



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**INFLUENCIA DE DIFERENTES AZUCARES EN
LA MICROPROPAGACION DE PAPA
(*Solanum tuberosum* L.)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO AGRICOLA
P R E S E N T A :
JESUS ADRIAN REYES RIVERA

ASESOR: ING. FRANCISCO CRUZ PIZARRO
COASESOR: ING. JESUS VIEYRA RAMIREZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN, N.A.M.
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR FACULTAD DE ESTUDIOS
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES DEPARTAMENTO DE EXAMENES

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
 INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ASUNTO: VOTOS APPROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
 DIRECTOR DE LA F.E.S. CUAUTITLAN
 PRESENTE.

ATN: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS
 "Influencia de diferentes azúcares en la micropropagación de papa.
 (Solanum tuberosum L.)".

que presenta el pasante: José Adrián Reyes Rivera
 con número de cuenta: 8408220-2 para obtener el TÍTULO de:
Ingeniero Agrícola

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APPROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI PAZ HABLARA EL ESPÍRITU"
 Cuautitlan Izcalli, Edo. de Mex., a 12 de Junio de 1997

PRESIDENTE M. en C. María del Yezmin Cuervo Usón
 VOCAL Ing. Francisco Cruz Pizarro
 SECRETARIO Ing. Guillermo Basante Butrón
 PRIMER SUPLENTE M. en C. Gregorio Arellano Ontoa
 SEGUNDO SUPLENTE Ing. Roberto Guerrero Agaña

AGRADECIMIENTOS:

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO QUE GRACIAS A SU CARÁCTER PÚBLICO ME PERMITIÓ SER PARTE DE ELLA

A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, A LA CARRERA DE INGENIERÍA AGRÍCOLA EN LA CUAL CRECÍ COMO INDIVIDUO Y PROFESIONISTA

AL INGENIERO FRANCISCO CRUZ PIZARRO POR LA ORIENTACIÓN PROPORCIONADA DURANTE EL DESARROLLO DEL TRABAJO

A LOS PROFESORES INTEGRANTES DEL JURADO POR SUS SUGERENCIAS EN LA MEJORA DE ESTE TRABAJO

A LOS INGENIEROS JESÚS VIEYRA Y MARGARITA PLANCARTE POR SU AYUDA DESINTERESADA EN LA ELABORACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A TODAS LAS PERSONAS QUE DIRECTA O INDIRECTAMENTE PERMITIERON LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.

TLAZOHCAMATI

DEDICATORIAS:

A MI PADRE PABLO REYES A SU MEMORIA

A MI MADRE MARÍA RIVERA POR SER EJEMPLO DE CONSTANCIA Y PERSEVERANCIA, ASÍ COMO DE APOYO INCONDICIONAL

A MIS HERMANOS LUISA, ELVIRA, LUZ, PAULA, MARTÍN Y GABRIELA QUE ME HAN PROPORCIONADO EL ALIENTO PARA PODER LLEGAR A CONCLUIR MIS ESTUDIOS FORMALES A NIVEL LICENCIATURA

A LAS RAMAS CRECIDAS A PARTIR DEL TRONCO QUE FUERON MIS PADRES, EN CONSCIENCIA DE QUE CADA UNO DE ESTOS RAMALES HA COLABORADO EN EL CRECIMIENTO Y FORTALECIMIENTO DEL ÁRBOL, DEL CUAL ME HONRRO DE SER PARTE, Y DE EL Y EN EL CRECER Y FORTALECERME

A MIS COMPAÑEROS DE ESTUDIOS CON LOS CUALES COMPARTÍ ALEGRÍAS Y TRISTEZAS, A LOS QUE PASARON DE SER COMPAÑEROS Y SE CONVIRTIERON EN AMIGOS

A TODOS LAS PERSONAS QUE VIVEN DEL CAMPO Y PARA EL CAMPO.

NIMITZMOTLAZOHCAMACHILILIA

CONTENIDO.	Pag.
Cuadros	i
Figuras	ii
1 - Introducción	1
2 -Marco teórico	4
2.1 - Generalidades de la papa (<i>Solanum tuberosum L.</i>)	4
2.1.1 - Origen, historia e importancia.	4
2.1.2 - Características taxonómicas, morfológicas y nutrimentales	9
2.1.3 - Propagación y producción de semilla	14
2.2.- Cultivo <i>in vitro</i> de papa	17
2.2.1 - Antecedentes del cultivo <i>in vitro</i> en papa	18
2.2.2.-Micropropagación	21
2.2.2.1.- Metodología utilizada en la micropropagación.	21
2.3 - Medio de Cultivo	26
2.3.1 - Componentes Inorgánicos	28
2.3.2.- Componentes Orgánicos	29
2.3.2.1 - Carbohidratos	29
2.3.2.1.1.- Azúcares.	30
2.3.2.1.2 - Características de los azúcares utilizados.	32
2.3.2.2.- Vitaminas.	37
2.3.3 - Reguladores de Crecimiento	38
2.3.3.1 - Auxinas.	39

2.3.3.2 - Citocininas	40
2.3.4 - agentes gelificantes	41
2.3.5 - pH	41
2.4 - Condiciones de cultivo	42
3 - Materiales y métodos	43
3.1 - Ubicación del experimento	43
3.2 - Material biológico	43
3.3.-Medios de cultivo	43
3.4 - Acondicionamiento	44
3.5 - Desinfección	44
3.6 -Establecimiento	44
3.6.1 - Diseño experimental.	44
3.6.2.- Variables de estudio	45
3.7 - Multiplicación	46
3.7.1 - Material utilizado.	46
3.7.2.- Diseño experimental	46
3.7.3 - Variables de estudio	46
3.8 - Evaluación de fructosa	47
3.8.1 - Material utilizado.	47
3.8.2.- Diseño experimental.	47
3.8.3 - Variables de estudio.	47

4.- Resultados y discusión	49
4.1.- Acondicionamiento	49
4.2.- Contaminación	49
4.3.- Supervivencia	51
4.4.- Desarrollo	52
4.5.- Establecimiento y desarrollo.	54
4.5.1.- Numero de brotes	54
4.5.2.- Tamaño de brotes	57
4.5.3.- Variables porcentuales.	59
4.6.- Multiplicación	59
4.6.1 - Contaminación	59
4.6.2 - Numero de brotes	60
4.6.3 - Tamaño de brotes	62
4.6.4.- Variables porcentuales	63
4.7.- Evaluación de la fructosa	64
4.7.1 - Contaminación.	64
4.7.2.- Numero de brotes	65
4.7.3.- Tamaño de brotes.	66
4.7.4.- Variables porcentuales	66
5.- Conclusiones.	68
6.-Bibliografía.	70

CUADROS.

Numero		pag.
1	Evolución del cultivo de la papa en México	6
2	Principales Estados productores de papa alpha en el país	8
3	Clasificación Taxonómica	9
4	Características morfológico-comerciales de la papa cultivar alpha	12
5	Características nutrimentales de la papa cultivar alpha destinada al consumo fresco	13
6	Disponibilidad de semilla por variedad y categoría para 1992	16
7	Investigaciones de cultivo in vitro en papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.	19
8	Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)	26
9	Descripción de los tratamientos en el establecimiento	45
10	Descripción de los tratamientos en la multiplicación	46
11	Descripción de los tratamientos en la evaluación de fructosa	47
12	Efecto de las concentraciones de azúcares sobre el número y tamaño de brotes	55
13	Análisis de varianza de la variable número de brotes	55
14	Comparación de medias en número de brotes, mediante la prueba de Tukey	56
15	Análisis de varianza del tamaño de brotes	57
16	Comparación de medias en tamaño de brotes, mediante la prueba de Tukey	58
17	Efecto de los Reguladores de Crecimiento en el número y tamaño de brotes en la multiplicación	59
18	Efecto de las concentraciones de fructosa en el número y tamaño de brotes.	65

FIGURAS

Numero		Pag.
1	Características morfológicas de la planta de papa	11
2	Secuencia técnica de la micropropagación de papa realizada	48
3	Porcentaje de la contaminación en el establecimiento de ápices de papa c v. alpha	50
4	Porcentaje de sobrevivencia en el establecimiento de ápices de papa c v. alpha	52
5	Porcentaje del desarrollo en el establecimiento de ápices de papa c v. alpha	53
6	Numero de brotes en el establecimiento de papa c v. alpha	56
7	Tamaño de brotes de papa c v. alpha	58
8	Numero de brotes en la proliferación	61
9	Tamaño de brotes en la proliferación	63
10	Numero de brotes en la evaluación de fructosa.	65
11	Tamaño de brotes en la evaluación de fructosa	66

1 -INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* cv Alpha) es una planta cultivada principalmente con fines de consumo humano, en nuestro país es solamente superado por el cultivo del maíz, frijol, trigo y arroz (SARI,1994,Valadez,1994), su importancia radica en su alto valor nutritivo, en la superficie sembrada y en la gran demanda de mano de obra que requiere durante todo su desarrollo agrícola (Valadez,1994)

Dentro de la problemática en la producción de este cultivo, el aspecto fitosanitario es el de mayor importancia y se debe fundamentalmente a que la papa es de las especies que se propagan en forma vegetativa o asexual, a través de los tubérculos, por lo que la producción obtenida de semillas de mala calidad, que contaminadas conservan estas características negativas, implica la aplicación de grandes cantidades de agroquímicos para proteger el cultivo del ataque de virus, hongos y bacterias, así como, de insectos y plagas. Con la biotecnología se podría disminuir o eliminar su uso, lo que favorecería la protección del ambiente y la disminución en los costos de producción (Barajas,1996, Massieu,1996, Torres,1988)

En lo referente a las técnicas utilizadas para la producción vegetal de papa se encuentra el cultivo *in vitro*, que con la técnica de micropropagación cubren el objetivo de garantizar el buen estado sanitario del cultivo, obteniendo un número elevado de plantas clonadas en un periodo de tiempo relativamente corto (Cruz,1996)

El presente trabajo explica una secuencia de experimentos, los cuales presentan un esquema de propagación *in vitro*, basado en el uso de diversas fuentes de azúcares, donde el explante inicial consistió en ápices provenientes de yemas axilares de papa (*Solanum tuberosum* cv. Alpha)

Parte de la premisa hipotética de que en el cultivo de plantas superiores *in vitro*, estas raras veces resultan ser completamente autotróficas, por lo que tales cultivos son usualmente suplementados con azúcares exógenos (Lipavská y Vreugdenhil, 1996)

Principia con un acondicionamiento único, basado en la siembra sobre sustrato esterilizado 1:1:1 v/v de vermiculita, insulx y tierra negra con temperatura y luminosidad constante, lo que permitió obtener en 30 días material suficiente y de calidad aceptable, a continuación, de la planta madre se cortaron segmentos con una yema axilar colocándolos en agua, se lavó el material con detergente comercial, se enjuaga y coloca en una solución de hexetidina (6 ml/L) por 10 minutos, se transfiere a una solución de alcohol al 70% por 3 minutos, agregando una gota de Tween 80, prosiguiendo a sumergir el material en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 15 minutos en agitación. Al término del tiempo se enjuaga con agua destilada y esterilizada por cuatro tiempos en la campana de flujo laminar.

Para el desarrollo del experimento se manejaron 12 tratamientos resultantes de combinar cuatro fuentes de azúcares (glucosa, lactosa, manitol y sacarosa) a tres niveles de concentración (alta (0.0876 M), media (0.0584 M) y baja (0.0292 M)), suplementados al medio base consistente en MS al 50% de su concentración, adicionado con BA (0.5 mg/L) y AIB (0.1 mg/L), reportando como mejor resultado el tratamiento dos, consistente en sacarosa a su nivel medio (0.0584 M), el cual permitió el establecimiento y desarrollo aséptico del explante.

A partir del material obtenido se realizo un subcultivo con la finalidad de incrementar el material , en el cual se ensayaron ocho tratamientos sobre un medio MS suplementado con 0.0584 M de sacarosa y BA(0.5 mg/L) excepto en el testigo, adicionando dos fuentes de auxinas (ANA o AIB) suplementada a tres diferentes concentraciones (0.1, 0.05 y 0.01 mg/L.), obteniendo como mejor resultado el tratamiento cuatro, consistente en el balance hormonal 10:1 BA/ANA

Asi mismo se evaluo la fructosa, a sus tres niveles de concentración, adicionando estos, al medio MS al 50% suplementado con BA(0.5 mg/L) y ANA (0.05 mg/L) , obteniendo como mejor resultado el nivel medio

Esta tesis tiene como objetivo, evaluar el efecto de cinco fuentes de azúcares durante la micropropagación de papa, identificando cual es la fuente y concentración de azúcar mas apropiada, de acuerdo a la etapa del esquema de propagación *in vitro* realizado

Asi como evaluar el efecto de las auxinas en la proliferación de yemas axilares y con esto contribuir a el desarrollo de un esquema de propagación *in vitro* para la utilización potencial de los azúcares

2 -MARCO TEORICO

2.1 -Generalidades de la Papa (*Solanum Tuberosum* L.)

Solanum tuberosum se cultiva en todo el mundo, todas las demás especies están restringidas a los países Andinos donde se encuentran millares de cultivares silvestres, hay cerca de 200 especies silvestres en América, que crecen desde el sur de Estados Unidos, hasta el sur de Chile. El género *Solanum* se encuentra desde el nivel de mar hasta más de 4,000 m s n m (Mora, 1991), donde la temperatura media registra entre los 12 y 18°C alcanza su óptimo crecimiento (SARI, 1994)

2.1.1 -Origen, Historia e Importancia del Cultivo

Se considera que el centro de origen de la papa son las regiones altas del Perú, Bolivia, Guatemala, México, Chile y el sur de los Estados Unidos, lugares donde existe gran diversidad de especies tanto silvestres, como cultivadas, se observa que hasta la fecha los investigadores no se han puesto de acuerdo en cuanto al centro de origen, ya que se tiene por un lado a la escuela Soviética que plantea que la especie más difundida (*Solanum tuberosum*), es originaria de la isla de Chiloe en Chile y la escuela Inglesa, que indica que tal especie proviene de los Andes Peruanos, sea de una u otra forma, lo cierto es que los Incas iniciaron su cultivo en el lago Titicaca en el Perú, hace aproximadamente 2000 años, llamando a los tubérculos con el nombre de papas (Fersini 1979, citado por Trujillo y Lira 1992), en la antigua Anahuac el pueblo mexihca ya la cultivaba llamándola tlaxocotl 'manzana de tierra', entre los nahoas recibía el nombre de papolt, los españoles la llevaron a Europa en el año de 1537, ya en Europa, apareció gradualmente en varios países durante los siglos XVII y XVIII

Por sus altos rendimientos por hectarea y sus características alimenticias, diversas naciones del viejo mundo incorporaron su cultivo con el fin de evitar los rigores de las hambrunas entre sus pueblos (SARII,1994), el antecedente mas notorio en la Europa del siglo pasado resulta ser una tragedia, ya que los que difundieron el cultivo de la papa no sabian que con este tuberculo difundian a la vez la escrofulosis, pero resulta poco notorio comparado con los efectos que sobre las condiciones de vida de las masas del pueblo de paises enteros ha tenido el hambre que se extendió en 1847 a consecuencia, de una enfermedad de este tuberculo (*Phytophthora infestans*), y que llevo a la tumba a un millon de Irlandeses que se alimentaban exclusivamente o casi exclusivamente de papas y obligo a emigrar a otros dos millones (Engels, 1876)

Su retorno a América se debe a los Irlandeses en el año 1719, en su ingreso a México como cultivo extensivo, encontramos que a principios del siglo, la producción de papa en el pais era tan pequeña, que no figuraba entre los productores de este tubérculo, ya que su consumo era mínimo y su cultivo a ampha escala comercial data de 55 años a la fecha, durante esta epoca se abrieron nuevas zonas al cultivo, se actualizo al personal técnico, se introdujeron y crearon variedades apropiadas y se puso en práctica un sistema de producción de semilla certificada (Mena, 1985, citado por Trujillo y Lira,1992)

En México, la papa era un cultivo casi olvidado, hasta 1946 cuando John S Niederhauser, viendo las buenas condiciones climáticas en todos los valles altos de la mesa central para este cultivo, se intereso por impulsarlo (Pérez,1974, citado por Trujillo y Lira,1992)

En 1985, entre las principales hortalizas producidas en el pais, la papa ocupó el primer lugar en cuanto a superficie cosechada, y el segundo cuanto a los volúmenes de producción

La producción de papa en el país, se ha incrementado en los últimos diecisiete años a un ritmo mayor que el presentado por el avance de la población. Esta expansión de los volúmenes producidos ha estado determinada por el incremento de las superficies cosechadas y en menor grado, por el aumento de los rendimientos obtenidos, situación que comienza a cambiar debido al uso cada vez más difundido de semilla agrícola de calidad.

Por su parte, el consumo nacional de papa per capita ha aumentado, en el año de 1930 se ubicó en los 2.8 kg., durante la década de los 70's fue de 10.1 kg., para 1980 se reporta un consumo de 15.8 kg. y finalmente para 1994 se reportó un consumo extraordinario de 18 kg., cayendo de igual manera a 10 kg. per capita en 1995 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Evolución del cultivo de la papa en México.

Año	Superficie (miles has)	Rendimiento (tons/ha)	Producción (miles tons)	Imports (miles de tons)	Consumo per capita (kgs)
1930	12.7	3.5	45.5	1.2	2.8
1940	18.0	3.9	70.8	1.5	3.6
1950	29.9	4.5	134.8	8.2	5.5
1960	43.8	6.7	294.1	0.2	8.2
1970	48.2	10.5	508.1	2.0	10.1
1980	71.4	12.6	901.5	30.0	13.4
1990	81.2	15.8	1'285.7	6.0*	15.8
1991	74.6	18.0	1'211.1	cierre	----
1992	72.1	18.2	1'212.9	"	----
1993	68.8	16.0	1'100.0	"	----
1994	68.0	16.0	1'086.0	"	18.0
1995 ¹	74.7	18.5	1'360.0	"	10.0

Fuente: SARH, Dirección Gral. Estadística

* US Dept. of Commerce, EUA

¹ Hernández 1996

Dado que no existen estadísticas a nivel nacional, y muchas veces tampoco a nivel estatal datos sobre el cultivo de la papa, se han realizado intentos de cuantificación, basados en investigaciones de campo efectuadas en diversas zonas productoras. De ellas se desprende que la superficie sembrada con la variedad alpha en el ciclo 1986-87, fue aproximadamente de 26 035 ha, mientras que el promedio de los rendimientos y la producción nacional fue de 22 06 ton/ha y 574 450 ton respectivamente (Cuadro 2)

En nuestro país, la gran diversidad ecológica posibilita sembrar papa alpha de manera escalonada en varias zonas, ello permite disponer de este producto a lo largo de todo el año. Sin embargo, este hecho da lugar a periodos de empalme de dos o más regiones productoras, entablandose una competencia interregional por el mercado, que resulta perjudicial para la mayoría de los productores y sólo favorable para los intermediarios y/o bodegueros que adquieren el producto

La producción de papa en el país se realiza mayoritariamente bajo régimen de riego (Estados de Sinaloa, Chihuahua, Sonora, Coahuila, Nuevo León, Guanajuato, Michoacán, Puebla y Tlaxcala), aunque también existen siembras de temporal, sobre todo en el Estado de México

La mayoría de la superficie sembrada (64%), se localiza en seis estados del norte de la República mexicana, sin embargo, solamente Sonora y Sinaloa son reelevantes en cuanto al abasto del mercado del Distrito Federal, Baja California y la región de Navidad (Coahuila/ Nuevo León), son importantes zonas de abasto para la industria del freído, por producir un tipo de papa que resulta óptima para tal procesamiento

La otra parte de su producción la destinan preferentemente a las principales plazas del norte (Monterrey, Tijuana, etc.), siendo poco importante su participación en el Distrito federal

Cuadro 2. Principales Estados Productores de Papa Alpha en el país 1986-1987.

ESTADO	REGION O MUNICIPIO	SUP SEMB (HAS)	REND TONS HA	PROD (TONS)	PERIODO DE COSECHA
Sinaloa	Ahome, El Fuerte, Guasave y Sinaloa de L.	4,750	25	168,750	Marzo-mayo
Coahuila y Nuevo León	Navidad, Saltillo	4,000	20	80,000	Agosto-Oct
Guanajuato	Romita, Leon, Silao P de Bustos San Fco del Rincón y Manuel Doblado	2,631	20	52,620	Mayo-Julio
Michoacán	Zamora, Jacona y Tangancicuro	2,108	20	42,160	Dic -marzo
Baja Califor- nia Norte	San Quintín, Ojos Negros y Maniadero	2,000	25	50,000	Junio-Agos
Sonora	Huatabampo	2,000	25	50,000	Marzo-mayo
Puebla	Libres, Oriental, Guadalupe	2,000	20	40,000	Julio-sept
Chihuahua	San Salvador el Seco Sierra, Aldama, Jiménez y Bufalo	1,800	20	36,000	Oct y dic
Edo de Méx	Toluca y Valle de Bravo	800	20	16,000	Sept -nov
Zacatecas		800	20	16,000	Agost -sept
Hidalgo	Mexitlán	700	20	14,000	Dic -enero
Tlaxcala	Huamantla y Cuapixtita	446	20	8,920	Julio-sept
Total		26,035	22 06	574,450	

FUENTE COABASTO (1988), Citado por Trujillo y Lira, 1992

Por otra parte, Chihuahua es fundamentalmente un estado productor de semilla y abastecedor de la industria y de varias plazas del norte, aunque sus envíos al Distrito Federal no son muy importantes. Sonora y Sinaloa se cuentan también entre los principales proveedores de la industria, por la calidad de papa ahí producida, por ejemplo, en el ciclo 1987, sabritas compró a Sinaloa 20,000 ton de papa alpha, lo que significó el 40% de los requerimientos anuales de esta

transnacional (50,000 Ton), mientras que Barcel adquirió en ese mismo estado 5,000 Ton querepresentan el 71% de su consumo anual (7,000 Ton) .

Sin embargo, estas adquisiciones representan tan solo el 18% de la producción comercial de Sinaloa, destinando buena parte del porcentaje restante al consumo del Distrito Federal

Los otros siete estados productores (Guanajuato, Michoacán, Puebla, Estado de México, Zacatecas, Hidalgo y Tlaxcala) son importantes por sus envíos al Distrito Federal, durante sus respectivos periodos de cosecha

2 1 2 - Características Taxonomicas, Morfológicas, y Nutrimientales

La papa (*Solanum tuberosum* L) pertenece a la familia de las solanaceas(Cuadro 3), plantas de flores gamopetalas, dicotiledoneas, la mayor parte de las cuales son cultivadas para alimentación humana (Trujillo y Lira,1992), existe un gran numero de especies de papa, pero en la producción para consumo humano se usan casi exclusivamente las especies *Tuberosum* y *Andigenum* La especie *Tuberosum*, tiene plantas con hojas y tuberculos mas grandes por lo que es mas rentable (Mora,1991)

Cuadro 3. Clasificación taxonómica.

División	Tracheophita
Subdivisión	Pteropsida
Clase	Angiosperma
Orden	Metaclamideae
Familia	Solanáceae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<u><i>tuberosum</i></u>
Cultivar	Alpha
fuentes: SARH,1994; Trujillo y Lira,1992	

Morfológicamente la planta de papa esta constituida y caracterizada por(Figura1).

a) -Raiz

La papa es una planta anual, que posee una raiz típica más o menos ramificada de tipo adventicio, la cual puede alcanzar una profundidad de 45 cm desarrollándose lateralmente en un radio de aproximadamente 90cm

b) -Tallos

Presenta dos tipos de tallos aéreos y terrestres. Los aéreos son de color verde, erguidos, lisos y cilindricos cuando jóvenes, pardos angulosos y postrados al desarrollarse. Los subterráneos están constituidos por los estolones y tubérculos, los estolones son delgados y largos, y dan origen a los tubérculos. El tubérculo es un tallo diferenciado en un órgano de almacenamiento, por expansión radial y longitudinal, producido en la planta mediante la división y el alargamiento celular(Harris,1978,Park,1984,citados por Ortiz,1986). La parte que se inserta al tubérculo recibe el nombre de ombligo y viene a ser la base del mismo.

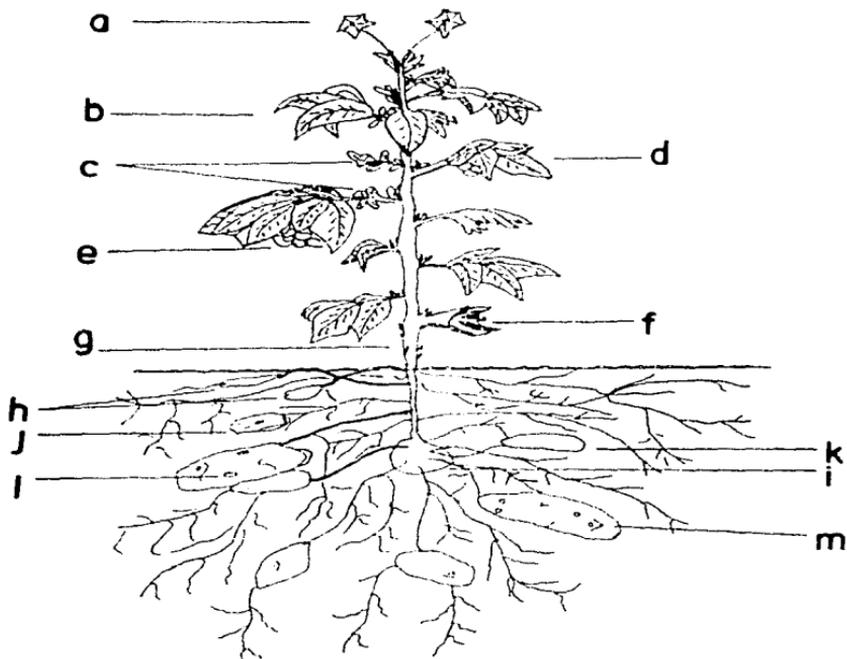
c) -Hoja, Flor y Semilla

Las hojas son alternas, sectadas, cubiertas de pubescencias.

Las flores son perfectas de color blanco, amarillo o púrpura, dependiendo de la variedad, se producen en racimos, con gineceo súpero y bicarpelar.

Las semillas son lenticuladas, las cuales se reproducen en el fruto de baya globular de color castaño, púrpura, verde, amarillo o manchado, con dos loculos, son reniformes, de color gris de superficie rugosa adherida a la placenta.

Figura 1 Características morfológicas de la Planta de papa



a) flores, b) foliolos, c) peciolos, d) folíolos sesiles, e) frutos, f) estipulas de la hoja, g) tallo, h) estolon, i) tubérculo viejo de semilla, j) tubérculo en desarrollo k) tubérculo joven, l) lenticela, m) ojo o yema.

Fuente: Solorzano, 1983

d) -Descripción de la Variedad Alpha

Con el cultivo de papa variedad alpha, se busca satisfacer el mercado con la producción de tubérculos que reúnan características de semilla y/o alimento (Cuadro 4) En el primero se busca el tamaño, forma, calidad y la capacidad de producir buenas vemas mientras que para el segundo se desea alcanzar tamaño, peso, forma y calidad relacionada con los valores nutricionales

CARACTERISTICAS	DESCRIPCION
Maduración	Tardia 110- 120 días
Rendimiento	Muy bueno, clasificación excelente, rica en almidón
Tubérculo	Grande, redondo-oval, "ojos" superficiales, pulpa amarilla clara, peso 55-60 gr
Planta	Desarrollo robusto compacto, cobertura a todo el surco, follaje verde oscuro, flores blancas, altura de planta 90-100 cm
Fitosanidad	Susceptible a tizon (<i>Phytophthora infestans</i>).
Diversas	Resistente a la sequía, buena calidad culinaria
Durabilidad	Germinación reducida durante el almace namiento
Germinación	12 a 14°C, 15 a 22 días
Floración	14°C, 37 a 40 días
Maduración	52 a 60 días

Fuente UAAAN (1988), citado por Trujillo y Lira, 1992

Dentro de las características nutrimentales se considera que el alto valor nutricional y el bajo contenido calórico de la papa ha quedado en la mente del consumidor norteamericano (Cuadro 5), gracias a la labor promocional y de mercadeo de el consejo nacional promotor de la papa (National Potato Promotor Boord) con sede en Denver, Colorado, E U (Mercer, 1992)

Una papa mediana (100gr) contiene unicamente 110 calorías, y cubre el 50% del requerimiento diario de vitamina C establecido por el (USDA), posee altos niveles de potasio y fibra, y muchas otras vitaminas y minerales, lo que significa un alto equilibrio calórico/valor nutritivo. Siendo el primer producto en contar con una etiqueta de contenido nutricional aprobada (Mercer, 1992)

Cuadro No.5. Características nutrimentales de la papa cv. Alpha Destinada al consumo fresco (En base a 100 gr. de tubérculo)	
COMPONENTE	CARACTERISTICAS
Agua	81.6 %
Almidón	11.52 gr (Amilasa, amilopectina 1.3 , Celulosa Glucosa
Proteínas	2.09 gr
Aminoácidos	Niacina 0.66 mg Lisina 0.92 mg Valina 0.22 mg
Minerales	Potasio 3.0 mg Sodio 1.1 mg Magnesio 1.0 mg Calcio 1.4 mg Hierro 2.0 mg Fósforo 5.3 mg
Grasa	1.0 gr
FUENTE: Mercer, 1992	

En México la primer labor de promoción se da con la realización de la primera muestra gastronómica de la papa en 1995, esto con el fin de cambiar la mentalidad del consumidor que hasta hoy piensa que la papa no tiene alto valor nutritivo y que además engorda demasiado (Hernández, 1995)

2.1.3 -Propagación y Producción de Semillas

En la siembra de papa, se considera generalizado el uso de tubérculo como semilla, debido a que el uso de semilla verdadera se restringe tradicionalmente a los fitomejoradores

La papa es una planta que se multiplica vegetativamente por medio de tubérculos, ya sea enteros o en porciones. Para que los tubérculos broten es necesario que salgan del periodo de letargo, el cual consiste en un lapso de inactividad que abarca desde la cosecha, hasta la primera manifestación de actividad celular en las yemas, es decir la brotación. El periodo de reposo, depende de las variedades, en algunas es corto, en otras largo y en unas terceras casi no existe. En términos generales la duración del reposo es de un mes y medio a dos, este periodo también depende de la respiración y el metabolismo y puede ser acortado por el hombre o bien alargado, por medio de condiciones de almacenamiento y tratamientos especiales.

Partiendo de semilla los tubérculos se empiezan a formar a los 35-55 días después de la siembra (dependiendo del clima y variedad), el primer par crece fuera de la tierra se desarrolla en la axila de los cotiledones, al penetrar al suelo se ensancha y tuberiza, los tubérculos producidos por vía sexual son muy pequeños, por lo que se prefiere la propagación asexual.

Por vía sexual los estolones aparecen a los 10 días de haber aparecido el tallo aéreo, esto es de 20-30 días después de germinación. Por vía asexual los estolones y tubérculos se forman más temprano y con mayor volumen.

Los tubérculos más apropiados para la multiplicación de la papa son aquellos que tienen un peso de 50 a 60 g. Cuando se utilizan porciones de tubérculos debe permitirse la suberización del corte, lo cual se logra con temperaturas de 18°C y humedad relativa de 85%, durante 5 días con buena ventilación (Murillo, 1985, citado por Trujillo y Lira, 1992).

La variedad de climas en el país permite contar con tubérculos para semilla y consumo todos los meses del año, lo que no sucede en otros lugares, brindando inclusive posibilidad de participar en el comercio exterior con papa, posibilidades que se ven duramente afectadas por la carencia de suficiente semilla certificada, por esto se hace evidente notar que la papa de siembra es un problema de naturaleza capital, siendo de máxima importancia contar con tubérculos libres de patógenos y eficientes fisiológicamente, para la obtención de resultados óptimos, considerando aun, el gravamen que representa esta semilla, que puede ser de un 30 a un 50% del costo total de la producción (Ortiz, 1986).

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

Holanda es considerado el país más destacado en cuanto a producción de semilla de papa con más de 500 000 Ton de exportaciones anuales y 150 variedades registradas en los listados de variedades de plantas cultivadas (Coumou, 1992).

En México, el proceso de certificación de semilla de papa tuvo su origen en 1957, año en el cual se produjeron 1,200 Ton. que cubrieron 3 600 ha, en la actualidad la cantidad de semilla certificada es de alrededor de 35 mil ton que cubren cerca de 11,700 ha, y que representa el 13% del área cultivada de papa en 1992 (Cuadro 6).

Las variedades manejadas en la producción de semilla de papa para certificar son principalmente Alpha y Atlantic, alcanzando la primera hasta un 80% del total de la producción, un 15% para la segunda y el 5% restante para variedades como Michoacán, Greta, Tollocan, etc (SARH, 1994).

Cuadro 6 Disponibilidad de semilla por variedad y categoría para 1992

Variedad/ categoría	Alpha Ton	Atlántic Ton	Otras Ton	Total Ton
Básica	4,302 7	1,341 3	1,175 5	6,819 5
Registrada	6,249 1	11,085 0	1,175 5	18,509 6
Certificada	8,611 9	339 3	2,080 0	11,031 2
Total	19,163 7	12,765 6	4,431 0	36,360 3

Fuente: SNICS, Dir. Gen. de Política Agrícola, citado por SARH, 1994

El resto de la superficie, se desarrolla con una tecnología tradicional en la que los agricultores generalmente obtienen tubérculos pequeños lo que dificulta su comercialización, por ello, dejan estas papas chicas y deformes, las cuales a pesar de proceder de plantas de dudosa capacidad de producción son usadas como semillas.

Muchas Técnicas alternativas para la erradicación de patógenos y mejoramiento de la papa, se llevan a cabo ya en México, tal es el caso, del cultivo *in vitro* de meristemos para la obtención de plantas libres de virus, y la propagación clonal masiva.

Cuadro 6 Disponibilidad de semilla por variedad y categoría para 1992

Variedad/ categoría	Alpha Ton	Atlantic Ton	Otras Ton	Total Ton
Básica	4,302 7	1,341 3	1,175 5	6,819 5
Registrada	6,249 1	11,085 0	1,175 5	18,509 6
Certificada	8,611 9	339 3	2,080 0	11,031 2
Total	19,163 7	12,765 6	4,431 0	36,360 3

Fuente: SNICS, Dir. Gral. de Política Agrícola, citado por SARH, 1994

El resto de la superficie, se desarrolla con una tecnología tradicional en la que los agricultores generalmente obtienen tubérculos pequeños lo que dificulta su comercialización, por ello, dejan estas papas chicas y deformes, las cuales a pesar de proceder de plantas de dudosa capacidad de producción son usadas como semillas

Muchas Técnicas alternativas para la erradicación de patógenos y mejoramiento de la papa, se llevan a cabo ya en México, tal es el caso, del cultivo *in vitro* de meristemos para la obtención de plantas libres de virus, y la propagación clonal masiva.

2.2 -Cultivo *in vitro* de Papa

Mediante esta tecnica se puede resolver problemas asociados con la calidad haciendo mas eficientes los cultivares a factores tanto ecológicos, como patológicos, e incluso pueden mejorar el rendimiento, etc , pero es necesario contar con una tecnología que contribuya a reducir el costo de operación a escala de germoplasma valioso, y la disminución de los riesgos que implican su cultivo en el campo (Ortiz,1986, Mora,1991, Solorzano,1983)

Es conveniente aclarar la terminología utilizada en este apartado, para conceptualizar correctamente las diferencias significativas que existen entre las metodologías generales en la producción biotecnológica de material de papa

- a) -Cultivo *in vitro* Se define como el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones esteriles, de plantas, semillas, embriones, organos, explantes, tejidos, células y protoplastos, con el resultado de la producción y regeneración de individuos viables
- b) -Cultivo de tejidos A partir de 1945 se agrupa en este termino todo tipo de cultivo aséptico, por lo cual es común identificarlo como sinonimo de cultivo *in vitro*, pero estrictamente este tipo de cultivo solo incluye tejidos celulares, por ejemplo Meristemos, callos, tejido parenquimatoso, epidermis y cambium
- c) -Micropropagación Es la tecnica de propagación vegetativa *in vitro*, de forma asexual, tambien llamada clonado

2.2.1 Antecedentes del Cultivo *in vitro* en Papa

Por sus características fisiológicas y morfológicas la papa es una planta excepcional para estudios de cultivo *in vitro* (Mora, 1991)

En ella se han utilizado variedad de técnicas, desde el más usual, consistente en el cultivo de órganos (ápices, yemas, brotes, tubérculos, etc.), hasta métodos más complicados como

- Cultivo de células aisladas y fusión de protoplastos
- Cultivo de callos y de células en suspensión
- Cultivo de embriones
- Cultivo de anteras y polen

Steward y Caplin 1951, establecieron por primera vez un cultivo de callos de papa a partir de células del parénquima, empleando 2,4-D, después se obtuvieron callos, brotes, raíces, embriones y microtubérculos, a partir de explantes de hojas, peciolo, ovarios, anteras, tallos, raíces y meristemas así todos los tejidos de la papa se han logrado cultivar *in vitro* casi todos con buenos resultados (Cuadro 7)

El cultivo *in vitro* implica por lo tanto, técnicas basadas en el origen del explante, lo cual dependerá del objetivo que se persiga y de la tecnología disponible o en desarrollo, esto debido a que no es lo mismo trabajar con órganos diferenciados que con estructuras intracelulares, algunas de las finalidades perseguidas en trabajos de papa son

Eliminación de plagas y enfermedades

Manipulación genética

Clonación masiva, etc

Cuadro 7 Investigaciones de cultivo in vitro en papa (*Solanum tuberosum* L.)

Inoculo		Objetivos y resultados
Referencia		
Apice de tallo(1cm)	Eliminación de virus Utilizo termoterapia Se elimino virus 'A'	Morel, Martin y Muller, 1955 ¹
Apice de tallo	Evaluar 2,4-D, kmetina Resultando callos y brotes	Wang y Huang 1975 ²
Apice de brote	Evaluar BA Resultado brotes axilares y adventicios	Mariani y Pisi 1977 ²
Meristemos	Criopreservación Regenero plantas congeladas a -175°C	Bajaj 1981 ³
Meristemo	Minimo crecimiento Reduce hasta en 2 años la transferencia	Henshaw 1982 ³
Ápices de brote (0 1 mm)	Tuberización Se adiciono (10)BA + 6-8% de sacarosa, 8 hrs luz(100Lux)	Wang y Hu 1982
Esquejes y microesquejes	Tuberización Se adiciono Cinetina 6% sacarosa, 15°C y obscuridad	Wattimena et al 1983
Raquis, peciolo y hojas	Evalúo(1)AIA + (1)BA +(10)GA ₁ se obtuvo brotes directos	Roest y Bukelman 1985 ²
Nudo de tallo (segmento nodal)	Evalúo la ausencia de reguladores de crecienmto,obtuvo brotes axilares	Levy 1985 ²
Microesquejes (in vitro)	Evalúo (0.4)GA ₁ + (0.5)BA + (0.1)ANA Obtuvo brotes multiples	Estrada et al 1986 ²
Callos in vitro	Efecto de la temperatura en el contenido de azúcares reductores a 25 y 15°C disminuyen, a 5°C incrementan	Muneta 1990
Meristemos	Erradicar virus, propagación in vitro almacenamiento e intercambio de germoplasma Resulta producción semilla certificada	Espinoza et al 1992

CONTINUA		
Apices de 1cm	Inducir diferenciación floral Se ensayo con Fotoperiodo, GA ₃ y Kin , la ausencia de GA ₃ + (0.3)Kin + 4% sacarosa y luz continua fue mejor	Lozoya 1992
Callos in vitro	Efecto de la temperatura en el contenido de CHO's Determina la proporción de la actividad enzimatica en relacion a los azuceres totales	Hagan y Muneta P. 1993
Brotos in vitro	Propagación masiva de microtubérculos Se uso Biofermentador en dos fases Se obtuvo en dos semanas tuberización con la fase dos	Akita M y Takayama S 1994
Plantas in vitro	Estimulación del crecimiento de brotes y raíces modificando la concentración de sacarosa y Fluridone se incremento el numero de raíces, brotes y el peso total con 0.234 M de sacarosa, en presencia de fluridone	Harvey et al. 1994
Segmento nodal in vitro	Efecto del manitol en el crecimiento Los contenidos de manitol en el peso seco de la planta alcanzan radios de hasta el 20 %	Lipavska H y Vreugdenhil 1996
Segmento nodal o Microtubérculo	Producción de microtuberculos Los mejores resultados se dan con microtubérculos, con 4 y 8% de sacarosa en 10 semanas	Khuri S y Moorby J 1996
Anteras	Influencia de 2,4-D y lactosa en embriogenesis de polen. Se presenta sinergismo positivo en el caso de la lactosa, situación negativa con sacarosa	Rihova L. y Tupy J 1996
FUENTE: ¹ Solorzano, 1983 , ² Ortiz, 1986 , ³ Mora, 1991		
(n) las cantidades están expresadas en mg/L.		

Etapas. Establecimiento de un cultivo aseptico

Al establecer tejidos y organos vegetales en el medio de cultivo se busca que este sea aséptico, por lo que se realiza una desinfección del inoculo, medio, material y área de trabajo

En papa la desinfección se basa en el uso de detergentes biológicos, alcohol etílico (etanol), cloro comercial y agua destilada esterilizada, variando la concentración y los tiempos de exposición, resaltando el uso de la campana de flujo laminar (Cruz,1996, Espinoza et al,1992, Hussey y Stace,1981, Levy,1985, Rihová y Tupy,1996, Slack y Tufford,1995, Wattimena et al,1983) El objetivo principal es que el cultivo sea establecido libre de contaminación por microorganismos, que una adecuada proporción de los explantes sobrevivan al cultivo

Etapas. Multiplicación de propagulos

Se busca que produzca un rápido incremento de órganos y otras estructuras, las cuales posteriormente puedan dar origen a plantas En papa se practican comúnmente cuatro técnicas para el incremento microesquejes, microtuberculos y formación de callos o embriones, para los cuales se han ensayado todo tipo de estímulos, tanto físicos como químicos (Khuri y Moorby,1996, Rihová y Tupy, 1996)

Técnicas utilizadas en la multiplicación

En lo que respecta a estructuras biológicas utilizadas en la técnica de multiplicación de papa los trabajos realizados se centran en el cultivo de tejidos y órganos, entre los que destacan por su amplia difusión los siguientes

Cultivo de yemas axilares Son porciones regenerativas que crecen lateralmente dispuestas sobre los microtallos, el tamaño de estos varía de 1 a 2 cm (Mora,1991)

Cultivo de meristemas Para la propagación, el meristema es ideal como material inicial, esto debido a su estabilidad genética y su fisiología que permite la eliminación de virus, el tamaño de estas estructuras varía de 0.1 mm hasta 0.5 mm de acuerdo a la especie y edad del material (Solorzano, 1983)

Segmentos nodales o "Cultivo de esquejes de tallo" Estos materiales son provenientes de plantulas in vitro a las cuales se les cortan segmentos con nudos individuales, su tamaño aproximado es de 1 a 2 cm (Khuri y Moorby, 1996)

Cultivo de microtubérculos Este es un método utilizado muy recientemente con la finalidad de simular reacondicionamientos bajo condiciones de almacenaje, para esquemas de multiplicación masiva tanto de brotes como de microtubérculos (Khuri y Moorby, 1996) y potencialmente para la exportación de germoplasma in vitro, su tamaño varía entre 0.5 y 2cm de diámetro y 1 a 2 cm de largo (Espinoza, et al, 1992)

Cultivo de ápices Se utiliza tanto en raíz, tallo y yemas axilares, con el objeto de eliminar virus (complementado con fisioterapias o quimioterapias), enfermedades varias, así como de material inicial para la micropropagación, el tamaño de estos varía de 0.4 a 2cm, pero se ha observado que ápices de 0.1cm o más enraizan más rápidamente que meristemas. Stace, et al sugieren no emplear ápices menores de 3mm pues eran difíciles de enraizar, y por otra parte evitar el cultivo de ápices mayores de 7mm ya que era más probable que contuvieran el virus 's', aunque Norris eliminó virus 'x' de papa con ápices de hasta 1 cm (Solorzano, 1983), estos datos deben ser tomados con reservas, ya que se ha observado que el trabajo con ápices solo es factible con la combinación de quimioterapias o fisioterapias previas, que contribuyan a eliminar las enfermedades especialmente virus

Entre los estímulos químicos, en la fase de multiplicación de propagulos, se ha variado en los medios de cultivo, tanto los constituyentes inorgánicos, al principio buscando un soporte nutricional de minerales (Mora, 1991, Zeemerman, 1991)

Además recientemente se han realizado variedad de ensayos en sustancias orgánicas como reguladores de crecimiento, fuentes de carbohidratos e introducción de enzimas (Lipavská y Vreugdenhil, 1996, Mora, 1991, Wang y Hu, 1982)

En lo que respecta a estímulos físicos, se encuentra el manejo de temperaturas, fotoperíodos e intensidades luminosas (Akita y Takayama, 1994, Hagen y Muneta, 1996, Lozaya, 1992, Muneta et al., 1990, Seabrook, Coleman y Levy, 1993)

Etapa tres. Preparación para restablecimiento de plantas en suelo

El objetivo es preparar a los propagulos para una exitosa transferencia a suelo, por lo que a papa se refiere en esta etapa usualmente se practica el estímulo al crecimiento de brotes (microesquejes) o conversión de las plantas a un estado autotrófico como microtubérculos (Khuri y Moorby, 1996)

Así mismo, Khuri y Moorby, 1996 sugieren utilizar estos como explante para micropropagar, encontrando una mejor respuesta que con la técnica de segmentos nodales

Wang y Hu, 1982, realizan una estimación de la productividad de estos elementos, encontrando que se puede llegar a producir hasta 36,300 microtubérculos en un período de cuatro meses, en tan solo una área de 10 metros cuadrados, lo que representaría más o menos 1,800 kg de semilla agrícola de calidad certificada

Dentro de los factores inductivos más importantes, se han propuesto la necesidad de presencia de sacarosa (3-10%), en un medio con Cinetina para la formación del tubérculo, con la

aclaramiento de que ésta per se no fue capaz de promover la iniciación del proceso. En relación a los factores ambientales que tienen influencia sobre la tuberización en cultivo aséptico se han identificado como condiciones óptimas para la inducción una temperatura de 18 a 20°C y un fotoperíodo menor a 10 horas diarias (Wang y Hu,1982,Ortiz,1986)

Etapa cuatro. Aclimatación.

Se define como el proceso en el cual un organismo se adapta a un cambio. La transferencia de plantas, brotes o tubérculos a un sustrato para aclimatación debe considerar el uso de mezclas de enraizamiento esterilizadas, uso de sombras parciales y de alta humedad relativa por algunos días (Espinoza et al,1992, Solorzano,1983, Van y Vander,1983), sin embargo se han realizado estudios sobre los efectos de la transferencia directa de condiciones *in vitro* a campo (Levy,1985, Wattimena et al,1983), situación que permitiría obviar esta fase y como consecuencia incidir directamente en el tiempo del proceso y los costos de producción del mismo.

Además, podemos afirmar que existen dos factores fundamentales que determinan el éxito del cultivo *in vitro*

- 1 - El tipo de inóculo inicial, así como sus características
- 2 - El medio de cultivo

Como ya se han descrito los métodos usualmente empleados, así como las características del inóculo según finalidad del trabajo, resulta conveniente resaltar la importancia que tiene el medio de cultivo en general y los azúcares en particular, baste con recordar que los cultivos bajo condiciones *in vitro* son heterótrofos con respecto al carbono, por lo que tales cultivos son usualmente suplementados con azúcares exógenos (Pierik,1990, Margara,1988, Kyte,1990, Rihova,1996)

2.3 -Medio de Cultivo

El medio de cultivo es el factor esenciales para el establecimiento, crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales en la propagación *in vitro* (Mora, 1991, Pierik, 1990, Kyte, 1990)

Se probaron varios medios de cultivo cambiando las concentraciones de nutrientes inorgánicos y de orgánicos, hasta que se encontró que la fórmula de Murashige y Skoog (1962) resultó mejor para la supervivencia y velocidad de desarrollo de los explantes. Este medio está caracterizado por altas concentraciones de iones potasio, amonio y mio-inositol (Cuadro 8). Al incrementar concentraciones de estos elementos, se observó que era decisivo para el cultivo de meristemos apicales de papa, los cuales desarrollan hasta plantulas más vigorosas que con los medios anteriormente utilizados (Mora, 1991)

CUADRO 8. MEDIO DE CULTIVO.

SALES INORGÁNICAS.			
MACRONUTRIMENTOS (mg/L)		MICRONUTRIMENTOS (mg/L)	
NH ₄ NO ₃	1650	MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3
KNO ₃	1900	H ₃ BO ₃	6.2
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	Zn SO ₄ 7H ₂ O	8.6
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	KI	0.83
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25
Na ₂ - EDTA	37.3	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
COMPUESTOS ORGÁNICOS.			
Myo-inositol	100 mg/l	Glicina	2.0 mg/l
Ac. Nicotínico	0.5 mg/l	Sacarosa	30 gr./l
piridoxina	0.5 mg/l	Agar	6.0 gr./l
Tiamina	0.1 mg/l		

Fuente: Gamborg, et al 1976.

En la mayoría de las investigaciones del cultivo *in vitro* en Papa (*Solanum tuberosum* L.), el medio básico utilizado deriva de la fórmula del MS

Existen variaciones del medio según el objetivo, en el Centro Internacional de la Papa (CIP) se trabaja con diferentes medios de acuerdo al trabajo a realizar (Espinoza et al., 1992), entre los que se encuentran

1) -Con la finalidad de establecer meristemos, se consideran los siguientes tratamientos

- Medio A MS + AG₁(0.1 mg/L) + Kinetina(0.04 mg/L) + 2.5% Sacarosa + 0.6% Agar.
- Medio B MS + AG₁(0.1 mg/L) + Putresina HCl.(20.0 mg/L) + 2.5% Sacarosa + 0.6% Agar

2) Con la finalidad de multiplicación

- Medio C MS + Ac. fólico(1.0 mg/L) + Agua de coco(50 cm³) + L-Arginina HCl(4.0 mg/L) + putresina(10 mg/L) + Pantotenato de calcio(2 mg/L) + 3% Sacarosa + 0.8 % Agar
- Medio D MS + AG₁(0.1 mg/L) + 2.5% Sacarosa + 0.8% Agar
- Medio I MS + AG₃(0.4 mg/L) + ANA(0.01 mg/L) + BA(0.5 mg/L) + 2% Sacarosa

3) -Con el objetivo de mínimo crecimiento

- Medio E MS + 4% Sorbitol + 2% Sacarosa + 0.8% Agar
- Medio H MS + 4% Manitol + 3% Sacarosa + 0.8% Agar

4) -Con la finalidad de transportar material vegetal fresco

- Medio F MS + GA₃(1 mg/L) + 2.5% Sacarosa + 1% Agar

5) -Con la finalidad de inducir la tuberización se practican comúnmente y en muchos de los laboratorios comerciales los siguientes medios de cultivo (Ortiz, 1986)

- Medio Palmer y Smith. MS + Cinetina(2.5 mg/L) + 60 g Sacarosa + 0.7% Agar
- Medio Wattimena et al. MS + Cinetina(3.5 mg/L) + 60 g Sacarosa + 0.7% Agar.

- Medio Wang y Hu MS + BA(10 mg/L) + 80 g Sacarosa + 0.7% Agar
- Medio Stalknecht MS + Coumarina(25 mg/L) + 60 g Sacarosa + 0.7% Agar

6) -Algunos otros medios utilizados (Carputo et al., 1995) con diferentes fines son

a) -Con la finalidad de cultivar callos

- Medio P31 MS + 2,4-D(5 mg/L) + Kinetina(0.25 mg/L) + 3% Sacarosa + 0.7% Agar
- Medio P51 MS + ANA(5 mg/L) + BA(1 mg/L) + 3% Sacarosa + 0.8% Agar

b) -Con la finalidad de regeneración de brotes

- MS + ANA(0.186 mg/L) + BA(2.25 mg/L) + 3% Sacarosa + 0.8% Agar, se puede sustituir el ANA con GA₃(5 mg/L)

Para el cultivo de protoplastos se utiliza un medio con las características anteriores excepto por la disminución a 1% de la sacarosa

2.3.1.-Componentes Inorgánicos

Los elementos necesarios para el soporte y manutención de la planta se dividen en macronutrientes y micronutrientes

a) Macronutrientes

Los tejidos en cultivo requieren de una fuente continua de compuestos inorgánicos. Además del carbono, oxígeno e hidrógeno, que forman cerca del 95% de la materia seca, los otros seis macronutrientes indispensables y más utilizados en el cultivo *in vitro* son: nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio y magnesio. El nitrógeno, el fósforo y el azufre son constituyentes fundamentales de los tejidos vegetales (proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Los otros tres, intervienen en la conservación de los equilibrios iónicos en la planta y sus efectos múltiples (Margará, 1988).

b) Micronutrientes

Los micronutrientes juegan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas. Los principales micronutrientes son hierro, cobre, zinc, manganeso, molibdeno y boro.

2.3.2.-Componentes Orgánicos

Las sustancias orgánicas son compuestos que contienen carbono, como los carbohidratos, hormonas, proteínas, vitaminas, enzimas, etc. Estos compuestos usualmente no son proporcionados a las plantas, por que normalmente estas elaboran los suyos. Sin embargo, las plantas en cultivo *in vitro* o son demasiado pequeñas o incompletas para sintetizar ellas las sustancias orgánicas en su totalidad por lo que se necesita y debe añadir sustancias orgánicas en el medio de cultivo, con la finalidad de incrementar la capacidad autotrófica de las plantas (Kyte, 1990).

2.3.2.1.-Carbohidratos

Son sustancias orgánicas como los azúcares (mono y disacáridos), almidón y celulosa (polisacáridos), variando la cantidad y configuración de el carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O) los cuales forman los elementos primarios en la composición de las moléculas de estos compuestos. Estos elementos son generalmente suministrados por aire y agua principalmente como dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O). Son un producto indirecto de la fotosíntesis, el proceso por el cual, con la ayuda de la clorofila y la luz, convierten el CO_2 y el agua hacia carbohidratos y liberan oxígeno (Kyte, 1990).

Inicialmente se sugirió que la concentración de metabolitos originados de la fotosíntesis (especialmente carbohidratos, que aumentan la proporción de carbono/nitrogeno), son el factor causal de la tuberización Harris, 1978,citado por Ortiz,1986

2 3 2 1 1Azúcares

Los azúcares poseen la fórmula $(CH_2O)_n$. Existen muchas estructuras posibles que poseen esta fórmula, pero solo un número reducido de ellas son de importancia biológica. Además, hay varios azúcares cuyas fórmulas difieren por la pérdida de una molécula de oxígeno o una molécula de agua (Bidwell, 1993)

Los azúcares están involucrados en los procesos de diferenciación celular, favoreciendo la formación de elementos vasculares y de la clorofila en los cultivos (Margarita,1988). Además, son utilizados como fuente de energía y como reguladores osmóticos(Lopez,1991)

Los azúcares de importancia biológica y reportados en este trabajo están incluidos en la clasificación de los monosacáridos principalmente al grupo de las hexosas(azúcares de seis átomos de carbono), se encuentran comúnmente en la mayoría de las plantas, tanto en forma de componentes de algunos carbohidratos más complejos, así como disueltos en la célula, así como también los disacáridos compuestos de 2 moléculas de monosacáridos, además un grupo que también se considera son los azúcares alcoholes, caracterizados por que son producto de la reducción de azúcares(principalmente monosacáridos) en un alcohol(Bidwell, 1993)

También un grupo importante son los polisacáridos, que sin ser material inicial de fuente de carbono en este trabajo pueden ser utilizados como tales, pero siempre están presentes en el tejido vegetal como producto de la síntesis de los azúcares iniciales en forma de almidón y/o celulosa (Devlin,1982)

En el cultivo de plantas superiores *in vitro* estas raras veces resultan ser completamente autotroficas por lo que, tales cultivos son usualmente suplementados con azúcares exógenos, el crecimiento de plantas cultivadas *in vitro* son fuertemente influenciadas por los azúcares exógenos, normalmente suministrados al medio. Esto es como una positiva correlación entre la concentraciones de azúcar en el medio y la acumulación total de materia seca (Galzy y Campa, 1992, citados por Lipavska y Vreugdenhil, 1996). Esta interrelación, sin embargo, es solo válida para bajas concentraciones de azúcares. Pues a altas concentraciones, se observa una disminución en la acumulación de materia seca (Lipavska y Vreugdenhil, 1996).

Además, la concentración de azúcares depende mucho del tipo y edad del material vegetal, por ejemplo, los embriones muy jóvenes requieren concentraciones de azúcares relativamente altas. Generalmente el crecimiento y desarrollo aumentan con la concentración de azúcar, hasta que alcanza su óptimo, disminuyendo después para muy altas concentraciones (Pierik, 1990).

La sacarosa es el azúcar empleado universalmente, y le sigue en importancia la glucosa, maltosa, rafinosa, fructosa, galactosa, manosa y lactosa (López, 1991), ocasionalmente y de muy reciente empleo se incluye al manitol como fuente de energía, y como regulador osmótico (Lipavska y Vreugdenhil, 1996).

Sin embargo (Gambor y Phillips, 1995), consideran a la sacarosa, glucosa y en algunos casos la fructosa ser esencialmente las únicas fuentes de carbono con la finalidad de sustentar el crecimiento de células de plantas en cultivo de tejidos, mencionan que han sido observadas mutaciones en la utilización de otros azúcares como manosa y galactosa o alcoholes-azúcares, incluyendo el sorbitol.

2.3.2.1.2.-Características de los azúcares utilizados

D-Fructosa o levulosa (C₆ H₁₂ O₆), p.m.180.16 Es un monosacárido incluido en el grupo de las hexosas, se encuentra disuelta en forma libre en la célula o como constituyente de la sacarosa y el polisacárido inulina, es una cetosa por lo que se considera un azúcar reductor (Devlin, 1982), referido como sustancia responsable para el ajuste osmótico en tejidos bajo stress osmótico (Premachandra et al, 1992, citado por Lipavská y Vreugdenhil, 1996)

En cultivo de tejidos se hace referencia de su utilización en trabajos de germinación de semillas de orquídeas, encontrando que especies como *Phalsenopsis* presentan mejor respuesta (Ernest, 1971, citado por García, 1993)

En el medio de Knudson C se probó el efecto de diferentes azúcares sobre el índice de crecimiento de semillas de *Cattleya* sp encontrando a la fructosa como la tercer mejor respuesta (García, 1993)

Al utilizar fructosa sobre *Olea europea* se produjo un decrecimiento en la vitificación (Rugine, 1987, citado por Ziv en Gabor y Phillips, 1995)

En papa, se ha evaluado el contenido de ésta en brotes, se encuentra como la tercer azúcar asimilada en los tejidos cuando en el medio se incrementa la fuente de manitol (Lipavská y Vreugdenhil, 1996), se ha simulado su contenido en diferentes tejidos considerándolo entre los azúcares reductores (Hagen y Muneta, 1993, Muneta et al, 1990), sin embargo se carece de referencias de su utilización como fuente primaria de azúcar exógena

D-Glucosa o dextrosa ($C_6H_{12}O_6$), p.m. 180.16 Es un monosacárido incluido en el grupo de las hexosas, se encuentra disuelta en forma libre o constituyendo a la sacarosa, lactosa y los polisacáridos almidón y celulosa, es una aldosa por lo que se considera un azúcar reductor, forma parte de las reacciones de partida más importantes del metabolismo de los carbohidratos, con la fosforilación de la glucosa (Devlin, 1982, Bidwell, 1993)

Referida como una sustancia responsable del ajuste osmótico en tejidos bajo stress osmótico, la glucosa ocasionalmente se emplea en el cultivo de monocotiledóneas (Debergh y Zimmerman, 1991)

La glucosa es muy común en los tejidos de las plantas y en los hongos, por lo que las semillas de orquídea pueden utilizarla (Fresan, 1969), utilizando el medio de Kudson C y observando el efecto de diferentes azúcares sobre semillas de *Cattleya* sp se ubica a la glucosa como el segundo azúcar con mejor respuesta (García, 1993)

En la estabilización osmótica se utilizan combinaciones de azúcares como la glucosa con sacarosa, aunque estos azúcares pueden ser metabolizados por los protoplastos, lo que indica que nos son esenciales para la estabilización osmótica (Navarro y Vera, 1994)

En un trabajo preliminar (no publicado) sobre la proliferación de vid, se utilizó, encontrando que la influencia de esta sigue un patrón concentración-respuesta, en el cual a mayor concentración menor respuesta en número de brotes, siendo la glucosa la tercer mejor fuente y su nivel más bajo (0.0292 M) el tercer mejor entre el total de los tratamientos con un promedio de 3.5 brotes, además el crecimiento de estos tratamientos son significativamente superior a la fuente de lactosa y manitol (Datos del mismo autor, 1996)

En papa, glucosa y fructosa solo han sido estudiadas por el contenido de éstas en callos y brotes, considerandolas dentro de los azúcares reductores (Hagen y Muneta,1993, Lipavska y Vreugdenhil, 1996,Muneta et al.,1990) no se encontraron investigaciones donde se haya usado como fuente de carbon inicial suplementada al medio de cultivo

D-Lactosa (C₁₂H₂₂O₁₁) p.m. 360.30 Es un disacarido compuesto por una molecula de galactosa y una de glucosa unidos por un puente galactosa-1-4-glucosa, lo que le da un caracter de azúcar reductora, esto debido a la presencia del grupo reductor que conserva la glucosa (Bidwell,1993)

La lactosa esta considerada dentro de los azúcares que se emplean *in vitro*, confiriendole una mínima importancia en el cultivo (Lopez,1991)

Sin embargo, mucha atención ha tenido recientemente y hasta ha valido la pena en el mejoramiento de la embriogenesis en cultivo de anteras por el reemplazo de sacarosa por cualquier otra fuente de carbon, particularmente con maltosa y lactosa(Rihova y Tupy, 1996)

En papa se ha ensayado la maltosa pero hasta muy recientemente se ha trabajado con lactosa, esta fue evaluada en combinación con la auxina 2,4-D, encontrandose una relación sinérgica de éstas al incrementarse la embriogenesis en el cultivo de anteras de varios genotipos (Rihová y Tupy, 1996)

En el trabajo preliminar sobre proliferacion en vid, esta sigue un patron concentración respuesta en el cual la lactosa presenta la cuarta mejor fuente y su nivel mas bajo (0.0292 M) el cuarto mejor entre el total de los tratamientos con 3 25 brotes y su desarrollo similar a la fuente manitol.

Manitol (C₆H₁₂O₆) p.m. 182.17 Es un azúcar-alcóhol resultante de la reducción del monosacárido manosa, agrupado como alcohol polihídrico está con frecuencia en la naturaleza como azúcar de reserva, particularmente en plantas primitivas y frutos de plantas superiores, al ser un producto en el cual el oxígeno aldehídico de la manosa se reduce a alcohol, este pierde sus características reductoras por lo que se considera un azúcar no reductor(Devlin, 1982)

Es producido por algunas plantas como producto primario de la fotosíntesis, algunas plantas pueden metabolizarlo, otras son incapaces de metabolizarlo, aunque células de esas plantas pueden potencialmente absorber el manitol de manera lenta (Tholakalabavi, 1994, Ribaut y Pilet, 1991, citados por Lipavská y Vreugdenhil, 1996)

Michayluk y Kao, 1975, utilizaron varios azúcares y alcoholes-azúcares como estabilizadores osmóticos, seleccionando con mayor frecuencia el manitol, el cual penetra muy despacio en las células, por lo que comúnmente se utiliza para simular stress osmótico(Navarro y Vera, 1994).

Se reporta un crecimiento normal de semillas de orquídeas sobre un medio suplementado con manitol(García, 1993)

En papa recientemente se evaluó su absorción por los tejidos de las plantas, concluyendo que este es absorbido y transportado rápidamente, encontrando que los contenidos de manitol representan hasta el 20% del peso seco, indicando esto que es sin duda ocupado por las plantas *in vitro* y transportado hacia los brotes (Lipavská y Vreugdenhil, 1996)

El trabajo preliminar en vid, reporta al manitol como la mejor fuente y su nivel mas bajo (0 0292 M) el que presento mejor respuesta de el total de los tratamientos con 4 41 brotes, pero cortos 1 25 cm en promedio, continuando la sacarosa como segunda mejor fuente y su tratamiento medio como el segundo con mejor respuesta con 3 83 y un promedio 3 cm (datos del mismo autor, 1996)

D-Sacarosa o azúcar de mesa ($C_{12}H_{22}O_{11}$) p.m. 342,30 Es un disacárido compuesto por una molécula de glucosa y una molécula de fructosa unidos por un puente glucosa-1 2-fructosa lo que la caracteriza como un azúcar no reductor, esto es debido a que los grupos reductores de los azúcares sencillos intervienen en el puente que los une, esto se realiza por la eliminación de una molécula de agua (Devlin, 1982, Bidwell, 1993)

Es la principal forma de transporte de los azúcares a través de las plantas superiores, por lo que resulta muy abundante en los tejidos, esto es, se sintetizan y transportan en forma natural (Bidwell, 1993)

Pero las plantas crecidas en un medio para cultivo de tejidos no pueden sintetizar todos los azúcares que ellas requieren, por lo que una alta concentración de sacarosa, 30gr/l, es especificada en la mayor parte de las formulas de los medios de cultivo (Kyte, 1990)

Sin embargo, se señala que la concentración de sacarosa puede ser de 1-5% (Pierik, 1990)

En papa de acuerdo a la concentración de sacarosa en combinación con otras condiciones inductoras pueden señalarse como uso mas común los rangos de

1% para el medio de cultivo de protoplastos y cultivo de callos

2-3% para conservación, introducción de brotes, introducción de meristemos, propagación, exportación y cultivo de callos

4-5% para incrementar el número y peso de yemas florales

6-9% incrementa el número y peso de raíz, induce tuberización y a 8% acorta el tiempo de producción de tubérculos. Además, a partir del 6% que es el óptimo para el incremento del peso de la materia, comienza a decrecer el peso total

10% retarda la tuberización e inhibe el crecimiento de raíz

Independientemente de estas concentraciones, se hace evidente la utilización de la sacarosa como la fuente de carbono y energía más ampliamente utilizada, y en la que la mayoría de los autores coinciden en ajustar la concentración en función del tipo y edad del material, así como bajo metas específicas

2.3.2.2. Vitaminas

Varias vitaminas favorecen el crecimiento de los tejidos en cultivo *in vitro*. De todas las vitaminas empleadas, únicamente las del complejo B (tiamina, ácido nicotínico, piridoxina HCL) son necesarias y de estas, sólo a la tiamina se le reconoce un efecto neto, aportada generalmente a concentraciones de entre 0.1 y 1,0 mg/L. Un compuesto que frecuentemente se agrega a las vitaminas es el mio-inositol (no es propiamente una vitamina sino un azúcar-alcohol) Su efecto sobre la proliferación de tejidos y eventualmente sobre la activación de la organogénesis es, en ocasiones muy clara. Puede emplearse a fuertes concentraciones (50 a 500 mg/L) (Margará, 1988)

2 3 3 -Reguladores de Crecimiento

Las hormonas son, por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo, actúan generalmente en un lugar diferente a donde son producidos y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades aparte de estos productos naturales se han desarrollado otros de tipo sintético, que pueden tener una actividad semejante a la de los primeros. Al conjunto de estos productos sintéticos, junto con las hormonas, se denomina reguladores de crecimiento (Pierik, 1990)

Actualmente los reguladores de crecimiento se agrupan en cinco tipos básicos auxina, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno

Los principios de la técnica de cultivo *in vitro*, así como su desarrollo posterior, reposan en parte en el conocimiento y utilización de las auxinas. La expansión actual de las investigaciones sobre la organogénesis y las aplicaciones a la multiplicación vegetativa está ampliamente ligada a la utilización conjunta o secuencial de auxinas y citoquininas (Margará, 1988)

Existe una interacción entre auxinas y citoquininas que dan lugar a expresiones del crecimiento. Cuando la concentración de citoquininas es mayor que el contenido de auxinas, se desarrollan brotes y/o yemas adventicias, pero cuando los niveles de citoquinina son menores que los de auxinas, se produce un desarrollo de raíces. Cuando la relación es intermedia se desarrollan callos no diferenciados (Cruz, 1996)

La importancia de las giberelinas en el cultivo *in vitro* parece mucho menor y generalmente este grupo de compuestos no se utiliza (Pierik, 1990)

El ácido abscísico (ABA) y los compuestos que desprenden etileno solamente se han utilizado en algún caso excepcional (Margará, 1988)

2.3.3.1 -Auxinas

Las auxinas participan ampliamente en la organización de los procesos vegetales (Barba, 1994), generalmente producen elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias, inhiben la formación de vastagos axilares y adventicios, frecuentemente favorecen la embriogénesis en los cultivos en suspensión (Pierik, 1990)

Las auxinas sintéticas y relativamente más activas que se añaden frecuentemente a los medios de cultivo son ácido indol butírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) se utilizan en concentraciones de 0.001 a 10.0 mg/L (Pierik, 1990)

El ácido indol acético es una auxina que se produce en forma natural en las plantas, se agrega a los medios en concentraciones de 0.01 a 10.0 mg/L, pero tienen el inconveniente de degradarse fácilmente con la luz (Pierik, 1990)

EL AIA y el AIB son auxinas relativamente débiles, el ANA es una auxina fuerte, muy estable, utilizada especialmente en provocar la rizogénesis, el 2,4-D es una auxina muy fuerte que se hace tóxica para concentraciones elevadas y provoca la reacción hiperhídrica de los tejidos. Con frecuencia resulta poco eficaz sobre la organogénesis (Margara, 1988). Sin embargo el uso de fluorodina (un herbicida) e incremento en sacarosa estimulan el mejor desarrollo de las plantas *in vitro* de diferentes especies del género *solanum* (Rihova y Tupy, 1996)

En lo referente a la utilización de auxinas en papa no se reporta la utilización de AIB, y usualmente se utiliza la auxina ANA, por ejemplo en combinación con la coumarina esencialmente inhiben la iniciación a la tuberización en concentraciones mayores a 0.5 mg/L (Stallknecht y Farnsworth, 1982).

2.3.3.2 -Citocininas

Las citocininas promueven la división celular, generalmente inhiben el crecimiento de las raíces, pudiendo estimular en muy bajas concentraciones la iniciación del crecimiento de las raíces laterales, además inhiben la elongación del tallo, pero estimulan el alargamiento de las hojas, actúan en el retraso de la senescencia, en la disminución de la dominancia apical y tienen un papel fundamental en la organogénesis (Pierik, 1990, Barba, 1994), ya que pueden ser inducidas yemas en tejidos *in vitro* de callo, hojas, raíces, cotiledones o secciones de tallo

La inducción de órganos por las citocininas está encaminada a la formación de yemas, las cuales son obtenidas con base en una proporción de citocininas alta con respecto a las auxinas (Barba, 1994)

Las citocininas que se utilizan con mayor frecuencia para estimular el crecimiento y el desarrollo *in vitro* son 6-furfurilaminopurina (Kinetina), 6-bencilaminopurina (BA), 2-isopentiladenina (2iP) y 6-(4-hidroxi-3-metil-2-butenilamino)purina (Zeatina) (Pierik, 1990) La citocinina 6-bencilaminopurina se utiliza con frecuencia debido a su gran actividad y bajo costo (Margara, 1988)

En cuanto a la utilización del BA como suplemento de citocininas en el cultivo *in vitro* de papa se cuentan con estudios que la relacionan con la inducción a la tuberización, encontrando como óptimo para este fin una concentración de 10 mg/L (Wang y Hu, 1982)

En el CIP se utiliza en concentraciones de 0.5 mg/L. con la finalidad de propagación (Espinoza et al., 1992), para la regeneración de brotes se utiliza una concentración de 2.25 mg/L (Carputo et al., 1995), con fines de embriogénesis se practica la concentración 1.0 mg/L. (Rihova y Tupy, 1996)

2.3.4 Agentes Gelificantes

Muchos cultivos se desarrollan en un medio líquido sin necesidad de un soporte para el explante si bien se logra crecimiento en algunos casos, casi nunca se observa organogénesis. Es así que en muchos cultivos se utiliza un medio líquido incorporando un puente de papel filtro sobre el cual se deposita el explante (Pierik, 1990), siendo contradictorio para el caso de la inducción a la tuberización en papa, ya que es común utilizar medio líquido en agitación (Estrada, 1992, citado por Akita y Takayama, 1994) y estos autores reportan el uso de una técnica similar basada en un bioreactor.

Cuando se utiliza soporte es común un agente gelificante y el mayormente utilizado es el agar, una sustancia derivada de algas la solidez del medio varía de acuerdo a la cantidad agregada, generalmente se utiliza un rango de 7 a 8 g/l. Este va a variar según la pureza del compuesto y la fineza de su preparación (Pierik, 1990).

2.3.5 pH

El pH del medio de cultivo debe ser tal que no altere la función de las membranas celulares o el sistema buffer de citoplasma (Guevara, citado por Vieyra, 1993). Se considera que un pH en el rango de 5.0 a 6.5 es apto para el crecimiento y desarrollo *in vitro*. Si el pH es demasiado bajo pueden presentarse las siguientes complicaciones (Pierik, 1990):

- a) La auxina AIA y el ácido giberélico se vuelven menos estables
- b) El agar pierde su rigidez
- c) Algunas sales (fosfato o hierro) pueden precipitarse
- d) La vitamina B₁ y el ácido pantoténico se vuelven menos estables
- e) Se retarda la absorción de iones amonio

2.4 Condiciones de Cultivo

En el cultivo *in vitro* de meristemos apicales de papa, generalmente los inoculos son sometidos a condiciones de incubación de 20 a 23°C de temperatura, y una intensidad lumínica de 2000 a 4000 lux y un fotoperiodo de 16 horas-luz. A temperaturas de 29°C algunos cultivares crecen rápidamente y desarrollan plantas enraizadas en 5 semanas, el desarrollo en otras es anormal, a 26°C el desarrollo es lento (Mellor, citado por Solorzano, 1983)

La manipulación de los factores físicos del cultivo para una organogénesis específica es de amplia difusión, por ejemplo, para inducir la tuberización se han modificado entre otros factores el fotoperiodo, el cual se modifica a 8 horas de luz o se realiza el cultivo en oscuridad total

Además, para la multiplicación masiva de microtubérculos se ha difundido el uso de contenedores de gran capacidad (usualmente de 8 litros) y que permiten la manipulación de diferentes temperaturas en áreas específicas de el mismo contenedor, así como la utilización de aire estéril, el cual se realiza a razón de 200 a 600 mlmin⁻¹ (Akita y Takayama, 1994)

3 -MATERIALES Y METODOS

3.1 Ubicación del Experimento

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Departamento de Ciencias Agrícolas de la Facultad de Estudios Superiores Cuahuitlán

3.2 Material Biológico

Se utilizó en este trabajo como explante ápices provenientes de yemas axilares de papa (*Solanum tuberosum* cv. alpha) producida en Páramo de Morelos Chihuahua, en el ciclo de producción primavera-verano 1995 con características de "semilla para siembra" categoría registrada 2, proporcionada por productores de la zona de Tlaxcala

3.3 Medios de cultivo

Se emplearon modificaciones del medio de Murashige y Skoog (MS) con los macronutrientes al 50% de su concentración

En el proceso de establecimiento y desarrollo, el medio base fue el MS al 50% + AIB(0.1 mg/L) + BA(0.5 mg/L) + agar 6 g/L, al cual se le suplementaron los doce tratamientos de las diferentes fuentes de azúcares

En el proceso de multiplicación o proliferación, el medio base fue el MS al 50% + sacarosa (0.0584 M) + agar 6 g/L, al cual se suplementó con los ocho tratamientos de las diferentes fuentes de auxinas

Así mismo en la evaluación de la fructosa, el medio base fue el MS al 50% + BA(0.5 mg/L) + ANA(0.05 mg/L) + agar 6 g/L, al cual se suplementaron las diferentes concentraciones de la fuente.

3.4 Acondicionamiento

Tubérculos brotados se sembraron en un sustrato esterilizado, compuesto por una mezcla de vermiculita, insulex y tierra negra en una proporción 1:1:1 v/v, seguido de un riego de establecimiento y complementando la humedad de acuerdo a el requerimiento del sustrato considerado por la utilización de un tensiometro, se mantuvo en la sala de incubación por 30 días.

3.5 Desinfección

De la planta madre se cortaron segmentos con una yema axilar colocandolos en agua. Se lava el material con detergente comercial, se enjuagan y colocan en una solución de hexetidina (6 mL/L) por 10 minutos, se trasladan a una solución de alcohol al 70% por 3 minutos, agregando una gota de twenn 80, prosiguiendo a sumergir el material en una solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 15 minutos en agitación. Se enjuagaron con agua destilada y esterilizada por cuatro tiempos en la campana de flujo laminar.

3.6 Establecimiento

Se realizo dentro de la campana de flujo laminar y se inicia con la separación de las hojas grandes retirando después un par o dos de bracteas que envuelven el ápice, este proceso se realiza con la ayuda de un microscopio estereoscópico, haciendo el corte del explante y colocando uno por tubo, de acuerdo a los tratamientos a evaluar.

3.6.1 Diseño experimental

El diseño experimental utilizado (Cuadro 9) para el análisis estadístico de los datos fue un completamente al azar, con 12 tratamientos y 12 repeticiones. Quedando de la siguiente manera:

Cuadro 9. Descripción de los tratamientos en el establecimiento y desarrollo

tratamiento	Características
1	medio base* ¹ + sacarosa 0 0876 M
2	" " + sacarosa 0 0584 M
3	" " + sacarosa 0 0292 M
4	" " + lactosa 0 0876 M
5	" " + lactosa 0 0584 M
6	" " + lactosa 0 0292 M
7	" " + glucosa 0 0876 M
8	" " + glucosa 0 0584 M
9	" " + glucosa 0 0292 M
10	" " + manitol 0 0876 M
11	" " + manitol 0 0584 M
12	" " + manitol 0 0292 M

Nota: *¹ MS al 50% + AIB(0.1 mg/L) + BA(0.5 mg/L) + agar 6 g/L.

3.6.2 Variables de estudio.

Se evalúa la técnica de desinfección y manejo considerando

% de contaminación a las 72 horas, % de sobrevivencia a los 40 días % de desarrollo a los 60 días.

Debido a que en esta etapa ocurren procesos organogénicos se evalúa

Número de brotes, tamaño de brotes, a los cuales se les aplicó un análisis de varianza (Cuadro 13) y prueba de comparación de medias por el método de Tukey (Cuadro 14)

Se evaluaron de manera porcentual las variables número de raíces y formación de callo.

3.7 Multiplicación

3.7.1 Material utilizado

Se utilizaron segmentos nodales provenientes de cultivo aséptico de aproximadamente 2 cm o con tres nudos, los cuales fueron incubados en la etapa de establecimiento y desarrollo en el tratamiento dos. Se ensavaron 2 fuentes de auxinas (ANA y AIB) a tres concentraciones diferentes, evaluando su efecto en la proliferación de brotes.

3.7.2 Diseño experimental

El diseño experimental utilizado (Cuadro 10) para el análisis estadístico de los datos fue un completamente al azar, constando de 8 tratamientos y 13 repeticiones cada uno

Cuadro 10. Descripción de los tratamientos en la multiplicación.

Numero de tratamiento	Características
1	M S + sacarosa 0.0584 M Sin suplemento de reguladores de crecimiento
2	M S + BA(0.5 mg/L) + sacarosa 0.0584 M
3	M S + BA(0.5 mg/L) + ANA(0.01 mg/L) + sacarosa 0.0584 M
4	M S + BA(0.5 mg/L) + ANA(0.05 mg/L) + sacarosa 0.0584 M
5	M S + BA(0.5 mg/L) + ANA(0.1 mg/L) + sacarosa 0.0584 M
6	M S + BA(0.5 mg/L) + AIB(0.01 mg/L) + sacarosa 0.0584 M
7	M S + BA(0.5 mg/L) + AIB(0.05 mg/L) + sacarosa 0.0584 M
8	M S + BA(0.5 mg/L) + AIB(0.1 mg/L) + sacarosa 0.0584 M

3.7.3 Variables de estudio

En esta etapa se evaluó la proliferación considerando

Numero y tamaño de brotes, a los cuales se les aplico un análisis de varianza (Cuadro 15) y prueba de comparación de medias por el método de Tukey (Cuadro 16).

Se evaluaron de manera porcentual las variables numero de raices, formación de callo y contaminación.

3.8 Evaluación de fructosa

3.8.1 Material utilizado

El material utilizado fueron segmentos nodales de aproximadamente 2 cm o con tres nudos, incubados en la etapa de multiplicación en el tratamiento uno(M S sin suplemento de reguladores de crecimiento + sacarosa 0.0584 M) Se ensaya la fructosa con tres concentraciones diferentes,

3.8.2. Diseño experimental

El diseño experimental utilizado (Cuadro 11), para el análisis de los datos fue un completamente al azar, constanding de 3 tratamientos con 13 repeticiones cada uno, agrupado de la siguiente manera:

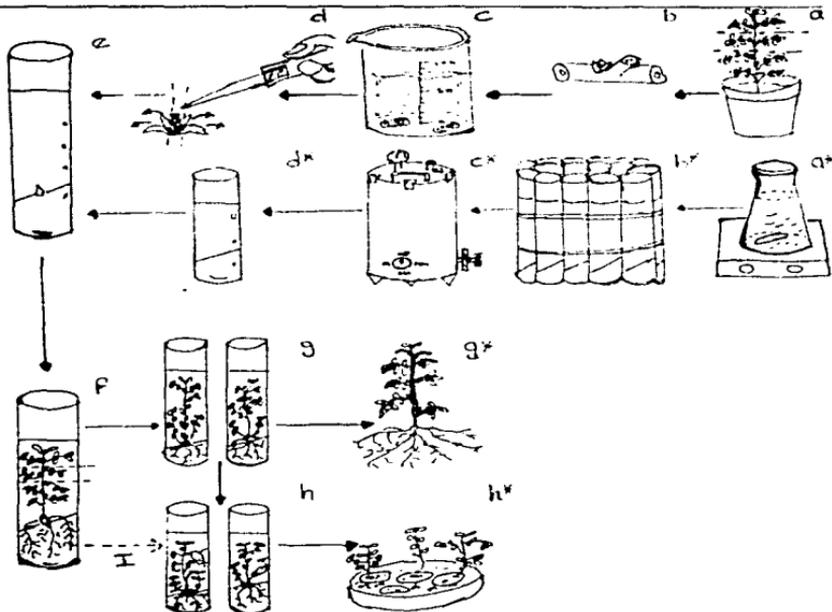
Cuadro 11.Descripción de los tratamientos en la evaluación de fructosa.	
Numero de tratamiento	Características
1	M S + BA(0.5 mg/l) + ANA(0.05) + fructosa 0.0876 M
2	M S + BA(0.5 mg/l) + ANA(0.05) + fructosa 0.0584 M
3	M S + BA(0.5 mg/l) + ANA(0.05) + fructosa 0.0292 M

3.8.3. Parametros evaluados

En esta etapa se evaluaron numero y tamaño de brotes a los cuales se les aplico un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias por el método de Tukey.

También se evaluaron de una manera porcentual: enraizamiento, callo, tuberización y contaminación.

Fig 2 Secuencia técnica de la micropropagación de papa realizada



a) corte de la planta madre, b) segmento nodal, c) desinfección, d) disección del ápice;
 a*) preparación del medio, b*) vaciado de los medios, c*) esterilización del medio, d*) tubo con medio esterilizado, e) establecimiento, f) corte de segmento nodal del esplante desarrollado, g) multiplicación, g*) obtención de vitroplantas, h) evaluación de fructosa, h*) obtención de microtubérculos; i) vía alterna

4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Acondicionamiento

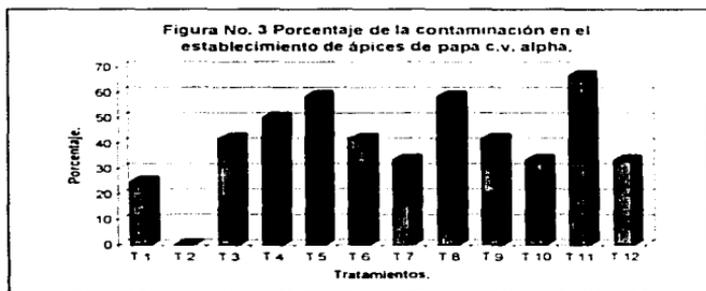
En la etapa de acondicionamiento de plantas madre se obtuvo material suficiente en 30 días, comprobando la eficacia del sustrato para proporcionar un soporte satisfactorio, sin embargo, como este material influye directamente en el proceso de establecimiento como fuente importante de contaminación (Degeergh y Zimmerman, 1991) se considera necesario realizar una subfase de esterilización, manejando el tubérculo que se sembrará en una sumersión con 0.5% de hipoclorito de sodio por 20 minutos seguido de un enjuague con agua corriente, dejando secar los tubérculos al aire previo a la siembra (Slack y Tufford, 1995), así como la aplicación de soluciones nutritivas y agroquímicos preventivos para mantener la sanidad después de la siembra, aun cuando se utilice semilla certificada. (Hussey and Stacey, 1981).

4.2 Contaminación

El método de desinfección de material vegetal resultó ser efectivo en un 60% en todo el experimento, considerándolo bueno, tomando en consideración que no se aplicó la subfase de esterilización que propone Slack y Tufford, 1995, así como la fase de postesterilización que recomiendan los mismos autores, a lo que hay que agregar que el material utilizado no fue semilla certificada, siendo esta condición necesaria sugerida por Hussey and Stacey (1981) quienes reportan un 70% de efectividad, además de la procedencia del inóculo o explante, ya que si este procede de campo existe mayor posibilidad de tener índices de contaminación altos, que si este creció bajo condiciones de invernadero, además debemos considerar la anatomía de la yema, debido a que esta envuelve con hojas primarias o brácteas el ápice, lo que hace más complicado tener buenas condiciones de aséptica (Pierik, 1990), lo cual puede corregirse implementando una

etapa de desinfeccion en la campana despues de eliminar cada capa de hojas (bracteas), esta se realiza con cloro comercial en mayor dilucion que en la fase de esterizacion propiamente dicha(Slack y Tufford,1995)

Considerando la efectividad de acuerdo a fuente y concentracion empleada(Figura 3), encontramos que la que menor porcentaje presento fue la sacarosa representando el 13.79% del total de contaminacion, sobresaliendo dentro de esta fuente y en todo el experimento la concentracion 0.0584 M de sacarosa con un 100% de material libre, las fuentes que continuaron en efectividad fueron la glucosa y manitol con un 27.58% de contaminacion, y la lactosa con 31.03% que representa la fuente mas contaminada, presentandose una constante en funcion de los tratamientos excepto en sacarosa, el cual nos indica que las fuentes con concentracion de 0.0584 M, presentan los porcentajes mas alto de contaminacion

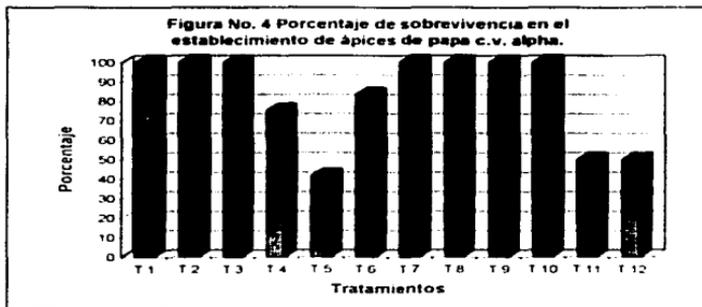


4.3 Sobrevivencia.

En lo que respecta al porcentaje de sobrevivencia se obtuvo un 82.63% en todo el experimento mejorando el porcentaje de 70% que reporta Hussey and Stacey(1981) trabajando con segmentos nodales, esto debido a que ellos desecharon las unidades experimentales contaminadas, siendo que estas presentan tolerancia a la contaminación, además que esta es fácil de eliminar cuando se presenta en la base del inoculo y esta caracterizada por invasión de bacterias (Slack y Tufford ,1995)

Además el resultado se encuentra dentro del 63-94% que reporta Mora(1991), trabajando con diferentes concentraciones de ASA en yemas axilares de clones producidos *in vitro*. Situación que hay que tener presente, ya que el material utilizado por estos autores provenia de condiciones asépticas, que comparado con el material vegetal utilizado, el cual provenia de campo, presenta serias ventajas

Las fuentes que mejor respuesta presentaron fueron la sacarosa, glucosa y la concentración mas alta de manitol con el 100% de sobrevivencia en sus respectivos tratamientos(Figura 4), siguiendo los tratamientos de manitol con un 50%, siendo la lactosa en su nivel medio el que menos sobrevivencia presento con el 41%



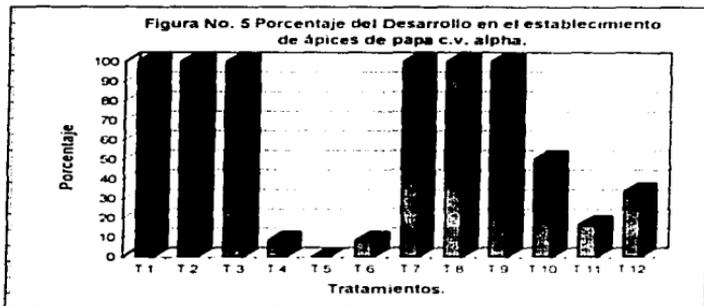
4.4 Porcentaje de Desarrollo

Con respecto al porcentaje de desarrollo (Figura 5), encontramos que el 59.72% total de explantes desarrollados mejora el 5.4% que reporta Solorzano (1983) quien utiliza como explante meristemas apicales mas un primordio foliar, así como el porcentaje menor a 50% que reporta Mora (1991) utilizando yemas axilares de clones cultivados *in vitro*. Lo que concuerda con Stace et al. (1977), citado por Solorzano, 1983, quienes afirman que el desarrollo del inoculo está determinado por la presencia de primordios de hoja, pero el tamaño de este tiene la influencia en la obtención de plantas completas y que a su vez estén libres de patógenos,

Así, se ha observado que a mayor tamaño del inoculo el éxito del desarrollo de este será mayor, pero el porcentaje de plantas que se encuentren libres de enfermedades será menor, en

caso, inverso cuando el tamaño del inoculo es pequeño, la probabilidad de éxito es muy baja hasta un 10%, y el porcentaje de plantas libres de enfermedades sera alto

Además, se encuentra un porcentaje diferente en función de la fuente, para la sacarosa y glucosa se presenta un 100% de desarrollo en todos sus tratamientos, siguiendo el manitol con un 33% de explantes desarrollados, siendo la lactosa la fuente que presento la respuesta mas baja con un 5.55% de desarrollo



Cabe hacer notar que aun cuando el porcentaje de sobrevivencia en lactosa y manitol estuvo en un 40-50% el porcentaje de desarrollo fue menor a 33%, este efecto esta bien documentado en el caso el manitol el cual es utilizado como simulador de stress osmótico inhibiendo el desarrollo con su respectiva disminucion en la acumulaci3n de la materia , lo que podria indicar una inhibici3n del desarrollo de ápices en brotes, situaci3n que se da por la lentitud con la que las células absorben y transportan esta fuente (Lipavska y Vrengdenhil, 1996, Navarro

y Vera, 1994), situación que podría presentarse de manera similar en la lactosa, la cual ha tenido buena respuesta en otras técnicas de cultivo (anteras), (Rihova y Tupy, 1996), lo que demuestra que las plantas si utilizan esta fuente

4.5 Establecimiento y Desarrollo

Debido a que en esta etapa se dan procesos organogénicos y que la finalidad de este trabajo es la propagación masiva, se evaluó el número de brotes y tamaño de brotes (Cuadro 12)

4.5.1 Número de brotes

En esta etapa la fuente con mejor respuesta fue la sacarosa (Figura 6), siendo los tratamientos uno y dos estadísticamente iguales con 3.66 brotes por explante, el cual resulta mejor que el reportado por Mora 1991, quien encuentra como mejor respuesta 3 brotes por explante, a los 75 días manejando diferentes concentraciones de ASA en yemas axilares de plantas *in vitro* utilizando un medio MS suplementadas con GA₁ (0.25 mg/L) + 3% de sacarosa, y resulta inferior al rango de 5-10 que reporta Solorzano (1983), quien utiliza MS + GA₁ (0.5 mg/L) + BA (0.25 mg/L) a los 77 días y 3% de sacarosa, sobre meristemos apicales, lo que sugiere que la respuesta está fuertemente influenciada por el suplemento de reguladores de crecimiento, situación que corrobora el potencial regenerativo de el explante, ya que desde la etapa de establecimiento comienza a proliferar, reforzando la sugerencia de combinar la fuente de citocininas, auxinas y controversialmente de giberelinas, ya que trabajos realizados con esta última fuente ha encontrado que resulta desfavorable o sin efecto (Solorzano, 1983, Mora, 1991, Ortiz, 1986), coincidiendo en la importancia que presenta la incorporación de citocininas para inducir organogénesis (Wang y Hu, 1982, Lozoya, 1992.)

Cuadro 12. Efecto de las concentraciones de azúcares exógenos sobre el número y tamaño de brotes.

Tratamiento brotes	Características	Número de brotes	Tamaño de
1	sacarosa (0 0876 M)	3 66	2 62
2	sacarosa (0 0584 M)	3 66	3 29
3	sacarosa (0 0292 M)	1 41	4 95
4	lactosa (0 0876 M)	0 25	0 25
5	lactosa (0 0584 M)	0 0	0 0
6	lactosa (0 0292 M)	0 25	0 25
7	glucosa (0 0876 M)	1 75	4 00
8	glucosa (0 0584 M)	1 25	3 25
9	glucosa (0 0292 M)	1 50	2 50
10	manitol (0 0876 M)	0 50	0 75
11	manitol (0 0584 M)	0 16	0 66
12	manitol (0 0292 M)	0 33	0 50

Cuadro 13. Análisis de varianza de la variable número de brotes.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
tratamiento	11	217 8541	19 8049	14 2409	1 78
error	132	183 5838	1 3907		
total	143	401 4375			

Cuadro 14. Comparación de medias en número de brotes mediante la prueba de Tukey.

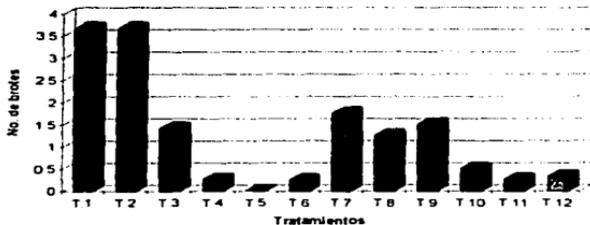
Trat 1	3.66 a
Trat 2	3.66 a
Trat 7	1.75 b
Trat 9	1.50 bc
Trat 3	1.41 bc
Trat 8	1.25 bc
Trat 10	0.50 bc
Trat 12	0.33 bc
Trat 4	0.25 bc
Trat 6	0.25 bc
trat 11	0.16 c
Trat 5	0.0 c

$$DMSH = 4.62 \sqrt{\frac{1.3907}{12}}$$

$$DMSH = 1.57$$

$$\alpha = 0.05 = 4.62$$

Figura No. 6 Número de brotes en el establecimiento de papa c.v. alpha



4.5.2 Tamaño de brote

La respuesta en el tamaño de brotes, es inversamente proporcional a la concentración en el caso de la sacarosa, esto es, a mayor concentración menor longitud, no correspondiendo para la glucosa que aumenta su tamaño en función del incremento en la concentración. Observando como mejor fuente a la sacarosa y en particular a el nivel bajo con una longitud de 4.25 cm, continuando con mejor respuesta los otros dos tratamientos de sacarosa así como los tratamientos de glucosa, y presentando diferencia significativa con respecto a los tratamientos con manitol y lactosa, los cuales se encuentran en rangos de 0 a 0.75 cm no encontrando diferencia estadística entre estas dos últimas fuentes (Figura 7), esta última circunstancia pudiera deberse a que la tasa de crecimiento se reduce por la alta presión osmótica, produciendo entrenudos cortos (Nelson, et al, 1992), además de que el stress hídrico provoca síntesis de ABA (Harvey et al, 1994)

Cuadro 15. Análisis de varianza del tamaño de brotes.

FV	GL.	SC	CM	Fc	Ft
Tratamiento	11	404.9358	36.8123	8.1506	1.78
Error	132	596.1875	4.565		
Total	143	1001.1233			

Cuadro.16 Comparación de medias en tamaño de brotes mediante la prueba de Tukey.

Trat 3	4.95 a
Trat. 7	4.00 ab
Trat 2	3.29 abc
Trat 8	3.25 abcd
Trat 1	2.62 abcde
Trat 9	2.50 abcde
Trat 10	0.75 cde
Trat 11	0.66 cde
Trat 12	0.50 cde
Trat 4	0.25 e
Trat 6	0.25 e
Trat 5	0.0 e

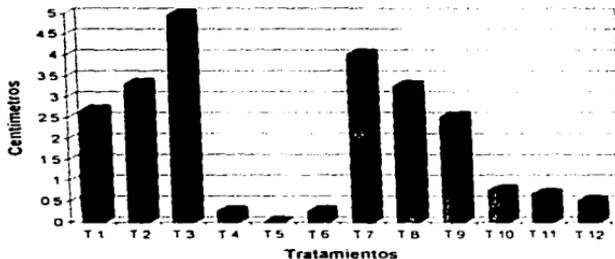
$$DMSH = 4.62$$

$$\sqrt{\frac{4.565}{12}}$$

$$DMSH = 2.8343$$

$$\alpha = 0.05 = 4.62$$

Figura No. 7 Tamaño de brotes de papa c.v. alpha.



4 5 3 Variables porcentuales

Con respecto a las variables porcentuales, cabe mencionar algunos datos sobresalientes en los cuales se presenta que el 100% de explantes tratados con las fuentes de glucosa y sacarosa, desarrollo raiz, tanto basales como adventicias

La formación de callo se ubica dentro del rango del 50% principalmente este porcentaje lo aportan los tratamientos de glucosa y sacarosa

Así mismo la inducción a tuberizar en el caso de la sacarosa, aunque solo en su concentración mayor, situación que concuerda con Wang y Hu, 1982 y Ortiz, 1986

Además se aprecia el desarrollo de brotes axilares, lo que confirma el efecto sinérgico que presentan los reguladores de crecimiento de acuerdo al balance hormonal utilizado BA/AIB (5 1) (Cruz, 1996, Pierik, 1990), quienes sugieren que este efecto se presenta por la adición de citocininas

4 6 Multiplicación

Debido a que en esta etapa se dan procesos organogénicos y que la finalidad de este trabajo es la propagación masiva, se evaluó el número de brotes y tamaño de brotes

4 6 1 Contaminación

En esta etapa el porcentaje de contaminación descendió totalmente al encontrarse un 100% de material libre de contaminación, esto debido a la procedencia del material, el cual permanecía libre en cultivo aséptico.

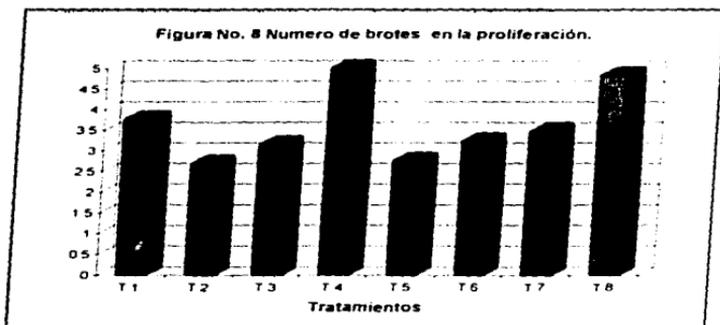
4.6.2. Numero de Brotes

Al realizarse el primer subcultivo con la finalidad de proliferar el material evaluando las fuentes y concentraciones de auxinas (cuadro 17), la fuente suplementada en el trat 4 presento un promedio de 5 brotes por explante siendo la mejor respuesta, sin embargo, no presento diferencia significativa con el resto de los tratamientos, presentándose la respuesta mas baja en el trat 5 con 2.76 explantes por brote, el cual presenta una inhibición de la brotación inclusive inferior a la mejor respuesta de la etapa de establecimiento y desarrollo, la cual incremento su radio de proliferación presentando un promedio de 4.28 en el trat 8, lo que en lo particular (y posiblemente se pudiera hacer extensivo al resto de los tratamientos) se explica esta tendencia a incrementar la tasa de proliferación en los subcultivos se deba a que el explante permanece en periodos prolongados en contacto con el medio, con lo cual desarrolla mecanismos de habituación que le permite tener una mejor respuesta a las condiciones *in vitro*, permitiendole tener una mejor respuesta en la proliferación (Vieyra, 1994)

Cuadro 17. Efecto de los reguladores de crecimiento en el numero y tamaño de brotes en la multiplicación.

Tratamiento	características	numero de brotes	tamaño de brote
4	BA(0.5) + ANA(0.05)	5.00	4.46
8	BA(0.5) + AIB(0.1)	4.84	4.28
1	sin reg. de crec.	3.76	9.84
2	BA(0.5)	3.69	3.07
7	BA(0.5) + AIB(0.05)	3.46	3.69
6	BA(0.5) + AIB(0.01)	3.23	2.84
3	BA(0.5) + ANA(0.01)	3.15	4.84
5	BA(0.5) + ANA(0.1)	2.76	5.53

(BA, ANA y AIB) expresados en mg/L.



En función de los resultados estos se confirman positivos al concordar con lo reportado por Mora(1991), quien en esta etapa reporta como mejor respuesta 6 brotes por explante a los 70 días utilizando yemas axilares de clones provenientes de cultivo aséptico evaluando concentraciones de ASA suplementando el medio de M S con $GA_3(0.40 \text{ mg/L}) + BA(0.5 \text{ mg/L}) + ANA(0.01 \text{ mg/L})$ y $ASA 10^{-7}$.

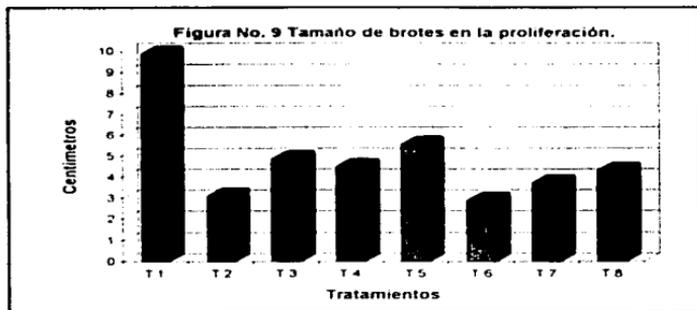
Así mismo se encuentra dentro del rango reportado por Solorzano(1983) quien obtuvo radios de 4-9 brotes por explante utilizando un medio M S. con $GA_3(0.50 \text{ mg/L}) + BA(0.25 \text{ mg/L}) + ANA(1.0 \text{ mg/L}) + 3\%$ de sacarosa

El mismo autor sugiere que con la adición de ANA a concentraciones mayores que BA se forman callos en la base del explante, lo que origina el desarrollo de innumerables brotes apartir de un solo ápice , este hecho puede encontrar fundamento en que la acción principal de las auxinas es la estimulación celular y fomentar el desarrollo de callos(Pierik,1990, Kyte,1990), aunque contradictorio con Vieyra(1994) y Cruz(1996) quienes sugieren que la adición de las auxinas en el establecimiento y proliferación debe ser en concentraciones bajas en relación a la fuente de citocininas para promover la induccion de brotes

Los resultados sugieren una relación necesaria de auxina en baja cantidad con citocininas en mayor proporción, omitiendo la adición de giberelinas, lo que se expresa en el tratamiento 4 que presenta el mayor numero de brotes en función del tamaño de callo el cual presenta un promedio de 1 20 cm de diámetro

4 6 3 Tamaño de Brotes

En cuanto a la variable longitud de brote se encuentra que el tratamiento sin reguladores de crecimiento presento la mejor respuesta promediando 9 84 cm siendo significativamente superior al resto de los tratamientos que presentan igualdad estadística entre ellos, con rangos de 2 84 a 4 84 , coincidiendo con Solorzano(1983) quien obtiene longitudes con un rango de 3-5 cm , superado evidentemente por el tratamiento uno el cual coincide con la respuesta obtenida por Mora(1991) quien reporta un promedio de 8 2 cm , situación que evidencia la influencia en cuanto a presencia y manejo de los reguladores de crecimiento como promotores o inhibidores de la expresión del crecimiento del explante



4.6.4 Variables Porcentuales

Otras variables porcentuales que se consideran importantes son inducción a enraizamiento en la cual se observó un promedio de 7.84 raíces por explante en el tratamiento uno siendo estadísticamente semejante con el resto de los tratamientos excepto con el número 6 y 7 de AIB que presentan diferencia significativa con un promedio de 1.23 raíces por explante, cabe mencionar que el desarrollo de las mismas fue muy intenso inclusive cubriendo la totalidad del medio, lo cual presenta una mejor respuesta al reporte de Mora(1991) quien reporta una total inhibición del desarrollo de raíz, también se coincide con Solorzano (1983) quien reporta 100% de brotes con raíz.

En relación al porcentaje de formación de callo , este presenta un promedio de 1 20 cm de diámetro, excepto en el tratamiento 5 con 0 96 cm de diámetro, lo que permite evidenciar a la auxina ANA como una auxina fuerte en comparación con el AIB, lo que concuerda con Margara(1988), y evidencia la necesidad de incrementar la concentración de AIB para mejorar la respuesta, también hay que señalar que en todos los tratamientos se presentó formación de callo con menos respuesta en el tratamiento uno con un tamaño de 0 33 cm de diámetro lo que indica un efecto remanente de los reguladores suplementados en la fase anterior, con lo que se presentó un 100% de formación de callo

4 7 Evaluación de la Fructosa

Adicionalmente se considero la utilización de fructosa , una quinta fuente de azúcar En esta etapa no se presentó diferencia significativa al realizar el analisis de varianza para los parámetros numero y tamaño de brotes (Cuadro 18)

4 7.1 Contaminación

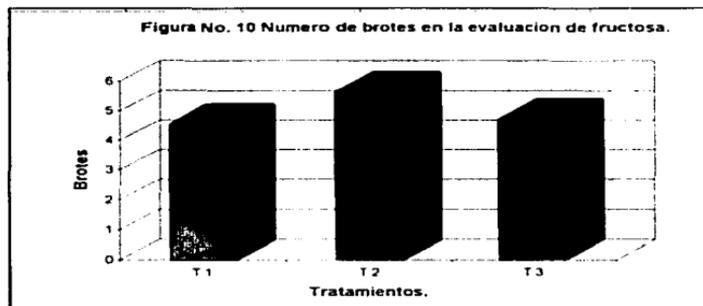
Se presentó incidencia de contaminación a un 33% de unidades contaminadas, lo que puede deberse a. 1) El medio presenta mayor enriquecimiento en su contenido, 2) el microorganismo muto y logro adaptarse a las condiciones prevalecientes, y 3) la que resulta mas probable, el manejo tanto del material utilizado(que la infección siempre haya estado presente y que solo al hacer contacto la incisión en el punto infectado presentó efecto), asi como el del instrumental(mala esterilización) y la destreza del trabajador

4 7 2 Numero de Brotes

La concentración que mejor respuesta presento fue el tratamiento dos con un promedio de 5 61 brotes por explante siguiendo el tratamiento tres con 4 69 brotes por explante y con la respuesta mas baja en el tratamiento uno con 4 53 brotes por explante(figura 10), lo que ratifica a la concentración 0 0584 como mejor respuesta tanto para sacarosa como para fructosa ya que no presenta diferencias significativas cuando son suplementadas con BA(0 5 mg/L) + ANA(0 05 mg/L)

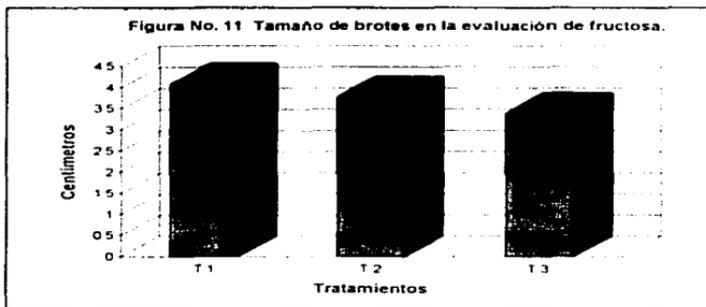
Cuadro 18. Efecto de las concentraciones de fructosa en el numero y tamaño de brotes.

Tratamiento	características	numero de brotes	tamaño de brotes
1	fructosa 0 0876 M	4 53	4 07
2	fructosa 0 0584 M	5 61	3 76
3	fructosa 0 0292 M	4 69	3 38



4.7.3. Tamaño de Brotes

La respuesta al evaluar el tamaño de brote se puede apreciar una relación concentración-respuesta, siendo de mayor a menor, lo que representa al tratamiento uno como mejor respuesta con 4.07 cm, siguiendo el tratamiento dos con 3.76 cm y con una menor respuesta el tratamiento tres con 3.38 cm.



4.7.4. Variables Porcentuales

Entre los factores porcentuales se observa un 100% de enraizamiento sin embargo disminuyendo en tamaño y número estimado para fases anteriores, observando una desdiferenciación de raíz a brote, conforme al tiempo transcurrido.

Se observa el 100% de formación de callo y se mantiene el tamaño promedio de 1.2 cm de diámetro coincidiendo con la fase anterior.

Además, en esta etapa se presentó como respuesta sobresaliente la formación de microtubérculos, con una relación concentración-respuesta, siendo esta de mayor a menor, lo que representa un 100% de explantes con tuberización en el tratamiento 1 y con una respuesta de 38 y 20 % en las siguientes concentraciones, lo que hace evidente la diferencia marcada en la inducción a la tuberización con concentraciones altas, de azúcares exógenos, destacando que con la misma concentración molar la sacarosa no indujo tuberización, o por lo menos no con la misma consistencia, situación que coincide con Solorzano, 1983, Mora 1991 y Ortiz 1986 quienes reportan formación de tubérculos en la última etapa del cultivo, aunque su reporte no indica un porcentaje mayor al 70%, hecho que está ampliamente documentado considerando que, botánicamente, los tubérculos son tallos modificados, y que los estímulos externos para que una yema se diferencie o no en un órgano de almacenamiento son fotoperíodos cortos, temperaturas nocturnas bajas y presencia de sacarosa en el medio 3-10%, aunado a la adición de citoquininas, tomando en cuenta la respuesta de la variedad a estos impulsos (Ortiz, 1986, Seabrook, 1993, Wang y Hu, 1982)

5 -CONCLUSIONES

La utilización de fuentes de azúcares como glucosa y sacarosa permitieron la obtención de plantas completas a los 60 días, el manitol y la lactosa inhibieron el desarrollo de ápices provenientes de yemas axilares, aunque dicha inhibición no siguió en la mayoría de los tratamientos la misma consistencia, además es de considerar la inducción de la tuberización ocasionada por la fructosa

La fuente con mejor respuesta a la introducción y desarrollo de ápices fue la sacarosa, que con la concentración 0.0584 M presentó la mejor obtención de plantas completas, así como un estímulo para la brotación cuando se suplementó al medio de proliferación, así mismo la concentración 0.0876 M de fructosa presentó la mejor respuesta para la inducción a tuberizar

La adición de la auxina AIB incrementa su respuesta en función de la concentración utilizada, favoreciendo la formación de brotes, siguiendo esta un gradiente de menor a mayor, concentraciones superiores a 0.05 mg/L de auxina ANA inhiben la formación de brotes, siendo esta misma concentración el límite de máxima respuesta, mientras que concentraciones de 0.5 mg/L de BA estimulan la proliferación, de tal forma que un balance hormonal de BA10 IANA presentó la mejor respuesta en la multiplicación masiva utilizando como fuentes energéticas la sacarosa y la fructosa

Los resultados demuestran la importancia de la manipulación de los estímulos exógenos (reguladores de crecimiento, suplementación de azúcares), para inducir organogénesis específica *in vitro* en papa.

La técnica utilizada, puede considerarse de utilidad en la propagación masiva de material valioso de papa, revalorizando la utilización de fuentes alternas de azúcares exógenos como suplemento en los medios de cultivo *in vitro*.

6.-Referencias bibliográficas

- Akita M y Takayama S 1994 Induction and development of potato tubers in a jar fermentor
Plan Cell, Tissue and Organ Culture 36 177-182
- Barajas O R E 1996 Biotecnología vs Revolución Verde ¿Una nueva revolución? La Jornada
Ecológica Suplemento pp 4-5 , La Jornada México D F Noviembre
- Barba, A A 1994 Reguladores del crecimiento vegetal En Hurtado, M D y Merino, M M
Cultivo de tejidos vegetales Edit Trillas México pp 48-66
- Bidwell R G S 1993 Fisiología Vegetal- A G T Editor pp 25-33 México D F
- Carpato D ,Cardi T,Chiar T ,Ferriarolo G ,Froschante L. , 1995 Tissue culture response in
various wild and cultivated solanum germoplasm accessions for exploitation in potato
breeding Plan Cell, Tissue and Organ Culture 41 151-158
- Coumou D 1992 Manual del cultivo de papa NIVAA En Hortalizas, Frutas y Flores Julio
- Cruz P F 1996 Apuntes del curso Micropropagación y sus generalidades F E S Cuahutitlan
UNAM Cuahutitlan Izcalli, Edo Mex
- Debergh, P C and Zimmerman, R H 1991 Micropropagation Technology and application Kluwer
Academic Publishewrs Dondrecht, Netherlands 219 p
- Devlin M R 1982 Fisiología Vegetal edit Omega pp 115-135 Barcelona España
- Editor. 1992 La papa reina de la agroindustria En Hortalizas, Frutas y Flores Julio pp 9-
11 México
- Engels, F. 1876 El papel del trabajo en la transformación del mono en hombre ed Cruzo, S.A.
1983 Mexico D F

- Espinoza N , Lizarraga R , Sigueñas C , Buitron F , Bryan J , Dooods J H 1992 Cultivo de tejidos Micropropagación, Conservación y Exportación de Germoplasma de papa CIP Lima, Perú
- Gamborg,O L , Murashige,T , Thorpe,T H and Vasil,Y K 1976 Plant Tissue Culture Media *In vitro* 12 473-478
- Gamborg,O L y Phillips G C 1995 Media preparation and Handling En Gamborg,O L y Phillips G C 1995 Plant Cell , Tissue and Organ Culture Springer Printed Germany
- García H J L 1993 Germinación asimbiótica de semillas de orquídea *in vitro*(*Catasetum* sp) Tesis Ing Agrícola F E S C UNAM
- Hagen R.S y Muneta P 1993 Effect of temperature in carbohydrate content, ADP glucose pyrophosphorylase, and ATP- and Ppi-depent phosphofructokinase activity of potato tuber callus tissue *Plant Cell, Tissue Organ culture* 32 115-121
- Harvey B.M R ,Bowden G ,Reavey C , and Selby C 1994 Stimulation of *in vitro* root and shoot growth of potato by increasing sucrose concentration in the presence of fluridone an inhibitor of abscisic acid synthesis *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37 271-276
- Hernández M R 1995 Primera muestra gastronomica de la papa El periodico del consumidor p 4 Noviembre,México D F
- Hussey G y Stacey J 1981 *In vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum* L) *Annals of Botany*. 48: 787-796.
- Jones D.E 1991 Progress in seed production tecnology *American Potato Journal*: 68: 247,248.
- Khuri S y Moorby J 1996 Nodal segments or microtubers as explants for *in vitro* microtuber production of potato *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45 215-222

- Kyte I. 1990 *Plants From Test Tubes and Introduction to Micropropagation*. Ed. Timber Press
Portland USA
- Levy D. 1985 Propagation of potato by direct transfer of in vitro proliferated shoot cuttings into
the field. *Scientia Horticulturae* 26: 105-109
- Lipavska H y Vreugdenhil D. 1996 Uptake of mannitol from the media by *in vitro* grown plants
Plant Cell, Tissue and Organ Culture 45: 101-107
- Lopez P C. 1991 Medios de cultivo. En Rosell, H C y Villalobos, A V. 1991. Fundamentos
teóricos prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO, Roma Italia
- Lozoya, H y Saldaña. 1992 Photoperiod, gibberellic acid, and kinetin, in potato flower
differentiation *in vitro*. *American Potato Journal*
- Margara J. 1988 *Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España
- Massiu T Y. 1996 La biotecnología y la preservación ecológica. La Jornada Ecológica,
Suplemento pp. 1-2, la jornada. México D.F. Noviembre
- Mercer R L. 1992 Nueva imagen de la papa en E U A. En *Hortalizas, Frutas y Flores*. Julio pp
12-14 México
- Mora H M E. 1991 Efecto del ASA en el crecimiento de yemas axilares de *Solanum tuberosum*
cultivados *in vitro*. Tesis. Licenciatura Biólogo. UNAM México
- Muneta P, Hagen, S, Leterneau, D, y Brown J. 1990 Effect of temperature on the sugar content
of potato callus tissue. *American potato Journal* 67: 209-215
- Murashige, T y Skoog, F. 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco
tissue cultures. *Physiol Plant* V15 (1): 473-497

- Navarro U S y Vera R E 1994 Historia del cultivo de tejidos vegetales. En Hurtado M D V y Merino M M E 1994 Cultivo de tejidos vegetales. ed Trillas Mexico D F
- Ortiz M J G 1986 Tuberización *in vitro* de papa (*Solanum* spp.) Tesis Biólogo. ENEP Iztacala UNAM
- Pierik R L M 1990 Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España
- Rihová L y Tupy J 1996 Influence of 2,4-D and lactose en embryogenesis in anther culture of potato. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 45: 269-272
- SARH 1994 Hortalizas y Ornamentales. Papa. Datos Basicos num. 5. Dirección Sistema Producto. Dirección General de Política Agrícola. México
- Seabrook E A J, Coleman S y Levy D 1993 Effect of photoperiodo on *in vitro* tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34: 43-51
- Slack A S y Tufford A L 1995 Meristem culture for virus elimination. In Gamborg O L y Phillips G C 1995 Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer printed germany
- Solorzano V M E 1983 Obtención de plantas libres de virus de *Solanum tuberosum* L. Tesis licenciatura Ing. Agronomo. UACH, Chapingo Edo. Méx.
- Stalknecht G F y Farnsworth S 1982 General characteristics of coumarin-induced tuberization of axillary shoots of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*. American Potato Journal 59: 17-31
- Torres T F 1988 La Ola Biotecnológica y Los Retos De La Producción Agroalimentaria En America Latina y Mexico. UNAM. I I E. México D F

- Trujillo J y Lira R 1992 Evaluación de la fertilización NPK para el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el municipio de Teocaltiche, Jal. Mex. Tesis Ing. Agrícola F E S C UNAM Edo. Mex., Mexico
- Valadez L. A 1994 Producción de hortalizas. Ed Limusa. Mexico
- Van U N y Vander Z P 1983 Vietnamese farmers use tissue culture for commercial potato production. American Potato Journal 60 873-879
- Vera, E R 1994 Bioestadística aplicada al cultivo de tejidos vegetales. En Hurtado, M D V y Merino, M M E Cultivo de tejidos vegetales. Edit Trillas México pp 162-198
- Vieyra R J 1994 Propagación *in vitro* de (*Dianthus caryophyllus* L.) a partir de segmentos nodales tesis Ing. Agrícola F E S C UNAM
- Wang P y Hu Ch 1982 *In vitro* mass tuberization and virus-free seed-potato production in Taiwan. American Potato Journal 59 33-37
- Wattimena et al 1983 Comparative field performance of potatoes from microculture. American Potato Journal 60 27-33
- Ziv, M 1995 Vitrificación morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. En Gamborg O L y Phillips G C 1995 Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer printed Germany