cierre estomatal y de los efectos en el déficit hídrico en los procesos del cloroplasto. En general la producción de biomasa es directamente proporcional al abastecimiento y uso de agua, lo que hace a la medida del contenido hídrico de la planta una parte importante para la comprensión de la producción de biomasa, conjuntamente con la consideración de la cantidad de agua disponible para la planta (Kramer 1974). Es así que la acumulación de materia seca no solo se atribuye a la tasa fotosintética sino también a la turgencia, al potencial hídrico del tejido y a la formación neta de proteínas a partir de aminoácidos. (Singh 1972).

Se sabe además del efecto de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo sobre el peso seco del tejido, en cultivo de embriones de cebada, donde se observa un incremento en el peso seco del tejido al incrementar la concentración de sacarosa (a 12 %) y la longitud de los tallos de algunas variedades es mayor en concentraciones de 6 y 9 % de sacarosa que en 3 %, siendo el contenido de agua de las plantas desarrolladas inversamente proporcional a los niveles de sacarosa. (Dunwell 1981-6).

Aunado a lo anterior, se ha reportado, que el peso seco de raíces de algunas especies cultivadas en medio MS incrementa cuando los niveles de sacarosa son de 90 g/l pero disminuye dramáticamente con 150 g/l; por otro lado, el peso fresco de bulbos incrementa a medida que las sales MS se modifican de 1/8 a 2 veces su concentración normal. (Takayama y Misawa 1979).

Por lo anterior se explica que en los resultados presentes, el incremento de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo se relacione con un incremento en el peso seco del tejido y no con una disminución como podría esperarse.

No obstante, el comportamiento de esta variable, también puede apoyarse con lo reportado por Singh y Paleg (1972) acerca de que el peso seco del tejido cambia en función al órgano, de manera que el peso seco de hojas de plantas estresadas disminuye mientras que en el tallo continúa incrementando en un rango pequeño durante periodos de estrés para finalmente encontrar que en la raíz el rango de incremento del peso seco es muy cercano al presentado por la planta control, respuesta que se atribuye a los diferentes potenciales hídricos presentes en la planta, lo que lleva a suponer que los cambios en el peso seco del tejido, no refleja totalmente la importancia del comportamiento del crecimiento vegetal en un periodo de estrés. (Singh y Paleg 1972). En base a esto se justificaría que las plantas de los tratamientos en los que se utilizó sales básicas MS en su concentración total y 60 g de sacarosa muestren un incremento en el peso seco por presentar tallos y raíces gruesas.

Finalmente, se ha observado que en cultivares de papa Alpha resistentes a sequía, la acumulación de materia seca en tubérculos también se debe a la naturaleza y mecanismos propios del cultivar. (Levy 1983).

La correlación entre las variables antes mencionadas y los agentes solidificantes presentaron diferencias significativas (0.05) principalmente para los tratamientos en los que se utilizó agar en una concentración de 10 g y fitagel 1 y 2 g por litro de medio con las diferentes concentraciones de sales básicas en combinación con 5 y 60 g de sacarosa, como puede verse en las diferentes figuras (1 a 13), es decir, el contenido de prolina y el peso seco del tejido fueron de manera general superiores para los tratamientos que además de contener 60 g de sacarosa contenían los agentes solidificantes antes mencionados así mismo el contenido de agua disminuyó marcadamente para dichos tratamientos; por el contrario, los tratamientos con las dos concentraciones de fitagel y agar 10 g pero con 5 g de sacarosa presentaron los valores de prolina, peso seco y contenido de agua más cercanos a los presentados por la planta en condiciones IN VIVO.

El agente solidificante en el medio de cultivo, juega un papel muy importante en cuanto al potencial hídrico del mismo, por lo que es un factor determinante para la diferenciación y propagación del tejido, pues se ha observado que al incrementar la concentración de agar la disponibilidad de citocininas se reduce y el rango de propagación se ve afectada. (Brown 1979, Chandler 1987 y Debergh 1981).

La concentración de agar utilizada comúnmente en cultivo de tejidos, está entre 0.5 y 1 %, no obstante, algunos autores han estudiado los efectos de la concentración de los agentes

solidificantes utilizados en micropropagación, pues se ha observado que al utilizar concentraciones inadecuadas de agar en el medio de cultivo se presentan alteraciones en el color del tejido (llegando a ser translúcido y más tarde necrótico), manifestaciones de pronunciadas elongaciones en hojas turgentes (alcanzando hasta seis veces el tamaño de las hojas normales) y a nivel histológico hojas que no presentan tejido en empalizada sino únicamente mesófilo esponjoso; todos estos daños son observados principalmente en las etapas de iniciación, elongación y propagación. (Debergh 1981)

La reducción progresiva del crecimiento a medida que la concentración de agar se incrementa se ha reportado en algunas especies, aunado a que la proliferación y producción de tallos mejora en niveles bajos de agar y cuando se utilizan puentes de papel filtro como soporte. (Davis y col. 1977 y Singh 1982). Además el crecimiento de callos, es generalmente menor en medio sólido que en medio líquido. (George y col. 1984).

Entre las diferencias observadas entre marcas y tipos de solidificantes en cuanto a crecimiento, incrementos en vigor y peso seco del tejido; se tiene que el vigor y el peso seco de ápices de clavel, fueron mejorados en agar Difco purificado y no en agar Difco Noble. Por otro lado, Banks-Izen y Polito (1980) notaron que el crecimiento de callos de algunas especies es menor cuando se utiliza Bacto-agar que cuando se utiliza Fitagel. (Debergh 1982, George y col. 1984 y Skirvin 1981).

Tal comportamiento del crecimiento debido al efecto del agar, ha sido atribuido a la disponibilidad de ingredientes (minerales y reguladores del crecimiento principalmente) del medio para el tejido en agar que en cualquiera de los casos será reducido en comparación con un cultivo en agitación (Debergh 1981), ya que se sabe que el potencial hídrico del medio con agar, es menor (más negativo) que su equivalente líquido; condición particularmente responsable de la respuesta morfo genética que ocurre preferentemente en agar (Debergh 1981).

Por lo anterior, los resultados obtenidos, podrían significar por un lado, que el cultivo de papa var. Tollocan, no presentó gran susceptibilidad a los diferentes agentes solidificantes utilizados y que por otro lado la concentración de los diferentes agente solidificantes no fue en extremo incrementada como para poder percibir alteraciones en la propagación de este cultivo, siendo más notable la influencia de las concentraciones de sales y sacarosa utilizadas.

Las evaluaciones del porcentaje en el que los tallos, hojas y raíces se presentaron en las diferentes plantas obtenidas, se realizó únicamente a los 30 días de incubación y en base a la clave del apéndice 1.

En la figura 11, podemos observar que para la concentración de 5 g de sacarosa en el medio de cultivo, las plantas presentaron tallos ramificados mayores a 1 mm de diámetro cuando se utilizaron sales básicas diluidas, agar 10 g/l y fitagel 1 g/l y sales básicas totales

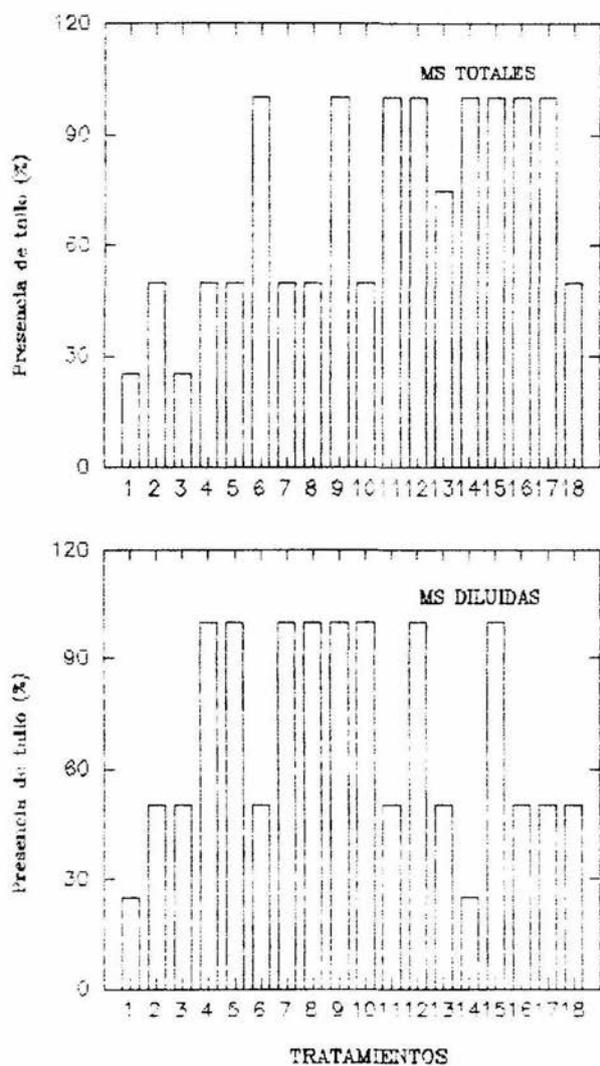
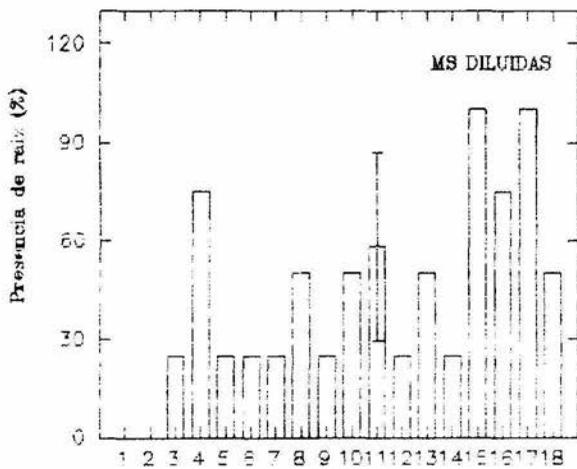
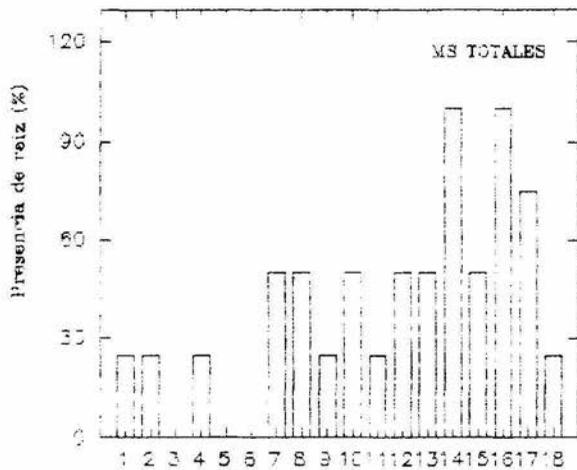


Figura 11. Presencia de tailo para los diferentes tratamiento a 30 días de incubación (promedio de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar).

con fitagel 1 g/l; tallos ramificados menores a 1 mm de diámetro en la mayoría de los tratamientos y finalmente tallos delgados no ramificados para los tratamientos con papel filtro, presentando diferencias significativas (0.03) respecto a los agentes solidificantes. Los porcentajes de presencia de hojas en este caso, no presentaron diferencias para la concentración de sales pero si presentaron diferencias significativas (0.03) para el agente solidificante utilizado, observando que la presencia de hojas en las plantas fue desde ausencia como es el caso del tratamiento con sales totales y 8 g de agar en el medio hasta hojas abundantes (más de 10 hojas) de medianas (de 3 a 5 mm de longitud) a grandes (más de 5 mm de longitud) para los tratamientos con agar 6 y 10 g/l y fitagel 1 g/l (Figura 13). En la figura 12, podemos observar que la presencia de raíz fue marcadamente menor que para 20 y 60 g de sacarosa indistintamente de la concentración de sales básicas y los agentes solidificantes utilizados, llegando a presentar plantas sin raíz o con raíces de menos de 1 mm de diámetro poco abundantes en los tratamientos con sales MS totales en combinación con agar 8 g/l y fitagel 1 g/l y en los tratamientos con sales diluidas con papel filtro y 6 g de agar como solidificante y por último, plantas con raíces delgadas pero abundantes cuando en el medio de cultivo se utilizaron sales diluidas y agar 10 g/l.

En su mayoría, los tallos gruesos (más de 1 mm de diámetro) y ramificados se obtuvieron en los tratamientos con 20 g de sacarosa en combinación con sales básicas diluidas en el medio de cultivo y tallos delgados (menores a 1 mm de diámetro) y ramificados para los



TRATAMIENTOS

Figura 12. Presencia de raíz para los diferentes tratamientos a 30 días de incubación (promedio de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar).

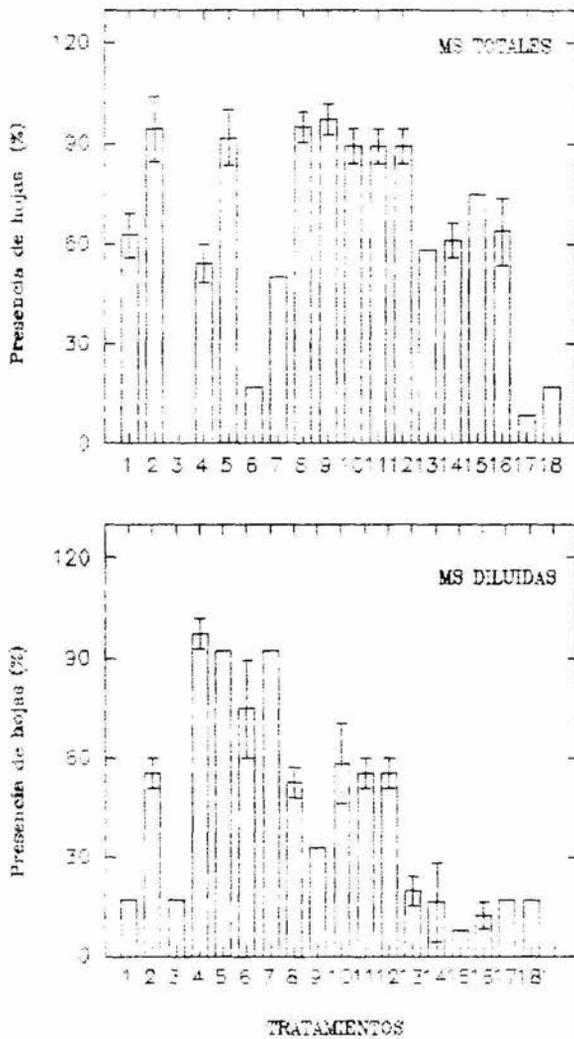


Figura 13. Presencia de hojas para los diferentes tratamientos a 30 días de incubación (promedio de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar).

tratamientos con sales MS totales, presentando diferencias significativas (0.04) para los agentes solidificantes agar 8 g/l y fitagel 2 g/l en ambos casos. (Figura 11). Las plantas de este grupo de tratamientos presentaron hojas desde escasa (menos de 5 hojas en la planta completa) pero grandes (mas de 5 mm de longitud), para los medios con sales básicas diluidas hasta hojas abundantes (más de 10 hojas) y medianas (de 3 a 5 mm de longitud) principalmente para los medios con sales básicas totales, los agentes solidificantes no mostraron diferencias significativas en relación a la presencia de hojas (Figura 13). En cuanto a la presencia de raíz; las plantas presentaron raíces delgadas (menos de 1 mm de diámetro) y gruesas (más de 1 mm de diámetro) pero en su mayoría poco abundantes (de 5 a 10 hojas) no observando diferencias significativas ni para la concentración de sales básicas del medio ni para los agentes solidificantes (Figura 12).

La concentración de 60 g de sacarosa en el medio de cultivo, presentó plantas con tallos ramificados mayores a 1 mm de diámetro, cuando se utilizaron sales básicas MS en su concentración total y tallos delgados y ramificados cuando se utilizaron sales diluidas, no presentando diferencias significativas para el agente solidificante como se observa en la figura 11. Las hojas presentes en las plantas, mostraron ligeras diferencias en relación a la concentración de sales en el medio de cultivo como puede verse en la figura 13, donde en los tratamientos con sales básicas MS en su concentración total las hojas fueron poco abundantes (de 5 a 10 hojas) entre medianas (de 3 a 5 mm de longitud) y grandes (más de 5 mm de longitud), presentando

diferencias significativas (0.02) para los agentes solidificantes utilizados, mientras que las hojas de los tratamientos con sales diluidas fueron escasas (de 1 a 5 hojas), muy pequeñas (menos de 1 mm de longitud), pequeñas (de 1 a 3 mm de longitud) y medianas (de 3 a 5 mm de longitud), sin observar diferencias entre los agentes solidificantes. Las plantas presentaron raíces abundantes de más de 1 mm de diámetro para los tratamientos con sales totales MS, agar 6 y 10 g/l y sales diluidas con agar 8 g/l y raíces delgadas pero abundantes para los tratamientos con sales MS totales en medio líquido y en combinación con 8 g de agar y en tratamientos con sales MS diluidas con 1 g de fitagel; mientras que el resto de los tratamientos presentaron raíces delgadas poco abundantes como puede verse en la gráfica 4F, los agentes solidificantes solo observaron diferencias significativas (0.03) cuando se combinaron con las sales básicas en su concentración total.

La marcada influencia de la concentración de sales básicas y de sacarosa en el medio de cultivo sobre el desarrollo de los diferentes órganos como es el tallo, la raíz y las hojas, como se muestra en los resultados anteriores, se ha estudiado ampliamente ya que la concentración de sacarosa se ha relacionado con la eficiencia de iones amonio y nitratos y el efecto de las citocininas en la división celular, y se sabe que el potencial osmótico del medio de cultivo afecta fuertemente el crecimiento vegetal particularmente a través de su efecto en la expansión de la hoja y la raíz (Kramer 1974) contribuyendo en esto la nutrición mineral quien influye en la diferenciación celular en combinación con los reguladores del crecimiento (Beasley 1974).

Los efectos del potencial osmótico del medio de cultivo sobre la morfogénesis se han observado en varios estudios (Brown y col. 1979 Thorpe y col 1978 y Brown y Thorpe 1980), entre ellos están los de plantas de sorgo donde los valores más bajos que forman yemas vegetativas fueron de -7.9 a -10.9 bars, mientras que las raíces no se iniciaron sino hasta potenciales de -11.9 y -17.9. (Kimball y col. 1975) dicha condición es semejante a la presentada en algunos de los tratamientos de este trabajo donde medios de cultivo de alto potencial hídrico (menos negativo) como el caso en el que se utilizó 5 g de sacarosa y sales MS diluidas no presentaron raíces, mientras que a medida que se redujo el potencial hídrico del medio con adición da sacarosa y sales, las raíces se desarrollaron grandes y gruesas.

Es claro el efecto de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo en función al desarrollo de la raíz, no obstante existen reportes de que concentraciones excesivas de azúcar pueden inhibir la formación de raíz, usando con frecuencia 2 % de sacarosa; en cultivo de tomate, concentraciones de 1.5 % de sacarosa en el medio, presentaron el mejor rango de crecimiento del eje principal de la raíz y el mayor número y longitud total de raíces laterales. (Street y McGregor 1952).

Dentro del cultivo de tejidos vegetales, el paso más importante es la selección de macronutrientes en la concentración y balance correcto. Las sales básicas MS han sido utilizadas en muchos estudios, en diferentes diluciones (1/2, 1/4 y 1/3) y en su concentración total cuando no se conoce el medio específico para la especie en cuestión (Anderson 1980, Cheng 1977 y Ma y Wang 1977), y

se sabe por algunos autores que al modificar la concentración de macronutrientes y de micronutrientes en el medio MS, puede promoverse la morfogénesis y la embriogénesis en el cultivo IN VITRO. (Yang y col 1980-1981).

La disminución de las sales MS a 1/2 de su concentración total en combinación con las diferentes concentraciones de sacarosa, parece observar como ya se mencionó anteriormente un mejor desarrollo de algunos de los órganos evaluados; esta condición es observada también en cultivo de ápices de tallo de algunas especies donde la supervivencia del tejido se ve incrementada al igual que la multiplicación al utilizar sales MS en 1/2 y 1/4 de su concentración total. (Mekers 1977). Sharp (1977) indujo embriogénesis al modificar el medio MS a 1/2 de su concentración excepto para el nitrato de potasio el cual adicionó dos veces el nivel normal. (George y col. 1980).

Por otro lado, las sales minerales en altos niveles, con frecuencia inhiben la iniciación de raíz por lo que en diversos estudios sobre enraizamiento es común el uso de sales MS en 1/4 y 1/2 de su concentración total además se ha visto que la concentración correcta de sales es más importante que la sacarosa para la inducción de raíz en condiciones IN VITRO; tales beneficios de los niveles bajos de sales en la iniciación de raíz, parecen ser debidas a la necesidad de bajos niveles de nitrógeno que a una depresión del potencial osmótico. (Harris y Stevenson 1979). Con lo que podemos explicar la existencia de raíces grandes en algunos de los

tratamientos con sales básicas diluidas a 1/2 de su concentración total para 5 y 20 g de sacarosa como se muestra en los resultados de la figura 12.

Finalmente al correlacionar las variables de contenido de prolina, potencial osmótico, contenido de agua y peso seco con la presencia de tallo, raíz y hojas en las plantas resultantes, tenemos que altas concentraciones de prolina, potencial osmótico muy negativo y porcentajes de contenido de agua bajos parecen estar relacionados con plantas de tallos gruesos ramificados y con abundantes raíces gruesas pero con escasa presencia de hojas pequeñas: por el contrario, plantas con bajas concentraciones prolina, potencial osmótico menos negativo y contenido de agua en bajo porcentaje, también presentaron tallos gruesos y ramificados, pero raíces delgadas pero abundantes y hojas abundantes de medianas a grandes como pude verse en los tratamientos con 5 g de sacarosa en el medio de cultivo y con fitagel y agar (1 y 2 g y 10 g respectivamente) como agente solidificante.

Por lo anterior, si pretendemos seleccionar dentro de los tratamientos utilizados, los que observaron un mejor desarrollo en cuanto a presencia de órganos y un comportamiento del resto de las variables muy cercano al de una planta en condiciones IN VIVO, podríamos seleccionar los medio de cultivo con sales básicas MS diluidas a 1/2 de su concentración total complementado con 5 g de sacarosa, independientemente del agente solidificante por haber presentado plantas con las siguientes características: tallos gruesos y ramificados, raíces delgadas desde escasas hasta

abundantes, abundantes hojas medianas y grandes (ver figuras 11, 12 y 13), contenido de prolina de 0.200  $\mu$ moles por g de peso seco (en promedio), potencial osmótico del tejido de -6.8 bars en promedio, alto contenido de agua (94%) y un peso seco de 0.005 a 0.009 g por planta.

Si observamos la composición de los diferentes medios de cultivo utilizados en micropropagación para el cultivo de papa como los propuestos por el Centro Internacional de Papa (Estrada y col. 1982); donde encontramos que las concentraciones de 5 y 30 g de sacarosa con 7 y 8 g de agar son utilizadas para medios de mantenimiento de germoplasma y que la concentración de 20 g/l de sacarosa con puentes de papel filtro y 10 g de agar es utilizada para los medios de producción de yemas, raíces y callos, y con el uso general, de sales básicas MS en su concentración total; y la correlacionamos con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos decir que las concentraciones de los medios antes mencionados debería ser evaluados considerando otros indicadores de crecimiento de importancia bioquímica y fisiológica como podrían ser el contenido de prolina y tasa fotosintética entre otros. Además de tomar en consideración otras variables que afectan el crecimiento en cultivo de tejidos como concentraciones específicas de iones, reguladores del crecimiento, intensidad luminosa, temperatura, etc.

## VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a lo observado en el presente estudio, puede concluirse que:

Existe una correlación positiva entre la concentración de sacarosa en el medio de cultivo y el contenido de prolina, el potencial osmótico del medio, el potencial osmótico del tejido y el peso seco; de manera que al incrementar una incrementa la otra y viceversa.

El peso seco del tejido, observó un incremento al incrementar la cantidad de sacarosa en el medio.

El contenido de agua presentó una disminución constante al incrementar el contenido de sacarosa en el medio de cultivo.

Los mayores incrementos en el contenido de prolina se observaron para la concentración de sacarosa de 60 g/l de medio, y se correlacionaron con los valores de potencial osmótico más negativos.

La concentración de prolina fué además afectada positivamente por el contenido de sales en el medio, observando que la sales básicas MS en 1/2 de su concentración total, presentaron menores incrementos en el contenido de prolina del tejido y por lo tanto en el potencial osmótico del mismo.

Las diferentes variables fueron afectadas principalmente por el contenido de sacarosa en el medio de cultivo y en menor grado por las sales básicas MS.

El periodo de incubación no parece mostrar diferencias para ninguna de las variables evaluadas.

La concentración de sacarosa puede representar un agente osmótico importante principalmente para el caso de 60 g de sacarosa.

La concentración de sacarosa en el medio parece influir positivamente en la presencia de los diferentes órganos principalmente en la presencia de raíz.

Las sales básicas MS diluidas en combinación con bajas concentraciones de sacarosa parece tener una mejor respuesta en el desarrollo de los diferentes órganos.

Los agentes solidificantes que presentaron diferencias significativas fueron principalmente fitagel 1 y 2 g y agar 10 g por litro de medio en combinación con las diferentes concentraciones de sacarosa y sales básicas para los diferentes órganos.

Finalmente se concluye que la concentración de sales básicas y sacarosa de los tratamientos utilizados en este trabajo y la concentración normalmente empleada en medios estandarizados para el cultivo en cuestión, representa en mayor o menor grado un estado de estrés en el cultivo IN VITRO de papa.

Por las conclusiones anteriores y como complemento a este trabajo, se sugiere :

- Seleccionar entre los medios de cultivo utilizados, los que hayan presentado datos semejantes o cercanos a los observados en las plantas IN VIVO y continuar trabajando con estos para tratar de encontrar el medio más adecuado para el crecimiento del cultivo de papa en condiciones IN VITRO.

- Es conveniente profundizar en el estudio, de todos y cada uno de los componentes del medio de cultivo para la planta de papa, principalmente de macro y micronutrientes, concentración de sacarosa, reguladores del crecimiento, etc.

- Se recomienda investigar aspectos de fotosíntesis y de respiración y relacionarlos con las variables observadas en este trabajo.

- Se sugiere además complementar las evaluaciones de crecimiento y desarrollo de las plantas obtenidas, con aspectos histológicos.

## VII. BIBLIOGRAFIA

✓ Ahmad I. y J. Helledust. 1988 The relationship between inorganic nitrogen metabolism and proline accumulation in osmoregulatory responses of two Euryhaline microalgae. Plant Physiol. 88:345-354.

✓ Anderson W. 1980. Pylot & Converse 1980. Citado por George E. and P. Sherrinton 1984. Plant propagation by tissue culture. Ed. Exegetics ltd. London. pp 184-244.

✓ Aspinall D. y L. Paleg 1981. Proline accumulation: physiological aspects. En Paleg L. y D. Aspinall. The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Aspinall. Academic Press, Sidney pp 215-28.

Bajaj Y. 1987. Biotechnology and 21st Century Potato En: Bajaj Y. Biotechnology in Agriculture and Forestry 3. Potato pp 3-22.

Bajaj Y. 1987. Biotechnology of nutritional Improvement of Potato. En: Bajaj Y. Biotechnology in Agriculture and Forestry 3. Potato pp 136-153.

Bates L. y R. Waldren 1973. Short communication. Rapid determination of proline for water-stress studies. Plant and Soil 39:205-207.

✓ Beauchesene G. 1986. Historia y fundamento del cultivo IN VITRO En: Vidalie H. 1986. Cultivo IN VITRO 1a. edición Ed. Científica S:A: pp 1-5.

✓ Beasley A. 1974. In street H.E. (ed) 1974 (qv). pp 169-192. Citado por George E y col. 1984 Plant propagation by tissue culture Ed. Exegetics L. Inland pp 148-244.

✓ Bernard R. y A. Oaks 1970. Metabolism of proline in maize root tips. Can. J. Bot. 48:1155-8.

Beukema H. y D. Van Der Zaag 1979. Potato improvement. Some factors and facts. International Agriculture (Wageningen) 1(1). Citado por Martínez M. 1990. Análisis de los métodos aplicados en el mejoramiento genético de la papa (Solanum tuberosum, L.) Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Boletín No. 9.

✓ Boccon-Gibod J. 1986. Necesidades nutritivas de los tejidos cultivados en condiciones asépticas En: Vidalié H. 1986. Cultivo IN VITRO 1a. edic. Ed. Científica S:A: pp 43-46.

✓ Boggess S., C. Stewart D. Aspinall y L. Paleg 1976. Effect of water on proline synthesis from radioactive precursors. Plant. Physiol. 58:398-401.

✓ Brown D., D. Leung y T. Thorpe 1979. Physiol. Plant. 46 36-41. Citado por George E. y Sherrington P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Ed. Exegetics Ltd. London pp 184-244.

Brown D. y T. Thorpe 1980. Physiol. Plant. 49:83-87. Citado por George E. y Sherrington P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Ed Exegetics. Ltd. London. pp 184-244.

✓ Chandler S. y T. Thorpe 1987. Characterization of growth, water relations and proline accumulation in sodium sulfate tolerant callus of Brassica napus L. cv Westar (Canola). Plant Physiol. 84:106-111.

Chen C., P. Gavinlertvatana y P. Li 1979. Cold acclimation of stem-cultured plants and leaf callus of Solanum species. Bot. Gaz. 140(2):142-147.

✓ Cheng T. 1977. *Plant Sci. Lett.* 9:179-187. Citado por George E. y Sherrington P. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Ed. Exegetics. L. Inghland pp 184-244.

✓ Corcuera L. M. Hintz y E. Pahlich 1989. Proline metabolism in *Solanum tuberosum* cell suspension cultures under water stress. *J. Plant Physiol.* 134:290-293.

Cram W. 1984. Mannitol transport and suitability as an osmoticum in root cell. *Physiol. Plant.* 61:396-404.

Daniel W. 1985. *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Ed. Limusa. 1a. ed. México pp 469-470.

✓ Davis M. R. Baker y J. Hanan 1977. *J. am. Soc. Hort. Sci.* 102 48-53. Citado por George E. y Sherrington P. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Ed. Exegetics. L. Inghland pp 184-244.

Debergh P., Y. Harbaoui y R. Lemeur 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potencial. *Physiol. Plant.* 53:181-187.

✓ Dunwell J. 1981. *Ann. Bot.* 48:535-542. Citado por George E. y Sherrington P. 1984. *Plant propagation by tissue culture* Ed. Exegetics L. Inghland. pp 184-244.

Espinoza N., R. Estrada, P. Tovar, J. Bryan y J. Dodds 1984. Cultivo de tejidos : Micropropagación, conservación y exportación de germoplasma. Documento de tecnología especializada 1. CIP Lima Perú.

✓ Estrada N. 1982. Breeding wild and primitive potato species to obtain frost resistant cultivated varieties En: Van Suaaij A. y col. 1987. *Euphytica* 36:369-380 (1987).

Flores C. 1969. Taxonomía, distribución y potencial de los *Solanum* tuberíferos silvestres de México. Folleto miceláneo No. 20/INIA México.

✓ Fricke W. y E. Palich 1990. The effect of water stress on the vacuole-extravacuole compartamentation of proline in potato cell suspension cultures. Physiol. Plant. 78:374-378.

\* Fukutaku Y. y Y. Yamada 1984. Sources of proline nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max.*) II. Fate of <sup>15</sup>N-labelled protein. Physiologia plantarum, 61,622-8.

✓ George E. y Sherrinton P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Ed. Exegetics limited. London. Inland. pp 184-244.

✓ Handa S., R: Bressan, A. Handa y N. Capita 1983. Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress. Plant Physiol. 73:834-843.

✓ Harris R. y J. Stevenson 1979. Comb. Proc. Int. Plant. Prop. Soc. 29:95-108. Citado por George E. y Sherrington P. 1984. Plant Propagation by tissue culture. Ed. Exegetics L. Inland. pp 184-244.

Hawkes 1966. The history of the potato. J. Royal Hort. Soc. 92:207-224.

✓ Hellergren J. y P. Li 1981. Survival of Solanum Tuberosum suspension cultures to -14 grados C: The mode of action of proline. Physiol. Plant. 52:449-453.

✓ Ibarra J., C. Villanueva, J. Molina y E. Sánchez 1988. Proline accumulation as a symptom of drought stress in maize: a tissue differentiation requirement. J. Exp. Bot. 39,204:889-897.

✓ Jeréz E. 1987. La prolina y su relación con el estrés hídrico. Cultivos Tropicales Reseña. Revista del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba. pp 3-24.

✓ Jeréz E. 1986. Algunos aspectos del régimen hídrico de las plantas. Cultivos tropicales reseña. Revista del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba. pp 1-29.

✓ Kardpal R. y N. Roal 1985. Alterations in the biosynthesis of proteins and nucleic acids in finger millet (*Eleusine coracana*) seedlings during water stress and the effect of proline on protein biosynthesis. *Plant Science* 40: 73-9.

~~✓~~ Kimball S., W. Beversdorf y E. Bingham 1975. *Prop. Sci.* 15:750-752. Citado por George E. y Sherrington P. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Ed. Exegetics L. England pp 184-244.

✓ Kramer P. 1974. Relaciones hídricas de suelo y plantas. Eudetex S. A. 1a. ed. pp 23-30 .

Lea P. 1985. Ammonia assimilation and amino acid biosynthesis. En Coombs J. y col. 1985. *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis Second Edition*. Pergamon. Press. pp 1985-1987.

Levy D. 1983. Water deficit enhancement of proline and alfa-amino nitrogen accumulation in potato plants and its association with susceptibility to drought. *Physiol. Plant* 57:169-173.

✓ López P. 1985. Establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. En: Villalobos A. 1985. *Fundamentos teórico-prácticos de cultivo de tejidos*. Col. Posg. Chapingo Méx. pp 25-54.

✓ Ma S. y S. Wang 1977. *Acta Hort.* 78:209-215. Citado por George E. y Sherrington P. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Ed. Exegetics L. England pp 184-244.

Maldonado A. 1982. Papa alimento base del pueblo mexicano. Folleto. Abril. México.

Martínez E. 1990. Análisis de los métodos aplicados en el mejoramiento genético de la papa (Solanum tuberosum, L.) Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas Boletín No. 9.

Mazelis M. 1980. Amino acid catabolism. En The Biochemistry of Plant. Copyright by Academic Press Inc. pp 562-563.

Mekers O. 1977. Acta Hort. 78:311-317. Citado por George E. y Sherrington P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Ed. Exaletics L. Inland pp 184-244.

Moor T. 1981. Measurement of the water potential of plant tissues. Research experiences in Plant Physiology 2nd ed. Springer Verlag Berlin.

Muir W., A. Hildebrandt y A. Riker 1954. Plant tissue cultures produced from single isolated plant cells. Science 119:877-887.

Murashige T. y F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 473-497.

Nowak J. y D. Colborne 1989. IN VITRO tuberization and tuber proteins as indicators of heat stress tolerance in potato. Am. Pot. J. 66:35-45.

Ochoa N. 1985. Establecimiento de cultivos IN VITRO En: Villalobos 1985. Fundamentos teórico-prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Col. Posg. Chapingo Méx. pp 64-72.

✓ Paleg L., G. Stewart y J. Bradbeer 1984. Proline and Glycine betaine influence protein solvation. Plant. Physiol. 75:974-978.

✓ Rhodes D., S. Handa y R. Bressan 1986. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. Plant. Physiol. 82:890-903

\* Sangita H. 1983. Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cell adapted to water stress. Plant. Physiol. 73:834-843.

Sharp W. 1977. In Plant cell and tissue culture: Principles and applications. Ohio state Univ. Press, Columbus.(eds) 1979.

✓ Singh T., D. Aspinall y L. Paleg 1972. Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: a potential metabolic measure of drought resistance. Nature 236:188-190.

Singh T., L. Paleg y D. Aspinall 1973. Stress metabolism 1. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress. Aust. J. Biol. Sci. 26:45-56.

✓ Skirvin R. 1981. Hortscience 16:310-312. Citado por George E. Sherrington P.1984. Plant propagation by tissue culture. Ed. Exegetics L. Inland pp 184-244.

✓ Slavik B. 1974. Methods of studying plant water relations. Academy Publishing House of the Czechoslovak. Academy of Sciences. N. Y. Vol. 9 pp 75-108.

Sosa C. y G. Villareal 1978. La papa. Recursos genéticos disponibles a México. Soc. Méx. Fitogenética A. C. pp 133-137.

\* ✓ Stewart C. 1978. Role of carbohydrates in proline accumulation in wilted barley leaves. Plant. Physiol. 61:775-778.

✓ Stewart G. y F. Larher 1980. Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. In *The Biochemistry of Plant*. Academic Press Inc. N. Y. Vol. 5 pp 609-630.

✓ Stewart C. 1981. In: Paleg, L. y D. Aspinall (eds): *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*, Academic Press, Sydney, 243-259(1981).

\*✓ Stewart C. y S. Boggess 1978. Metabolism of [5-3H]proline by barley leaves and its use in measuring the effects of water stress on proline oxidation. *Plant. Physiol.* 61:654-657.

✓ Stewart C., G. Voetberg y P. Rayapati 1986. The effects of benzyladenine, Cyclohexamide and Cordycepin on wilting-induced abscisic acid and proline accumulations and abscisic acid-and salt-induced proline accumulation in barley leaves. *Plant. Physiol.* 82:703-707.

✓ Street H. y S. McGregor 1952. *Ann. Bot.* 16:185-205. Citado por George E. y Sherrington P. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Ed Exegetics L. Inland pp 184-244.

✓ Takayama S. y M. Misawa 1979. *Physiol. Plant.* 46 184-190. Citado por George E. y Sherrington P. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Ed Exegetics L. Inland pp 184-244.

Thompson J. 1980. Arginine synthesis, proline synthesis and related processes. In *The Biochemistry of Plant*. Academic Press Inc. Vol. 5 pp 375-398.

✓ Tantau H. y K. Dörffing 1991. IN VITRO-selection of hydroxyproline-resistant cell lines of wheat (*Triticum aestivum*): accumulation of proline, decrease in osmotic potential and increase in frost tolerance. *Physiol. Plant.* 82:243-248.

Thorpe T., D. Brown y W. Leung 1978. IN VITRO 14:355(Abst. 88).

Citado por George E. y Sherrington P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Ed. Exegetics L. Inland pp 184-244.

Van Swaaij A., E. Jacobsen y W. Feenstra 1985. Effect of cold hardening, wilting and exogenously applied proline on leaf proline content and frost tolerance of several genotypes of Solanum. *Physiol. Plant.* 64:230-236.

Van Swaaij A., H. Nijdam, E. Jacobsen y W. Feenstra 1987. Increased frost tolerance and amino acid content in leaves, tubers and leaf callus of regenerated hydroxiproline resistant potato clones. *Euphytica* 36:369-380.

Van Swaaij A., K. Talsma, E. Jacobsen y W. Feenstra 1987. Frost tolerance in cell cultures of potato. *Physiol. Plant.* 69:602-606.

Wang y Huang 1975. *Can. J. Bot.* 53:2565-67.

Widholm J. 1986-7. Improvement through IN VITRO selection for increased levels of free amino acids. En Bajaj Y. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 3. Potato. pp 268-279.

Yang Y. y W. Chang 1980-81. *Z. Pflanzenphysiol.* 97:19-24. Citado por George E. y Sherrington P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Ed. Exegetics L. Inland pp 184-244.

## VIII. A P E N D I C E

### CLAVE DE PRESENCIA DE ORGANOS

ORGANO	%	CARACTERISTICAS
TALLO	25	DELGADO (- 1 mm DE DIAMETRO)-NO RAMIFICADO
	50	DELGADO (- 1 mm DE DIAMETRO)-RAMIFICADO
	75	GRUESO (+ 1 mm DE DIAMETRO)-NO RAMIFICADO
	100	GRUESO (+ 1 mm DE DIAMETRO)-RAMIFICADO
RAIZ	25	DELGADA (- 1 mm DE DIAMETRO) POCO ABUNDANTES (- DE 5 RAICES)
	50	DELGADA (- 1 mm DE DIAMETRO) ABUNDANTES (+ DE 5 RAICES)
	75	GRUESA (+ 1 mm DE DIAMETRO) POCO ABUNDANTES (- DE 5 RAICES)
	100	GRUESA (+ 1 mm DE DIAMETRO) ABUNDANTES (+ DE 5 RAICES)
HOJAS	8.3	ESCASAS (DE 1 A 5 HOJAS) MUY PEQUEÑAS (- DE 1 mm DE LONGITUD)
	16.6	ESCASAS (DE 1 A 5 HOJAS) PEQUEÑAS (DE 1 mm A 3 mm DE LONGITUD)
	25	ESCASAS (DE 1 A 5 HOJAS) MEDIANAS (DE 3 mm A 5 mm DE LONGITUD)
	33.3	ESCASAS (DE 1 A 5 HOJAS) GRANDES (+ DE 5 mm DE LONGITUD)
	41.6	POCO ABUNDANTES (DE 5 A 10 HOJAS) MUY PEQUEÑAS (- DE 1 mm DE LONGITUD)
	50	POCO ABUNDANTES (DE 5 A 10 HOJAS) PEQUEÑAS (DE 1 mm A 3 mm DE LONGITUD)
	58.3	POCO ABUNDANTES (DE 5 A 10 HOJAS) MEDIANAS (DE 3 mm A 5 mm DE LONGITUD)
	66.6	POCO ABUNDANTES (DE 5 A 10 HOJAS) GRANDES (+ DE 5 mm DE LONGITUD)
	75	ABUNDANTES (+ DE 10 HOJAS) MUY PEQUEÑAS (- DE 1 mm DE LONGITUD)
	83.3	ABUNDANTES (+ DE 10 HOJAS) PEQUEÑAS (DE 1 mm A 3 mm DE LONGITUD)
	91.6	ABUNDANTES (+ DE 10 HOJAS) MEDIANAS (DE 3 mm A 5 mm DE LONGITUD)
	100	ABUNDANTES (+ DE 10 HOJAS) GRANDES (+ DE 5 mm DE LONGITUD)

CONCENTRACION (g/l)		CONTENIDO DE PROLINA (µmol/g)	POTENCIAL OSMOTICO (BARS)		CONTENIDO DE AGUA (%)	PESO SECO DEL TEJIDO (g)
SACAROSA	SOLIDIFICANTE		TEJIDO	MEDIO		
5	P.F.	1.192_0.403	4.600	4.600	91.873_3.495*	0.005_0.003*
20	P.F.	2.522_1.441	8.600	8.600	92.860_0.559*	0.004_0.001*
60	P.F.	0.882_0.030	10.600	7.300	83.023_4.276*	0.005_0.003*
5	AGAR 6	0.565_0.290	6.000	6.000	92.211_3.614*	0.007_0.003
20	AGAR 6	0.200_0.064*	8.000	4.000	93.017_0.975*	0.011_0.004
60	AGAR 6	0.613_0.014	10.600	9.300	88.430_3.258*	0.012_0.005
5	AGAR 8	0.313_0.157	7.300	3.300	91.674_0.506*	0.009_0.006
20	AGAR 8	0.713_0.003*	8.000	7.300	91.610_2.465*	0.009_0.004
5	AGAR 10	0.459_0.267	6.000	9.300	93.410_1.022*	0.014_0.005*
20	AGAR 10	0.518_0.201	6.000	2.600	92.972_1.478*	0.005_0.001*
60	AGAR 10	1.004_0.032*	8.000	8.000	92.205_1.813*	0.008_0.005
5	FITAGEL 1	1.182_0.157*	7.300	4.000	88.536_0.490*	0.016_0.008*
20	FITAGEL 1	0.701_0.241	6.600	7.300	95.200_1.050*	0.006_0.002
60	FITAGEL 1	1.135_0.264*	8.600	6.600	93.966_1.959*	0.011_0.004
5	FITAGEL 2	1.007_0.320*	8.600	9.300	89.242_2.385*	0.019_0.008*
20	FITAGEL 2	0.539_0.300	4.600	5.300	91.873_3.495*	0.012_0.008
60	FITAGEL 2	1.957_1.320*	8.000	4.000	93.750_1.114*	0.016_0.003
				8.000	89.083_2.486*	0.023_0.015*

\* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA PARA DUNCAN RANGO MULTIPLE NIVEL DE 0.05

CONCENTRACION (g/l)		CONTENIDO DE PROLINA (µmol/g)	POTENCIAL OSMOTICO (BARS)		CONTENIDO DE AGUA (%)	PESO SECO DEL TEJIDO (g)
SACAROSA	SOLIDIFICANTE		TEJIDO	MEDIO		
5	P.F.	9.471_0.745*	10.600	1.600	32.517_1.932*	0.005_0.003*
20	P.F.	0.359_0.138	8.600	6.000	90.853_2.642	0.009_0.002
60	P.F.	0.836_0.016	9.300	11.300	90.309_1.663	0.009_0.006
5	AGAR 6	0.478_0.153	8.000	3.600	91.316_4.382	0.011_0.004
20	AGAR 6	0.500_0.059	7.300	6.300	92.646_0.598*	0.011_0.001
60	AGAR 6	0.302_0.216	13.000	13.300	88.118_0.749*	0.016_0.004*
5	AGAR 8	0.530_0.492	9.000	4.300	91.784_0.762	0.007_0.006
20	AGAR 8	0.417_0.137	8.000	6.600	90.881_1.199	0.017_0.006*
60	AGAR 8	0.500_0.016	12.600	10.000	90.633_1.461	0.016_0.006*
5	AGAR 10	0.392_0.009	10.300	2.000	88.877_1.889*	0.010_0.003
20	AGAR 10	0.284_0.009*	10.000	6.600	93.292_2.959*	0.011_0.008
60	AGAR 10	1.225_0.457*	9.300	12.000	88.567_1.684*	0.011_0.006
5	FITAGEL 1	0.473_0.236	8.000	4.000	92.123_0.496*	0.011_0.004
20	FITAGEL 1	1.048_0.043	7.300	4.600	89.439_0.478*	0.015_0.004*
60	FITAGEL 1	1.449_0.665*	7.300	6.600	84.797_2.924*	0.018_0.001*
5	FITAGEL 2	0.246_0.030*	9.300	1.300	93.210_2.061*	0.010_0.003
20	FITAGEL 2	0.964_0.501	7.300	3.600	91.865_1.279*	0.021_0.003
60	FITAGEL 2	3.895_1.385*	10.600	9.600	86.622_2.493*	0.014_0.005*

\* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA PARA DUNCAN RANGO MULTIPLE NIVEL DE 0.05

EFEECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE EL CONTENIDO DE PROLINA, POTENCIAL OSMOTICO, CONTENIDO DE AGUA Y PESO SECO DEL TEJIDO. LAS PLANTAS FUERON SOMETIDAS A LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO CON SALES BASICAS MS EN SU CONCENTRACION TOTAL E INCUBADAS A 15 (ARRIBA) Y 30 DIAS (ABAJO). LOS VALORES SON EL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES MAS MENOS LA DESVIACION ESTANDAR. PARA POTENCIAL OSMOTICO, LOS VALORES SON EL RESULTADO DE UNA OBSERVACION.

CONCENTRACION (g/l)		CONTENIDO DE PROLINA (μmol/g)	POTENCIAL OSMOTICO DEL (BARS) DEL TEJIDO		CONTENIDO DE AGUA (%)	PESO SECO DEL TEJIDO (g)
SACAROSA	SOLIDIFICANTE					
5	P. F.	0.238=0.100	6.000	5.300	92.740=0.016*	0.006=0.002
20	P. F.	0.386=0.175	10.600	4.000	89.219=2.229*	0.007=0.002
50	P. F.	0.733=0.288	12.000	7.300	88.150=0.676*	0.010=0.003
50	AGAR 6	0.264=0.068	8.000	6.600	93.110=1.17*	0.005=0.003
60	AGAR 6	0.365=0.045	8.000	6.000	89.470=3.417*	0.006=0.003
60	AGAR 6	0.609=0.191	8.000	6.000	90.026=0.853*	0.013=0.004
60	AGAR 6	0.424=0.059	7.300	7.300	91.637=0.630*	0.005=0.001
60	AGAR 10	0.421=0.213	7.300	6.000	91.253=2.184*	0.006=0.002
60	AGAR 10	0.531=0.277	10.000	6.000	89.345=1.664*	0.013=0.006
20	AGAR 10	0.243=0.356	6.000	6.000	91.051=0.780*	0.008=0.004
60	AGAR 10	0.279=0.092	7.300	9.300	84.638=1.799*	0.011=0.002
5	FITAGEL 1	0.244=0.112	10.000	4.300	93.821=1.036*	0.010=0.003
20	FITAGEL 1	0.488=0.046	6.600	6.600	92.339=0.853*	0.009=0.003
60	FITAGEL 1	0.191=0.013	7.300	10.000	85.795=2.411*	0.010=0.004
5	FITAGEL 2	0.273=0.127	6.000	6.000	94.440=1.549*	0.008=0.004
20	FITAGEL 2	0.453=0.041	6.600	3.300	92.275=1.833*	0.008=0.005
60	FITAGEL 2	0.613=0.206	7.300	8.000	91.202=1.551*	0.016=0.003

\* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA PARA DUNCAN RANGO MULTIPLE NIVEL DE 0.05

CONCENTRACION (g/l)		CONTENIDO DE PROLINA (μmol/g)	POTENCIAL OSMOTICO DEL (BARS) DEL TEJIDO		CONTENIDO DE AGUA (%)	PESO SECO DEL TEJIDO (g)
SACAROSA	SOLIDIFICANTE					
5	P. F.	0.160=0.025	8.000	3.000	89.483=3.307*	0.005=0.001
20	P. F.	0.300=0.222	8.600	3.300	92.731=1.464*	0.009=0.004
50	P. F.	0.265=0.228	6.000	6.000	87.308=2.281*	0.008=0.003
60	AGAR 6	0.139=0.043	8.000	4.000	91.627=2.469*	0.006=0.001
20	AGAR 6	0.593=0.370	8.000	4.300	92.709=0.258*	0.012=0.002
60	AGAR 6	0.438=0.041	8.600	4.300	87.012=2.821*	0.009=0.004
5	AGAR 6	0.226=0.009	6.000	2.000	92.473=1.452*	0.005=0.003
20	AGAR 6	0.243=0.005	7.300	6.300	91.322=1.671*	0.011=0.008
60	AGAR 10	1.791=0.154*	10.600	11.600	88.422=2.052*	0.014=0.006
5	AGAR 10	0.217=0.038	8.300	5.300	94.112=1.106*	0.007=0.003
20	AGAR 10	1.103=0.197*	9.300	4.600	94.206=4.211*	0.005=0.001
60	AGAR 10	0.549=0.116	10.300	3.600	91.136=2.004*	0.009=0.003
5	FITAGEL 1	0.165=0.053*	4.600	3.000	94.536=1.061*	0.015=0.003
20	FITAGEL 1	0.386=0.175	6.000	3.600	92.022=0.744*	0.009=0.003
60	FITAGEL 1	0.253=0.102	11.300	6.000	87.574=1.699*	0.015=0.009
5	FITAGEL 2	0.348=0.028	7.600	2.600	93.727=2.286*	0.008=0.004
20	FITAGEL 2	0.383=0.165	4.600	2.000	92.689=1.663*	0.014=0.004
60	FITAGEL 2	0.239=0.005*	8.600	9.300	87.435=3.508*	0.025=0.012*

\* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA PARA DUNCAN RANGO MULTIPLE NIVEL DE 0.05

EFEECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE EL CONTENIDO DE PROLINA, POTENCIAL OSMOTICO, CONTENIDO DE AGUA Y PESO SECO DEL TEJIDO. LAS PLANTAS FUERON SOMETIDAS A LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO CON SALES BASICAS MS DILUIDA 1/2 DE SU CONCENTRACION TOTAL E INCUBADAS A 15 (ARRIBA) Y 30 DIAS (ABAJO). LOS VALORES SON EL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES MAS MENOS LA DESVIACION ESTANDAR. PARA POTENCIAL OSMOTICO, LOS VALORES SON EL RESULTADO DE UNA OBSERVACION.

TRATAMIENTOS		TALLO (%)	RAIZ (%)	HOJA (%)
CONCENTRACION DE SACAROSA g/l	AGENTE SOLIDIFICANTE g/l			
5	P.F.	16.667-14.434*2	16.667-14.434	41.667-36.324*2
20	P.F.	50.000-00.000*3	50.000-00.000	50.000-00.000
60	P.F.	75.000-00.000	75.000-00.000*2	38.333-00.000*1
5	AGAR 6	50.000-00.000*2	25.000-00.000	34.444-09.623*2
20	AGAR 6	50.000-00.000*3	50.000-00.000	94.444-04.811
60	AGAR 6	100.000-00.000	100.000-00.000*2	61.111-04.811*1
5	AGAR 8	25.000-00.000*2	0	0
20	AGAR 8	100.000-00.000*3	25.000-00.000	97.222-04.811
60	AGAR 8	100.000-00.000	50.000-00.000*2	75.000-00.000*1
5	AGAR 10	50.000-00.000*2	16.667-14.434	36.111-31.549*2
20	AGAR 10	50.000-00.000*3	50.000-00.000	88.889-04.811
60	AGAR 10	100.000-00.000	100.000-00.000*2	63.889-09.623*1
5	FITAGEL 1	50.000-00.000*2	0	91.667-06.333*2
20	FITAGEL 1	100.000-00.000*3	25.000-00.000	88.889-04.811
60	FITAGEL 1	100.000-00.000	25.000-00.000*2	8.333-00.000*1
5	FITAGEL 2	100.000-00.000*2	0	11.111-05.623*2
20	FITAGEL 2	100.000-00.000*3	50.000-00.000	88.889-04.811
60	FITAGEL 2	50.000-00.000	16.667-14.434*2	11.111-09.623*1

DIFERENCIA SIGNIFICATIVA PARA FRIEDMAN NIVEL 0.01 (\*) 0.02 (\*1) 0.03 (\*2) 0.04 (\*3)

TRATAMIENTOS		TALLO (%)	RAIZ (%)	HOJA (%)
CONCENTRACION DE SACAROSA g/l	AGENTE SOLIDIFICANTE g/l			
5	P.F.	25.000-00.000*1	0	16.667 00.000*
20	P.F.	100.000-00.000	50.000 00.000	91.667 00.000
60	P.F.	50.000-00.000	16.667 14.434	19.444 04.811
5	AGAR 6	50.000-00.000*1	0	55.556 04.811*
20	AGAR 6	100.000-00.000	50.000 00.000	52.778 04.811
60	AGAR 6	25.000-00.000	8.333 00.000	11.111 05.623
5	AGAR 8	100.000-00.000*1	8.333 00.000	16.667 00.000*
20	AGAR 8	100.000-00.000	8.333 00.000	33.333 00.000
60	AGAR 8	100.000-00.000	100.000 00.000	8.333 00.000
5	AGAR 10	100.000-00.000*1	50.000 43.301	97.222 04.811*
20	AGAR 10	66.667-57.735	33.333 00.000	38.889 34.694
60	AGAR 10	16.667-14.434	25.000 00.000	5.556 00.000
5	FITAGEL 1	100.000-00.000*1	25.000 00.000	94.667 00.000*
20	FITAGEL 1	50.000-00.000	58.333 28.868	55.556 04.811
60	FITAGEL 1	50.000-00.000	66.667 57.735	16.667 00.000
5	FITAGEL 2	50.000-00.000*1	16.667 14.434	75.000 14.434*
20	FITAGEL 2	100.000-00.000	25.000 00.000	55.556 04.811
60	FITAGEL 2	50.000-00.000	33.333 28.868	16.667 00.000

DIFERENCIA SIGNIFICATIVA PARA FRIEDMAN NIVEL 0.01 (\*) 0.02 (\*1) 0.03 (\*2) 0.04 (\*3)

EFEECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE LA PRESENCIA DE TALLO, RAIZ Y HOJAS. LAS PLANTAS FUERON SOMETIDAS A LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO CON SALES BASICAS MS EN SU CONCENTRACION TOTAL (ARRIBA) Y CON SALES BASICAS MS DILUIDAS A 1/2 (ABAJO) E INCUBADAS A 30 DIAS. LOS VALORES SON EL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES MAS MENOS LA DESVIACION ESTANDAR.