

40

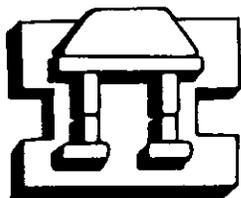


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA *de*
DE MEXICO

ESCUELA DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA
BIOLOGIA

TUBERIZACION *in vitro* DE PAPA (*Solanum sp*) cv.
TOLLOCAN COMO RESPUESTA A DIFERENTES
PROPORCIONES DE N, P Y K EN EL MEDIO DE
CULTIVO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A :
JUAN ALVARO GOMEZ BARRERA



IZTACALA

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

267464



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

==

A MI MADRE

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los siguientes profesores por sus críticas y comentarios sobre el contenido de este trabajo:

Dr. Jorge Sarquís

Biol. Juan Gerardo Ortiz Montiel

Biol. Manuel Mandujano Piña

Biol. Antonia Trujillo Hernández.

M. en C. Alberto Arriaga Frías

También agradezco a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron a la realización, no solo del trabajo que ahora presento, sino también de mi formación profesional. No hago una lista de este grupo para no excluir a nadie; pero quisiera agradecer de manera especial a mi familia por el apoyo que siempre me ha dado; a Llará por el aliento y su ayuda en la transcripción, revisión y corrección del manuscrito, así como por apresurarme; por último a mis amigos por no apresurarme.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Aplicaciones de la microtuberización	2
Conservación de germoplasma	2
Manejo de plantas libres de enfermedades	5
Ventajas económicas	5
Investigación básica	7
REVISIÓN DE LITERATURA	9
Generalidades de la planta de papa	9
Cambios morfológicos durante la tuberización	12
Factores que favorecen la tuberización	12
Fotoperíodo	13
Temperatura	15
Nutrición mineral	17
Sacarosa	17
Actividad hormonal durante la tuberización	18
Giberelinas	18
Citocininas	19
Etileno	21
Auxinas	21
Jasmonatos	22
Papel del Nitrógeno, Fósforo y Potasio en la tuberización	25
Nitrógeno	25
Fósforo	29
Potasio	33
MATERIAL Y MÉTODOS	36
Material biológico	36
Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	36
Propagación	37
Aplicación de los tratamientos	39
Medios inductores	39
Controles	40
Inducción de la tuberización	40

Evaluaciones	41
Tuberización en medio líquido	42
Análisis de datos	42
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
Porcentaje de tuberización	43
Número de microtuberculos por brote	50
Desarrollo de los microtubérculos	53
Microtuberización en medio líquido	58
CONCLUSIONES	61
SUGERENCIAS	62
BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXO I Tablas del análisis de varianza	72
ANEXO II Abreviaturas	74

RESUMEN

Las conclusiones generales encontradas en la literatura sobre la tuberización de la papa, basándose en trabajos tanto en campo como *in vitro*, son que el fotoperíodo corto, la baja temperatura y la baja nutrición de nitrógeno, inducen la tuberización. También se sabe que antes de la tuberización la fertilización de P y K se aumenta para mejorar la calidad de la cosecha, sin embargo esto no está bien documentado. Este trabajo se desarrolló con el fin de ver si las concentraciones de N, P y K, tienen un efecto sobre la microtuberización, ya que el medio de cultivo MS, utilizado prácticamente en todos los trabajos reportados sobre tuberización *in vitro* es alto en sales, principalmente N; por lo que se planteó la modificación de este medio en las concentraciones de NPK. Se manejaron tres concentraciones para cada elemento, por lo que se probaron 27 medios con distintas concentraciones de NPK. Se evaluó el porcentaje de tuberización, el número de tubérculos producidos y la talla de cada uno. Los resultados mostraron que el N no tuvo un efecto adverso en la tuberización, por el contrario, la tuberización se vio reducida por la presencia de P y K; también se observó que el N y el K favorecen el desarrollo de los microtubérculos. Utilizando un método de cultivo en medio líquido y algunos de los medios modificados se logró una mejor tuberización en comparación con un medio que contenía cinetina, la cual ha sido usada como inductor de la tuberización *in vitro* en muchos trabajos, por lo que se puede decir que la modificación del contenido de NPK del medio puede mejorar la producción de microtubérculos de papa *in vitro*.

INTRODUCCION

El cultivo de la papa es uno de los más importantes del mundo por su gran valor nutritivo, por ello es también uno de los más importantes económicamente. La tuberización, es decir la formación del tubérculo en la planta, es un evento fisiológico que ha sido estudiado desde hace mucho tiempo; ahora se conocen los factores que la desencadenan y muchos de los efectos que tienen en el desarrollo general de la planta. La mayoría de los estudios sobre tuberización se han realizado con plantas completas en condiciones de campo e invernadero, siendo la investigación de la tuberización *in vitro*, también llamada microtuberización, de reciente aparición, por lo que los efectos de varios factores en este sistema de cultivo se desconocen aún.

La tuberización *in vitro* de la papa fue el resultado de la investigación sobre los factores que la controlan en un sistema que permitía un mayor control de variables, y sobre todo, la utilización de un medio con una composición de nutrimentos exacta, siendo Gregory en 1956 uno de los primeros en observarla. Con el tiempo la investigación de la tuberización *in vitro* se amplió y fueron descubriéndose diversas aplicaciones que en este momento constituyen nuevas líneas de investigación.

Aplicaciones de la microtuberización

Algunas de las ventajas de la tecnología de microtubérculos son: 1) se reduce el tiempo requerido para la mejora de las plantas; 2) facilita la decisión del tipo de madurez de las diferentes variedades; 3) reduce los costos de transportación; 4) aumenta la productividad por el uso de semilla libre de gérmenes; 5) facilita la herencia de la superioridad genética obtenida en microtubérculos al tubérculo madre; y 6) permite el estudio de los mecanismos que inducen la tuberización (Nakamori *et al.*, 1994).

Conservación de germoplasma

Las especies silvestres deben conservarse por la información genética que poseen, aunque en si la mayoría no sean compatibles con la especie comercial, por ejemplo *Solanum demissum* ha proporcionado resistencia al tizón tardío a la mayoría

de las variedades comerciales de todo el mundo (Sosa-Chavez y Villarreal, 1978); la desaparición de cultivares primitivos de papa ha llevado a establecer una colección de germoplasma en el Centro Internacional de la Papa (CIP). Westcott *et al.* (1977) reportaron una colección que comprendía 13 000 entradas que se distribuían a programas de mejoramiento de todo el mundo. En México también se ha llevado a cabo una colección que incluye no solo material silvestre sino también el seleccionado a través de muchos años en centros nacionales y extranjeros (Sosa-Chavez y Villarreal, 1978).

La conservación tradicional del germoplasma de papa se hace cultivándola en grandes extensiones de tierra, y luego cosechándola y almacenando parte de la producción para repetir periódicamente este proceso. Esto tiene muchas desventajas, siendo las principales el tiempo, la cantidad de trabajo requerido, el espacio (Chandra y Naik, 1993), y la alta probabilidad de que los cultivos contraigan alguna enfermedad por virus, bacterias u hongos, principalmente (Lommen y Struik, 1992a). La colección de germoplasma *in vitro* ha despertado gran interés por los problemas mencionados (Dodds *et al.*, 1991). Esta tecnología posee varias ventajas sobre el mantenimiento en el campo (Buitron *et al.*, 1995) a saber:

- a) menores costos de mano de obra
- b) ausencia de infecciones de campo
- c) ausencia de peligros ambientales como granizadas y heladas
- d) acceso oportuno a material para micropropagación
- e) acceso oportuno a material para eliminación de patógenos
- f) disponibilidad permanente de material para propagación y exportación

Muchos países tropicales no son capaces de producir semilla de alta calidad debido a que no poseen áreas libres de vectores, por lo cual importan semilla certificada que redonda en un alto costo de la producción (Wattimena *et al.* 1983). Por ejemplo en Taiwán existían muchos problemas de virus, por lo que los métodos convencionales para producir tubérculo semilla se volvieron inefectivos lo cual llevó a que se desarrollara un método para la obtención y propagación de papa libre de virus (Wang y Hu, 1982).

El uso de microtubérculos resulta conveniente ya que es más fácil su almacenamiento, transportación y siembra (Wang y Hu, 1982). Asimismo, se podrían adaptar a un mecanismo de producción a gran escala (Hussey y Stacey, 1984). Akita y Takayama (1994a) utilizando fermentadores de 10 L, produjeron un promedio de 233 microtubérculos por fermentador. Posteriormente mejoraron su sistema, dado que el número de yemas que potencialmente podían formar tubérculos era de 1670, con esto obtuvieron entre 2 y 5 veces más microtubérculos (Akita y Takayama 1994b). Se ha propuesto un sistema automatizado para la micropropagación de grandes cantidades de plantas (cosecha, fragmentación y sembrado); para ello se valen de un aparato que por medio de una cámara de video determina, debido al contraste de color entre tallo y hojas, donde cortar los segmentos. Los cortes se hacen con rayo láser y los fragmentos viables, que también se detectan por el color, son resembrados, y los no viables se desechan. El aumento de contraste entre hojas y tallo se mejora con el uso de ancimido, que promueve la síntesis de clorofila y al mismo tiempo, la tuberización, por lo cual este sistema puede ser útil para la producción automatizada de microtubérculos (Alchanatis *et al.*, 1994).

La mayoría de los envíos de material *in vitro* del CIP se hacen en forma de plántulas, en 1984 este centro exportó alrededor de 7 500 brotes a 40 países (Estrada *et al.*, 1986), pero se puede reemplazar este método con la exportación de microtubérculos por las ventajas que presentan (Buitron *et al.*, 1995).

Los brotes producidos *in vitro* sufren daños durante su almacenamiento, y aunque al transplantarlos vuelven a crecer las yemas, algunos genotipos no reviven (Chandra y Naik, 1993), la vulnerabilidad de las plantas micropropagadas al transferirse al suelo es mayor que la de los microtubérculos producidos *in vitro*, los cuales no requieren de aclimatación (Akita y Takayama 1994a). Kiatkowski *et al.* (1988) almacenaron nudos individuales con un microtubérculo a 4 y 10 °C durante 77-85 semanas sin necesidad de cambiar el medio, al término de éste periodo los microtubérculos se transplantaron a invernadero y en dos semanas el 100% produjo plantas vigorosas.

Manejo de plantas libres de enfermedades

La planta de la papa, como miembro de la familia Solanaceae, responde bien a las técnicas de cultivo de tejidos, lo cual ha servido para producir plantas libres de virus y otras plagas. El cultivo de meristemos se ha convertido en una herramienta importante para éste fin (Estrada *et al.*, 1986, Chandra y Naik, 1993), siendo Marani y Pisi (1977) de los primeros en proponer ésta técnica. El uso de las plantas propagadas *in vitro* ha sido una solución al problema de las enfermedades, ya que se aumenta en mucho la velocidad de propagación así como la calidad sanitaria (Lommen y Struik, 1992a), pero existe un inconveniente, Wang y Hu (1982) mencionan que una vez obtenidas las plantas libres de virus la transferencia a suelo es difícil y con una alta proporción de pérdida, ya que las plántulas necesitan tiempo para aclimatarse, por lo cual se ha sugerido que la producción de microtubérculos puede ser útil para reducir los costos en la producción de plantas libres de virus (Morozova y Melik-Saksov, 1977, Kiatkowski *et al.*, 1988). Así, se pueden propagar rápidamente las plantas libres de enfermedades con un manejo más fácil (Levy *et al.*, 1993) además su transportación es menos problemática ya que las plantas al estar sin luz pueden morir, mientras que los microtubérculos no, y al ser manejados en condiciones estériles, se garantiza su sanidad. Con estas plantas se han podido crear mejores bancos de germoplasma (Estrada *et al.*, 1986).

Ventajas económicas

La producción de tubérculo semilla usando técnicas de micropropagación ofrece varias ventajas: 1) incremento en la producción del 10-38 %; 2) incremento en el vigor; 3) gran uniformidad, y 4) incremento en la capacidad para resistir y recuperarse de presiones ambientales como la sequía y las heladas (Jones, 1988).

Algunos factores como el alza del precio del petróleo han obligado a muchos países a disminuir o detener la importación de tubérculo semilla debido al incremento en el costo, pero existen experiencias satisfactorias en países subdesarrollados que han practicado las técnicas de cultivo de tejidos; por ejemplo: en Ecuador a partir de la donación de dos tubos de ensayo de tres variedades locales, mejoraron su

producción de tubérculos, de los que los agricultores reportaron un incremento del 25% de rendimiento (Bryan, 1988). El uso de microcortes y microtubérculos puede ser una alternativa para países que no pueden producir semilla en campo. En una comparación con la producción por tubérculo madre, se vio que las plantas provenientes de microcultivo produjeron mas tubérculos/planta; aunque el peso total fue menor que con tubérculo madre, no hubo diferencias estadísticas (Tabla 1).

Wang y Hu (1982) reportaron que en un periodo de cuatro meses produjeron aproximadamente 36,300 microtubérculos, ocupando una superficie de 10 m² en un laboratorio. Estos microtubérculos fueron plantados en suelo sucesivamente tres ocasiones para obtener tubérculos de talla normal; finalmente se obtuvieron 1,800 Kg de tubérculo semilla de alta calidad y con un bajo porcentaje de reinfecciones vírales.

Tabla 1

Producción de dos variedades de papa cultivadas en campo y producidas de a partir de tres diferentes fuentes de propagación

Propágulo Fuente (Tratamiento)	Número de tallos por planta		Número de tubérculos por planta		Peso total de Tubérculos (g)	
	Cosecha inicial	Cosecha final	Cosecha Inicial	Cosecha Final	Cosecha inicial	Cosecha Final
Cv. NORLAND						
Tubérculo	5.5	4.3	13.2	12.2	69.8	1319
Microtubérculo	1.2	1.0	7.3	13.3	46.3	1148
Microbrote	1.0	1.2	5.8	16.7	40.3	1225
Cv. RED PONTIAC						
Tubérculo	4.4	3.4	13.7	14.0	104.4	1792
Microtubérculo	1.0	1.0	13.5	24.6	86.2	1656
Microbrote	1.3	1.1	11.3	26.4	45.7	1745

Extraído de Wattimena *et al.* (1983).

Sin embargo existen posturas en contra de los microtubérculos. Según Lommen y Struik (1992a) las plantas micropropagadas no son muy útiles en el cultivo a gran escala, ya que se requiere un manejo muy cuidadoso y no pueden almacenarse sin que pierdan vigor, tampoco los microtubérculos serían la opción ya que son muy pequeños, por lo que sugieren que las plantas micropropagadas se siembren en invernaderos bajo condiciones controladas para producir en suelo minitubérculos, que son mas grandes que los producidos *in vitro* y que mejoran el

rendimiento, en cuanto al número de tubérculos/planta sin el uso de reguladores del crecimiento.

Por otro lado, Jones (1988) reportó que un 60 % de productores encuestados en Norte América y Europa respondieron que la dormancia de los microtubérculos fue mayor que la de los tubérculos producidos en campo, y un 40 % dijo que fue similar, por lo que se prefieren otros métodos (Tabla 2)

El uso del cultivo de tejidos permite la obtención de plantas de alta calidad que pueden ser usadas directamente en la producción. Recientemente en países del tercer mundo se ha visto que utilizar éstas técnicas no es tan difícil como se creía, incluso se han establecido laboratorios rústicos pero funcionales en pleno campo (Bryan, 1988).

Tabla 2

Técnicas más comunes utilizadas en la propagación rápida de plantas. Los datos son porcentajes dados por los productores y programas establecidos para la producción de papa.

Técnica usada	Porcentaje de uso	
	Norte América	Europa
Transplante de plántulas producidas <i>in vitro</i> solamente o en combinación con otro método	90	94
Cortes de tallo	30	25
Microtubérculos	5	12
Microtubérculos producidos bajo condiciones no estériles	*	*

*Dato no estimado

Basado en Jones (1988)

Investigación básica

Los sistemas *in vitro* permiten un mayor control de los factores que afectan la tuberización, aportando una herramienta útil para la investigación (Pelacho *et al.*, 1994). La microtuberización ha sido usada en diferentes líneas de investigación por ejemplo: para determinar cambios estructurales y bioquímicos que se llevan a cabo durante la tuberización (Peterson y Barker, 1979). En combinación con la evaluación

de proteínas de reserva la microtuberización se utiliza para la selección de germoplasma tolerante al calor (Nowak y Colborne, 1989); incluso en la estación espacial MIR se han utilizado microtubérculos como modelo para investigar los efectos de la microgravedad en la partición de los carbohidratos (Kordyum *et al.*, 1997).

Según Jones (1988) los microtubérculos ofrecen grandes posibilidades, ya que pueden ser producidos en cualquier época del año y luego ser sembrados en campo sin la necesidad de un invernadero. Por esto deben desarrollarse métodos que permitan mejorar la producción de tubérculos *in vitro*.

El presente trabajo se centró en observar el efecto que tienen los principales macronutrientes: nitrógeno, fósforo y potasio, en la microtuberización, ya que se encuentra documentado que el N retarda o inhibe la tuberización (Krauss, 1985). Esto es importante pues el medio MS, que es usado casi universalmente en trabajos de microtuberización, es considerado como un medio alto en sales, principalmente N (Dixon, 1985). Sin embargo son escasos los reportes que han observado el efecto del N en la tuberización *in vitro* y sus resultados son contradictorios (Garner y Blake, 1989).

Por otra parte, en campo, el P y el K se aumentan en la fertilización cuando llega el momento de la tuberización, mientras que el N se disminuye (Hay y Walker, 1989). Al P y al K se les atribuye la calidad del tubérculo, sin que esto se encuentre bien fundamentado, y en estudios *in vitro*, el efecto de éstos dos elementos no se ha evaluado.

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades de la planta de papa

Se considera a la papa originaria de América del sur, Perú, Ecuador y Bolivia (Stallknecht, 1983). Actualmente su cultivo es uno de los más importantes a nivel mundial, después del trigo, el maíz y la cebada; en algunos países europeos, su consumo *per capita* es de 180 Kg./año (Valadez-López, 1990).

En la actualidad se cultivan ocho especies, todas corresponden a la sección Petota, y de éstas *Solanum tuberosum* es cultivada en todo el mundo, mientras que el resto solo se pueden cultivar en su lugar de origen, lo que hace que *S. tuberosum* sea la especie más cultivada de papa.

La papa es una planta herbácea anual y perenne debido a su capacidad de propagación vegetativa. Sus tallos pueden tener ramificaciones laterales, de ellos directamente pueden crecer estolones, inflorescencias, tubérculos y tallos laterales. Si la planta proviene de semilla verdadera o sexual, se formará un tallo principal y si proviene de tubérculo semilla, habrá varios tallos.

Los tallos son de dos tipos: 1) aéreos, que son angulosos, de color verde, semierectos y/o rastreros; y 2) subterráneos que están compuestos por rizomas (actualmente mejor conocidos como estolones), que darán origen a los tubérculos (parte comestible) (Valadez-López, 1990). Por lo general las raíces de ésta planta son superficiales (no más de 50 cm de profundidad), sin embargo dependiendo del tipo de suelo, las plantas pueden tener raíces mas profundas. Casi todas sus partes pueden producir raíces, si la planta proviene de semilla verdadera desarrolla raíces delgadas con ramificaciones laterales, mientras que las plantas que provienen de tubérculos desarrollan raíces adventicias y nodos en la parte subterránea de tallos y estolones; éstos últimos son tallos laterales que presentan crecimiento diageotrópico, se forman a partir de las yemas en la parte subterránea de los tallos, en algunos se produce un engrosamiento en su extremo terminal, formándose así los tubérculos (Fig. 1) Estos están considerados como parte del tallo adaptada para almacenar

reservas (proteínas y almidón, principalmente). El color del tubérculo depende de la variedad, pueden ser blanco crema, amarillos, anaranjados, rojos o morados. Algunas veces se desarrollan tubérculos aéreos en las axilas de las hojas. La forma también es característica y puede ser redonda u ovalada.

La piel del tubérculo, tiene muchas lenticelas que pueden ser consideradas como estomas, éstas actúan como sistema de comunicación con el exterior y son esenciales para la respiración, pues el CO_2 y el O_2 no pasan a través de la piel, que en un tubérculo maduro es casi impermeable a químicos, gases y líquidos y proporciona buena protección contra microorganismos.

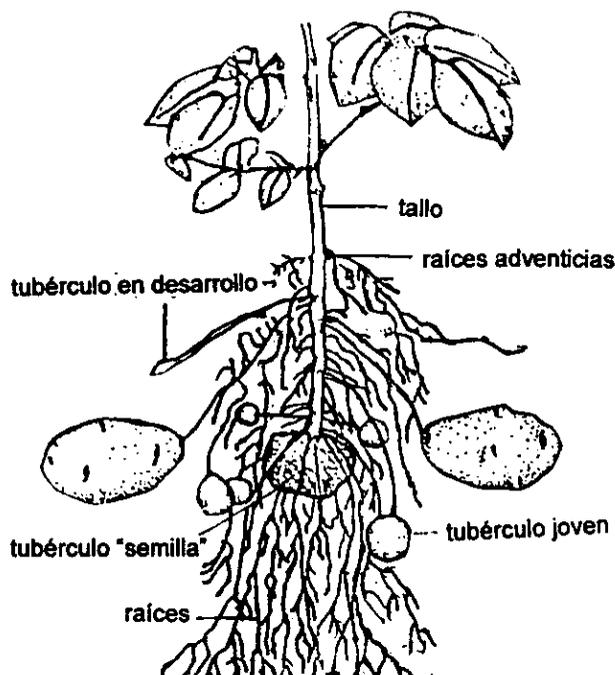


Fig. 1 Partes subterráneas de la papa. Extraído de Beukema y van der Zaag (1979).

El tubérculo tiene un extremo basal, ligado al estolón y un extremo apical o distal. El tubérculo posee estructuras conocidas como "ojos", que se distribuyen hacia la parte apical siguiendo un orden en espiral; están ubicados en las axilas de

hojas escamosas llamadas cejas. Cada ojo presenta varias yemas vegetativas, que son las que dan origen a una nueva planta completa.

Las hojas de la planta son compuestas, presentan un raquis central con varios foliolos; las hojas presentan un acomodo en espiral y su forma y tamaño son una característica importante para distinguir las variedades.

Las flores son perfectas, de color blanco, púrpura o veteadas de acuerdo al cultivar y cuando son fertilizadas se desarrolla un fruto redondo, con un diámetro de 2 cm, es de color verde y presenta más de 200 semillas, aunque por lo general, solo se utilizan para fines de mejoramiento genético.

De acuerdo a sus características la planta de papa ha sido clasificada del siguiente modo:

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Subgénero: *Pachystemonum*

Sección: Petota

Subsección: Potatoes

Especies principales: *S. tuberosum*

S. andigenum

S. demissum

Tabla 3. Contenido alimenticio de la papa. Las cantidades están dadas en base a 100gr. de parte comestible.

Agua	80.0 gr
Proteínas	3.9 gr
Carbohidratos	16.2 gr
Ca	8.0 mg
P	56.0 mg
Fe	0.7 mg
Tiamina	0.1 mg
Riboflavina	0.03 mg
Acido ascórbico	28.0 mg

Extraído de Valadez-López (1990).

La papa tiene bajo contenido en cloro y sodio y proporciona al menos 12 vitaminas esenciales y minerales, incluyendo una extremadamente alta cantidad de

vitamina C (tabla 3): una sola papa de tamaño mediano proporciona 65% de la recomendación diaria de ésta vitamina (según la norma de E.U.); también provee de cantidades significativas de proteínas, carbohidratos y hierro (Miller y Lipschutz, 1984).

Cambios morfológicos durante la tuberización

El crecimiento de la planta de papa se altera cuando se inicia la tuberización. Las yemas axilares pueden formar estolones, casi siempre subterráneos y que en condiciones apropiadas forman tubérculos, aunque a veces éstos se forman sin el desarrollo del estolón (Vreugdenhill y Struik, 1989, Ewing, 1990).

Según Vreugdenhill y Struik (1989) cuatro pasos llevan la formación del tubérculo:

- a) Inducción e iniciación del estolón: es la activación de una yema axilar que produce un brote horizontal y que mantiene este crecimiento diageotrópico.
- b) Crecimiento del estolón: elongación y ramificación del estolón.
- c) Cese del crecimiento longitudinal del estolón.
- d) Inducción e iniciación del tubérculo: producción y traslocación de un estímulo de la tuberización que resulta en el crecimiento radial del ápice del estolón y que involucra cambios en su metabolismo.

Factores que favorecen la tuberización

Existen tres factores principales que inducen el proceso de tuberización: el fotoperíodo, la temperatura y la nutrición mineral. Desde hace mucho tiempo se ha buscado la manera en que estos factores influyen en la fisiología de la planta de papa. Gregory (1956) realizó varios experimentos manejando condiciones que él llamó inductoras y no inductoras, las primeras consistían de fotoperíodos cortos (8 h) y temperaturas bajas (20° día/14° noche) mientras que las segundas eran fotoperíodos largos (16 h) y temperaturas altas (26° d/20° n). Primero comprobó que las yemas axilares pueden formar tubérculos, lo cual interpretó como que los factores

que inducen la tuberización no se restringen a la parte subterránea, sino que se pueden encontrar en toda la planta; luego realizó injertos de plantas inducidas en plantas no inducidas, y observó que éstas tuberizaban, concluyendo que el estímulo que se produce en la tuberización es transmisible, de manera similar al estímulo que induce la floración. Posteriormente realizó unos de los primeros experimentos de tuberización *in vitro*; en éstos observó que la sacarosa en el medio es necesaria para la tuberización, y la adición de sales inorgánicas, incrementa el porcentaje de tuberización; se plantea la pregunta de si la sacarosa induce la tuberización o solo es necesaria para el crecimiento, y concluye que es requerida tanto para el crecimiento de nuevos brotes como de tubérculos, pero no es responsable de la inducción.

Fotoperíodo

Cuando segmentos de tallo de plantas de papa se inducen con días o fotoperíodos cortos (DC) tienen un mayor porcentaje de tuberización que los de días largos (DL), y también presentan un menor crecimiento del vástago y las raíces (Ewing y Wareing, 1978), las plantas que crecen en DL presentan un mayor número de ramificaciones y mayor peso seco en hojas y tallos, pero la talla y área foliar no son muy distintas de las que crecen en DC, y el número y peso seco de los tubérculos es mayor en DC (Lorenzen y Ewing, 1990), también las plantas en DC acumulan más almidón pues son más eficientes en convertir la radiación fotosintéticamente activa (PAR), seguramente porque la formación y crecimiento del tubérculo representa una fuerte demanda de carbohidratos que exige una rápida acumulación durante el día (Lorenzen y Ewing, 1992).

Se cree que el fotoperíodo altera los niveles endógenos de reguladores del crecimiento, lo cual controla el proceso de tuberización (Forsline y Langille, 1975). Railton y Wareing (1973) sugirieron que los primeros pasos en la inducción de la tuberización es un cambio en el metabolismo de las giberelinas (GA), ya que tan solo a los dos días de transferir las plantas de DL a DC se detecta un gran descenso en los niveles de sustancias con actividad de GA. Por medio de HPLC y espectrometría de masas, Mauk y Langille (1978) identificaron un compuesto aislado en grandes

cantidades de plantas expuestas a DC y bajas temperaturas, como *cis*-zeatin ribósido (ZR), una citocinina, la cual, especulan que esta íntimamente relacionada con la tuberización, ya que solamente cuatro días después del aumento en los niveles de ZR se observó la tuberización; posteriormente aplicaron ZR en cultivos *in vitro* de plantas no inducidas y obtuvieron hasta un 75% de tuberización comparado con 0% en los controles sin ZR. Según Struik, *et al.* (1987) el fotoperíodo estimula la formación de un factor foliar de la tuberización ya que los extractos de hojas de plantas fuertemente inducidas estimulan la tuberización de plantas moderadamente inducidas, sin embargo estos resultados no son concluyentes.

La respuesta al fotoperíodo depende del fotoperíodo crítico (FPC) de cada genotipo, ya que hay plantas con FPC largo que pueden tuberizar aún con iluminación continua (Ewing y Wareing, 1978). Wheeler y Tibbitts (1986) compararon el efecto de diferentes fotoperíodos en cinco cultivares, y observaron que tres de ellos crecieron bien bajo luz continua e incluso tuberizaron mejor que los controles (12h de luz), mientras que los otros dos exhibieron daños en las hojas y no tuberizaron; cuando las hojas detectan un fotoperíodo menor al FPC producen un estímulo que se transporta vía floema a los puntos de tuberización, estolones o yemas axilares (Struik, *et al.* 1987).

La tuberización no solo depende del período de luz sino también de su intensidad; plantas de papa que crecieron bajo alta radiación ($500-1200 \mu E m^{-2} s^{-1}$) se desarrollaron normalmente y produjeron tubérculos de buena talla, mientras que las plantas que crecieron en radiación baja tuvieron entrenudos más largos, hojas largas y delgadas y produjeron tubérculos pequeños, destinando la mayor parte del ^{14}C asimilado a las hojas (Gawronska y Dwelle, 1989), este efecto así como el de la división de los fotosintátos puede deberse también a un cambio en el balance de fitohormonas; las papas que crecen con bajos niveles de radiación producen altas cantidades de giberelinas (Menzel, 1985).

En cultivos *in vitro* También se observa una interacción entre el desarrollo de las plantas y el fotoperíodo: Charles y Rossignol (1992) establecieron un fotoperíodo óptimo, para sus cultivos, de 12 h para el crecimiento de las plantas, ya que por debajo de éste se facilitó el envejecimiento y, en concentraciones adecuadas de

sacarosa se daba la tuberización Charles *et al.* (1993), éstos autores también observaron que las condiciones ambientales pueden influir en el tamaño, número y calidad de los microtubérculos.

Según Perl *et al.* (1991) si los brotes son estimuladas con el nivel adecuado de sacarosa, tuberizan sin importar el fotoperíodo, sin embargo hay evidencia de que la microtuberización es mejor a la obscuridad, aunque esta respuesta está influenciada por el cultivar (Pelacho y Mingo-Castel, 1991a). Garner y Blake (1989) observaron que brotes de papa tuberizan como respuesta a la aplicación de fotoperíodos cortos, sobre todo si han crecido bajo fotoperíodos largos y que la obscuridad total acelera la senescencia y reduce el potencial de crecimiento de los tubérculos. También se ha observado que el peso fresco de los microtubérculos depende del cultivar y del fotoperíodo utilizado tanto antes como durante la tuberización, por lo que según Seabrook *et al.*, (1993) el número y talla pueden controlarse estableciendo las mejores condiciones de fotoperíodo para cada genotipo.

Temperatura

La papa es una planta de origen andino, por lo cual esta adaptada a climas templados, ésta es la razón de que muchos cultivares sean poco productivos en algunas áreas de los trópicos; la alta temperatura del suelo, más que del aire, es especialmente inhibitoria de la producción de tubérculos (Menzel, 1983b y 1985).

En papas inducidas con temperaturas bajas se detecta un aumento de 10 veces en los niveles de dos sustancias con actividad de citocinina, tan solo a los dos días de inducción (Forsline y Langille, 1975). La inhibición de la tuberización por temperaturas altas puede deberse a un incremento en el nivel de GA, ya que cuando se aplica CCC (antagonista de GA) la tuberización aumenta. Cuando la temperatura es alta en la zona de las raíces, hay un aumento de GA en el vástago y un cambio en el espectro de GA en las raíces (Krauss y Sattelmacher, 1979), también el efecto de la temperatura alta del suelo se revierte al cortar las yemas, lo cual podría indicar que la síntesis de GAs, se encuentra en esa zona (Menzel, 1983a). Reynolds y Ewing (1989) observaron que cuando el suelo es caliente y el aire frío, hay una ausencia de

enraizamiento y se forman brotes que crecen hacia arriba y tuberizan fuera del suelo, lo que explican porque la alta temperatura aumenta la formación de GAs en las yemas del estolón tal como sucede con las del vástago con el aire caliente.

Las plantas que crecen en altas temperaturas tienen una respuesta similar a la que se da cuando crecen en baja radiación típicamente tienen un peso seco total muy bajo, sobre todo por la poca producción de tubérculos, ya que en baja temperatura el 80% del peso seco es de los tubérculos mientras que en la temperatura alta es menor del 5% (Menzel, 1985). En tomate el estrés por calor provoca un descenso en la importación de ^{14}C , al parecer debido a una reducción en

Tabla 4
Factores evaluados en algunos trabajos de tuberización *in vitro*.

Temperatura de tuberización (°C)	Fotoperíodo de crecimiento (h luz)	Fotoperíodo de tuberización (h luz)	Concentración de sacarosa (%)	Reguladores de crecimiento	Referencia
24	Variable porque fue lo que se evaluó	0	6	Kin	Forsline y Langille (1978)
22	16	0	8	CCC y BAP	Estrada <i>et al.</i> (1986)
19	16, 8 y 0	0, 8 y 16	8 y 12	Ninguno	Gamer y Blake (1989)
20	16	0 y 8	8	Retardadores del crecimiento y BAP	Harvey <i>et al.</i> (1991)
20	0*	0, 8, 16 y 24	4	Kin	Pelacho y Mingo-Castel (1991)
18-19	16	0	8	2iP y ancimidol	Levy <i>et al.</i> (1993)
?	16 y 8	16 y 8	8	2iP y ancimidol	Seabrook <i>et al.</i> (1993)
19	16	8	8 y 4 + otras azúcares	Ninguno	Khuri y Moorby (1995)

(*) En este caso no se trabajó con brotes sino con estolones, por eso no se utilizó luz para el crecimiento.

la capacidad de las flores jóvenes, que funcionan como órgano demandante, para movilizar asimilados y a que hay un menor suministro de carbono por parte de

las hojas (Dinar y Rudick, 1985).

Conforme aumenta la temperatura del suelo se observa un descenso en el crecimiento y desarrollo de las raíces de papa, mientras que en las raíces de camote y casava, cultivos tropicales, hay un aumento. La respuesta esta influenciada considerablemente por el cultivar y puede deberse a la reducción en el índice mitótico y a un cambio en el metabolismo de carbohidratos, sobre todo por un aumento en la respiración (Sattelmacher, *et al.* 1990).

Las fluctuaciones de la temperatura a lo largo del día (termoperíodos) se consideran necesarias para incrementar la producción de papa. Varios cultivares pueden tuberizar cambiando los termoperíodos aún bajo luz continua y el número de tubérculos y su peso seco dependen de la duración de los termoperíodos (Cao y Tibbitts, 1992).

En la mayoría de los trabajos de microtuberización se ha reportado una mejor respuesta a temperaturas relativamente bajas (Tabla 4) aunque ésta también depende del cultivar, ya que algunas variedades resistentes al calor tuberizan mejor a 30 °C (Nowak y Colborne, 1989, Levy *et al.*, 1993).

Nutrición mineral

Es conocido que la fertilización durante el crecimiento de la papa y durante la tuberización es distinta para tener una mejor producción, tanto en calidad como en cantidad, sobre todo en lo que respecta a los principales macronutrientes: nitrógeno, fósforo y potasio, el posible papel de cada uno de ellos en la tuberización se analizará más adelante.

Sacarosa

La cantidad de sacarosa que se utiliza para el crecimiento de la mayoría de las plantas cultivadas *in vitro* es normalmente de 2-3%, y cantidades mayores se consideran como altas, tal vez porque elevan la osmolaridad del medio, lo que podría resultar dañino.

Desde los inicios de la microtuberización se estableció que se requiere de una alta concentración de sacarosa para que la papa tuberice. Gregory (1956) concluyó que la sacarosa es necesaria para el crecimiento tanto del tubérculo como de nuevos brotes, pero no es responsable de la inducción.

Recientemente otros autores consideran a la sacarosa como una señal para tuberizar, ya que después de cierto tiempo en un medio con alta concentración de esta azúcar, los tubérculos que se iniciaron continúan creciendo en un medio con sacarosa 2% (Perl *et al.*, 1991). No se conocen en detalle los mecanismos por los cuales la papa responde tuberizando a las altas concentraciones de sacarosa; se ha planteado que funciona como una señal de que se han acumulado los suficientes fotosintátos (Garner y Blake, 1989, Banfalvi *et al.*, 1997).

La sacarosa podría jugar un doble papel en la microtuberización, el de fuente de carbono y el de osmolito, ya que la tuberización puede iniciarse por un shock osmótico (Khuri y Moorby, 1995).

Actividad hormonal durante la tuberización

Además de establecer las condiciones que conducen a una mejor tuberización se han buscado las causas fisiológicas de ella, principalmente hormonales, es por ésto que se han utilizado diversos reguladores del crecimiento en estudios de microtuberización. Levy *et al.* (1993) establecieron que para mejorar la microtuberización se deben eliminar el meristemo apical y la raíz, ya que son sitios de síntesis de hormonas que pueden inhibir el desarrollo de las yemas axilares, a esto se le llama inhibición correlativa o dominancia apical, posteriormente se pueden añadir otras sustancias sin que halla mucha interferencia por parte de las hormonas endógenas.

Giberelinas (GAs)

El patrón de sustancias giberélicas en papa cambia bajo diferentes condiciones de fotoperíodo, su nivel disminuye dramáticamente tan solo a los dos

días de estar en fotoperíodo corto, lo que sugiere que uno de los primeros pasos que conducen a la tuberización es un cambio en el metabolismo de GAs (Railton y Wareing, 1973).

La aplicación de ácido giberélico promueve más el crecimiento vegetativo, el elongamiento del vástago y un mayor enraizamiento (García-Torres y Gómez-Campo, 1973), condiciones que son opuestas a la tuberización.

En estudios *in vitro* se utilizan retardadores del crecimiento (que son antagonistas de las GAs) como inductores de la tuberización, como el CCC (2-cloroetil trimetil amonio) que promueve el 100% de tuberización pero disminuye el peso fresco de los microtubérculos, dependiendo de la concentración y del cultivar (Harvey *et al.*, 1991), el ancimidol (Levy *et al.*, 1993) y el paclobutrazol (Simko, 1994) han demostrado ser efectivos en la estimulación de la formación de microtubérculos. A bajas concentraciones la cumarina induce la tuberización y es trasladada a los tubérculos en desarrollo, en donde se ha visto que ejerce efectos en la plasticidad de la pared celular y en la reorientación del plano de división (Stalknecht y Farnsworth, 1982a y b). Leclerc *et al.* (1994) reportaron lo contrario, pues observaron que la adición de CCC, de cumarina y de benzil adenina (BA, una citocinina) no disparó ningún aumento en la tuberización o peso fresco y que bajo condiciones inductoras tales sustancias son innecesarias e incluso perjudiciales.

El efecto de las GAs podría ser el promover preferencialmente el crecimiento longitudinal a costa del engrosamiento del estolón. Cuando comienza la tuberización la región subapical del estolón comienza a engrosarse debido a la expansión transversal de las células, esta dirección está regulada por la orientación de las microfibrillas de celulosa de la pared celular y éstas a su vez, por la orientación de los microtúbulos. Al agregar GA al medio de cultivo, los microtúbulos se reorganizan, de manera que en lugar de engrosarse, crecen longitudinalmente (Fujino *et al.*, 1995). El ácido giberélico, también parece inhibir la síntesis de almidón en el estolón (Smith y Palmer, 1970).

Un estudio con mutantes que sobreproducen algunas GAs muestran resultados contradictorios, ya que éstas plantas tuberizan aún en días largos, lo que podría indicar que solo algunas GAs inhiben la tuberización (Jackson y Prat, 1996).

Citocininas

Las citocininas se consideran como inductoras de la tuberización y las más utilizadas en estudios de tuberización son: la cinetina (Kin), la benzil amino purina (BAP) y el ZiP (6-(γ -dimetilalilamino)purina).

Las citocininas podrían ser sintetizadas en la parte aérea de la planta al percibir condiciones inductoras, y luego ser transportadas a la parte basal, ya que en plantas bajo tales condiciones se detectó un aumento de hasta diez veces en la concentración de dos sustancias con actividad de citocinina tan solo a los dos días de tratamiento (Forsline y Langille, 1975) y en otras condiciones la Kin tiene la capacidad de reemplazar las condiciones inductoras (Forsline y Langille, 1976). Mauk y Langille (1978) realizando trabajos para tratar de encontrar la sustancia que induce la tuberización, aislaron ZR a partir de plantas inducidas por condiciones ambientales; el ZR aislado lo aplicaron a cultivos *in vitro* de plantas no inducidas, éstas tuberizaron hasta un 75% en comparación con 0% de las plantas que no contenían ZR. Por su parte Stallknecht (1985) también observó que de plantas expuestas a condiciones inductoras y altas concentraciones de CO₂, se aislan fracciones con actividad de citocinina, en especial altos niveles de zeatin-ribósido, que según éste autor es la citocinina más activa durante la tuberización.

En estudios con estolones cultivados *in vitro* se vio que la tuberización dependía, de bajas temperaturas, de altas concentraciones de sacarosa y de la presencia de Kin en el medio; al parecer la Kin no estimuló la síntesis *de novo* de proteínas y de ácidos nucleicos (Palmer y Smith, 1970), pero sí la síntesis de almidón (Smith y Palmer, 1970). En cultivos de brotes se ha observado que la aplicación de Kin fácilmente induce un 100% de tuberización de las yemas axilares, mientras que otros reguladores son extremadamente inconsistentes (Stallknecht y Farnsworth 1982b). También en cultivos de brotes Pelacho y Mingo-Castel (1991a) observaron que la Kin inhibió el crecimiento de las raíces y la elongación del brote, promoviendo la tuberización y que este efecto fue mayor en obscuridad.

Las citocininas por si mismas tal vez no sean capaces de inducir la tuberización, sino que debe existir un balance entre GAs y citocininas (Forsline y Langille, 1976). Se ha observado que la aplicación de 2iP a brotes *in vitro* estimula la tuberización, pero un inhibidor de GAs (ancimidol) fue más efectivo (Levy *et al.*, 1993), por su parte Hussey y Stacey (1984) reportaron que la aplicación simultánea de BAP y CCC aumentaron la tuberización y que la aplicación de GAs inhibió este efecto. Utilizando este sistema en el CIP se logró la microtuberización de 55 genotipos, incluyendo algunos mexicanos, como Tollocan (Estrada *et al.*, 1986). Banfalvi *et al.* (1997) reportaron una rápida microtuberización del 100% con BAP únicamente, mientras que sin éste compuesto, solo tenían un 50% de tuberización.

Etileno

El etileno tiene efectos profundos en el desarrollo vegetativo de las plantas, sin embargo, varios trabajos sostienen que juega un papel menos crítico en comparación con otras hormonas, aunque se considera que es de vital importancia en respuesta a diferentes presiones ambientales (Smalle y Van Der Straeten, 1997).

En la tuberización el papel del etileno es menos claro que el de otras hormonas, algunos trabajos demuestran que promueve la tuberización, pero *in vitro* parece inhibirla (Stalknecht, 1985). Garcia-Torres y Gómez-Campo (1973) reportaron que la aplicación de etherel tanto a plantas en invernadero como a cultivos en campo e *in vitro*, incrementa la tuberización. Esto podría ser un efecto indirecto, ya que se observa una depresión general en el crecimiento de las plantas (Mingo-Castel *et al.*, 1974), lo que podría indicar la participación de más hormonas.

Por otro lado, el etileno inhibe la tuberización de estolones *in vitro* aún cuando son inducidos con Kin, y el CO₂ parece tener un efecto opuesto al etileno, es decir, de inductor (Mingo-Castel *et al.*, 1974). El etileno también inhibe la tuberización inducida por BAP y CCC (Hussey y Stacey, 1984). El CO₂, el etileno y la Kin pueden actuar a nivel intracelular, cambiando el patrón de deposición de microfibrillas o de conexión de los microtúbulos en la región subápical del estolón (Mingo-Castel *et al.*, 1976).

Auxinas

Los estudios del efecto de las auxinas en la tuberización muestran resultados muy variables, pero al parecer sus efectos las dividen en dos grupos: el ácido indolacético (AIA), el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) parecen tener un efecto inductor de la tuberización; y el ácido absísico (AAB), que se sobreproduce en condiciones inductoras, tal vez tenga una mayor participación en mantener el crecimiento y dormancia del tubérculo que en su iniciación (Stallknecht, 1985). Suttle y Hulstrand (1994) presentaron evidencia de que el AAB es necesario para inducir y mantener la dormancia de microtubérculos producidos *in vitro* ya que al aplicar fluoridona, los niveles endógenos de AAB disminuyeron de 250 pmol/g de peso fresco, a entre 5-25 pmol/g mientras que el porcentaje de brotación de los tubérculos aumentó. Hussey y Stacey (1984) reportaron que la aplicación de BAP junto con CCC aumenta la tuberización y que la aplicación de AAB en bajas concentraciones inhibe la tuberización, pero cuando la concentración de AAB es alta, el efecto es similar al del CCC.

El papel del AIA en el tubérculo podría estar relacionado con la carga del floema y la formación de una demanda de fotosintatos, ya que el contenido de AIA esta positivamente relacionado con el desarrollo del tubérculo, mientras que el AAB se correlaciona negativamente (Marschner *et al.*, 1984).

Obata-Sasamoto y Suzuki (1979) obtuvieron resultados que sugieren dos pasos en la tuberización (1) la iniciación del tubérculo es estimulada en condiciones en que las GAs desaparecen y se encuentran altos niveles de auxinas y bajos de citocininas y (2) el subsecuente descenso en los niveles de auxinas y el rápido incremento en citocininas estimula la actividad de las enzimas que sintetizan almidón para sostener el continuo crecimiento del tubérculo.

Jasmonatos

Los jasmonatos están involucrados en la regulación de la morfogénesis de las plantas, hay información que involucra a los jasmonatos en la formación de

tubérculos, de raíces tuberosas, en la formación de bulbos, en la determinación del hábito del tallo y en el enrollamiento de zarcillos (Koda, 1997); los jasmonatos también parecen tener un papel importante en la senescencia, la desintegración de componentes celulares y la removilización de nutrimentos de las partes vegetativas a sitios demandantes, como flores frutos y granos (Engvild, 1989).

Vick y Zimmerman (1984) encontraron que varias especies vegetales (*Zea mays*, *Solanum melongena*, *Linum usitatissimum*, *Avena sativa*, *Heliantus annus* y *Triticum aestivum*) siguen la misma vía para sintetizar el ácido jasmónico (AJ) y que la enzima clave en la conversión del 12-oxo-PDA (ácido 12-oxo-*cis,cis*-10,15-fitodienólico) a AJ es la lipoxygenasa (LOX), la cual podría estar involucrada en la regulación del desarrollo vegetal y ampliamente distribuida en el reino vegetal.

Buscando la sustancia que se produce en las hojas y sirve como inductor de la tuberización, Koda *et al.*, (1988)¹ aislaron un compuesto de las hojas de papa que inducía la tuberización. Posteriormente el compuesto fue identificado como un jasmonato al cual llamaron ácido tuberónico (AT), (Yoshihara *et al.*, 1989)².

La aplicación de AJ a cultivos *in vitro* de papa, *S. demissum* (Helder *et al.*, 1993) y *S. tuberosum* (Nakamori, *et al.*, 1994), indujeron la producción de microtubérculos, que incluso tuvieron mayor peso fresco que cuando se aplicó Kin (Pelacho y Mingo-Castel, 1991b). En invernadero, se observó que el transporte de AJ marcado radioactivamente es controlado por el fotoperíodo, ya que en DC la radioactividad en los estolones aumentó diez veces en comparación con DL (Yoshihara *et al.*, 1996).

Por otro lado Jackson y Willmitzer (1994) sostienen que el AJ no está involucrado directamente en la tuberización, pues al rociar AJ a plantas mantenidas en condiciones no inductoras, no se formaron tubérculos, por lo que argumentan que el AJ no es la señal que se transporta de las hojas a los estolones, ya que aunque se detectó el transporte, no hubo tuberización. Koda (1997) menciona que esta conclusión parece estar basada en tres errores: a) la señal de la tuberización no es el

¹ Koda *et al.* (1988) *Plant Cell Physiol.* 29:969-974 y 1047-1051. Cit. En Koda, 1997.

² Yoshihara *et al.* (1989) *Agric. Biol. Chem.* 53: 2835-2837. Cit. en Koda, 1997.

AJ, sino el AT o el ácido glucotuberónico (AGT), b) la confirmación de la incorporación del AJ se hizo por los niveles de transcripción del inhibidor de proteinasa-2, cuya inducción se da con concentraciones de AJ mucho menores a las necesarias para la inducción de la tuberización, y c) la iniciación de la tuberización está regulada por el balance entre jasmonatos y GAs; las plantas usadas por los anteriores autores (*S. Andigena* y *S. Demissum*) son variedades de madurez muy tardía que requieren condiciones estrictas de DC, por lo que se requería de un gran descenso de GAs para poder inducir la tuberización.

Helder *et al.* (1993) reportaron que el fotoperíodo afecta la hidroxilación, la cual parece requerirse para que el AJ funcione como inductor, en particular el AJ-12-OH (que es el AT). Entre dos grupos de plantas tratadas (DC Y DL) no hubo diferencias en el contenido de AJ pero sí en el de los hidroxilados AJ-11-OH y AJ-12-OH que se detectaron en altas concentraciones en las plantas de DC. También, al parecer, las posiciones de los carbonos que son requeridos para que funcione como inductor de la tuberización, son diferentes a los del mecanismo para la inhibición del crecimiento y la senescencia (Koda *et al.*, 1991).

La forma en la que el AJ podría actuar no es muy clara todavía, pero es posible que los compuestos capaces de inducir la tuberización afecten la orientación de los microtúbulos y consecuentemente induzcan la expansión radial de las células que conduce a la tuberización (Koda *et al.*, 1991). Takahashi *et al.* (1994) encontraron que el AJ y su metiléster (Me-AJ) son capaces de inducir la expansión celular en tubérculos de papa, a los cinco días de cultivar discos de papa en medio con AJ, el peso fresco aumentó al doble y el aumento, según se reveló por microscopía, se debió a la expansión y no a la división celular, ésta respuesta parece ser específica al AJ, ya que varias hormonas no ejercieron un efecto marcado en la talla de las células. La expansión de las células parece deberse a un incremento en la presión osmótica y a un cambio en la arquitectura de la pared celular y del citoesqueleto, ya que la aplicación de AJ provocó un considerable aumento en el nivel de sacarosa interna, y los inhibidores de la síntesis de celulosa y de la

organización de los microtúbulos inhibieron la expansión inducida por el AJ (Takahashi *et al.*, 1995).

Las respuestas inducidas por el AJ podrían estar asociadas a un incremento en los niveles de formas activas de citocininas, ya que la proporción de citocininas activas/inactivas se incrementó de 1.2 a 2.1 al aplicar AJ a brotes de papa cultivados *in vitro* (Dermastia *et al.*, 1994).

En la tuberización existe un control de varios pasos consecutivos que dependen del balance entre varias hormonas, más que de un solo compuesto, algunas actúan como inhibidores y otras inducen o facilitan el desarrollo del tubérculo; tales pasos dependen en gran medida de los factores ambientales (Vreugdenhil y Struik, 1989 y Ewing, 1990).

Papel del Nitrógeno, Fósforo y Potasio en la tuberización

La tuberización y el crecimiento de los tubérculos no son pasos obligados en la ontogenia de la papa, y dependen de varios factores ambientales, siendo la temperatura y el fotoperíodo los más importantes y estudiados, mientras que se ha puesto poca atención en el efecto de la nutrición mineral (Krauss, 1985).

La fertilización por NPK, antes y durante la tuberización es importante para tener un mejor rendimiento y calidad de los tubérculos. En suelos donde no hay deficiencia de elementos traza, la producción de tubérculos depende del suministro de NPK. Una proporción considerable de éstos tres minerales proviene de las hojas y llega a los tubérculos en crecimiento a través del floema, (Moorby y Milthorpe, 1975). A pesar de que éstos tres minerales son los más estudiados en la nutrición vegetal, es el papel del Nitrógeno el que más se ha observado, en relación con la tuberización.

Nitrógeno

El Nitrógeno está muy relacionado con el crecimiento vegetativo y con la senescencia; es transportado como nitrato a las hojas, en donde forma compuestos

N-reducidos que, cuando el crecimiento vegetativo cesa se traslocan y utilizan para el crecimiento del tubérculo (Millard *et al.*, 1989).

Un alto suministro de N en papa aumenta la formación de ramificaciones al igual que el área foliar, mientras que con un suministro bajo las hojas tardan más en aparecer, tienen menor área y se acelera la senescencia (Marshall y Vos, 1991; Vos y Biemond, 1992). Las plantas que crecen con alto N maduran más tarde retrasándose la formación del tubérculo (Beukema y van der Zaag, 1979; Hay y Walker, 1989) tal vez porque se estimula el crecimiento del follaje (Moorby y Milthorpe, 1975).

Una vez que los tubérculos se inician, su crecimiento es mantenido por más tiempo si el follaje es grande (Moorby y Milthorpe, 1975), aunque no se ve afectado el contenido de materia seca (Roberts *et al.*, 1982). Millard *et al.* (1989) no encontraron un aumento en el peso del tubérculo por la adición de N. A pesar de que el follaje aumentó, el transporte de N de las hojas al tubérculo fue mayor en una planta N-deficiente que en una fertilizada.

El tubérculo demanda una gran cantidad de N, entre el 60-80 % del N total, (Kleinkopf *et al.*, 1981)³ y cuando el suministro es bajo, se agota el que contienen las hojas (Marschner, 1986) retardándose la producción de nuevo follaje, lo que lleva a la planta a la senescencia y ésta, a su vez, al cese del crecimiento del tubérculo (Moorby y Milthorpe, 1975).

Utilizando un sistema hidropónico se ha observado de manera precisa que la ausencia de Nitrógeno permite la tuberización en condiciones ambientales inductoras, pero en condiciones no inductoras la ausencia de N no induce la tuberización. También se ha visto que una vez iniciada, la tuberización puede ser detenida por la adición de N al medio, y renovada al volver a retirarlo, llevando incluso a la formación de tubérculos en cadena (Krauss, 1985). Trabajando en campo, Roberts *et al.* (1982) observaron un efecto similar, la producción de tubérculos disminuyó conforme se aumentó el N de 75-300 ppm y el suministro de altas cantidades de N en aplicaciones espaciadas o después de la siembra

³ Kleinkopf, *et al.* (1981) Agron. J. 73:799-802. Cit en Marschner, 1986.

produjeron malformaciones y crecimiento secundario en los tubérculos, y al aplicarlo al momento de la tuberización, ésta se deprimió.

Tal vez el control de la tuberización por el suministro de N sea debido a modificaciones en el balance de fitohormonas, tal como sucede con el fotoperíodo y la temperatura (Krauss, 1985). Sattelmacher y Marschner (1978a) observaron que al eliminar el N de la solución nutritiva, había una disminución en la actividad de citocininas en el vástago y un aumento en las raíces, mientras que con el suministro continuo de N se inhibe la tuberización y hay un descenso en la actividad de citocininas en la raíz, tal vez debido al aumento de su traslocación a otras partes de la planta (Sattelmacher y Marschner, 1978b). El descenso de citocininas en el vástago puede llevarlo a la senescencia (Sitton *et al.*, 1967)⁴.

Por otro lado, la actividad de GAs disminuye en ausencia de N y aumenta cuando se vuelve a suministrar (Krauss, 1985), mientras que el comportamiento del AAB es inverso, ya que aumenta con la deficiencia de N (Marschner, 1986).

Krauss (1985) resume lo anterior diciendo que un suministro continuo de N resulta en una relación AAB/GA baja, pero cuando se suspende el N, la relación aumenta y en condiciones inductoras de fotoperíodo y temperatura o con inhibidores de la síntesis de GA, se lleva a cabo la tuberización. En el tubérculo en crecimiento la relación AAB/GA se mantiene alta, y un aumento en el N del medio cambia ésta relación, deteniéndose el crecimiento del tubérculo, llevándolo incluso a la formación de un nuevo estolón. Por otro lado, las citocininas parecen no tener ningún papel en la inducción de la tuberización pero sí en la división celular y en la creación de una demanda de fotoasimilados para el desarrollo del tubérculo.

Además de su posible papel inductor, el N también puede estar relacionado con la tuberización porque afecta la traslocación de materia en la planta. Durante la senescencia, las proteasas almacenadas en las vacuolas se liberan, hidrolizando las proteínas del citoplasma y cloroplastos, aumentando el transporte del nitrógeno soluble, potasio, fósforo y carbohidratos (Marschner, 1986). Al comienzo de la senescencia la síntesis de almidón se redujo en plantas deficientes en N, pero la

⁴ Sitton, et al. (1967). *Planta* 73:296-300. Cit. en Sattelmacher y Marschner, 1978.

exportación de ^{14}C aumentó y 80% de éste se fue a los tubérculos, lo que puede deberse a una reducción en la demanda de fotoasimilados en las regiones meristemáticas porque no hay Nitrógeno disponible para la división y/o expansión celular; sin embargo, al final el contenido de materia seca fue mayor en las plantas fertilizadas con altas cantidades de N, tal vez porque la proporción absoluta exportada y/o su duración aumentaron (Oparka, *et al.*, 1987). Incluso, en hojas de soya, una deficiencia en la nutrición de N, causa una movilización del azufre soluble e insoluble mayor que una deficiencia en el propio S (Sunarpi y Anderson, 1997).

Los estudios revisados parecen indicar que la mayor influencia del N en la tuberización se debe al efecto que tiene en el balance de hormonas en toda la planta, ya que no se puede descartar que el efecto observado en la división de fotoasimilados se deba también a éste balance.

Santeliz y Ewing (1981) compararon la producción de papa fertilizando con diferentes cantidades de N; observaron que con mayor cantidad de N aumentó el área foliar, el peso fresco y seco de hojas, tallos y raíces, así como la producción de tubérculos; pero cuando algunos segmentos de las plantas tratadas se dejaron en condiciones para que las yemas tuberizaran, las plantas que habían recibido más N tuvieron un menor porcentaje de tuberización. Este hecho tal vez esté más relacionado con lo que ocurre con la tuberización *in vitro*, ya que cuando se cultivan brotes, son la yemas las que tuberizan sin la formación de estolones, en la mayoría de los casos.

Los trabajos de la influencia del N en la tuberización *in vitro* son muy escasos, y en su mayoría están enfocados a verlo como un factor secundario. El medio MS es utilizado casi en todos los trabajos de microtuberización, y es considerado como un medio alto en sales (Dixon, 1984) en especial en N, pues contiene un total de 62.5 mmoles N/L, lo cual es alto si consideramos que en trabajos utilizando medios hidróponicos una concentración de 3-5 mM N era suficiente para detener la tuberización.

Stallknecht y Farnsworth (1982a) observaron que la microtuberización inducida por cumarina, se ve reducida por varios factores como la sacarosa al 10%, el pH de

9.5, la temperatura de 15 y 30°C y la alta concentración de N (62.5 *versus* 2.5mM). Posteriormente Garner y Blake (1989) mencionan que el desacuerdo en las conclusiones de varios trabajos se debe a que las respuestas obtenidas se deben en gran parte a factores como la concentración de sacarosa, el cultivar empleado y el tipo de envase para el cultivo; estos autores proponen no utilizar reguladores del crecimiento y determinar si las microplantas responden a los mismos estímulos ambientales, particularmente al nitrógeno y el fotoperíodo. Utilizan concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 2.0 y 4.0 veces el N que contiene el MS; observaron que el número y peso de los microtubérculos disminuyó con la reducción del N y concluyeron que se puede obtener una formación confiable de microtubérculos usando el MS sin modificar (Tabla 5).

Von Meltzer (1992) coincide en que la masa del microtubérculo puede disminuir al reducir el N del medio y menciona además que la tuberización se retrasa, aunque el porcentaje de plantas que tuberizan es mayor.

Tabla 5
Efecto del nitrógeno en el cv. Pentland Javelin (media de 8 replicas)

Nitrogeno total (x MS)	Número promedio de microtubérculos	p.f. promedio de los microtubérculos por matraz (mg)	p.f. promedio por microtubérculo (mg)
0.1	7.69	302	40
0.25	7.50	433	60
0.5	9.75	682	75
1.0	10.25	1143	118
1.5	12.54	1057	87
2.0	14.40	769	58
4.0	4.08	83	23

Extraído de Garner y Blake (1989).

Charles y Rossignol (1992) modificaron el MS reduciendo el N a 18mM (medio G); este medio promovió un mayor crecimiento de tallo y hojas que el MS, lo cual atribuyen a que la proporción de NO_3/NH_4 fue de 5/1, por lo que sugieren que el amonio en altas concentraciones puede ser perjudicial para la planta. Posteriormente, aplicando estos medios a la microtuberización (Charles *et al.*, 1993),

vieron que el medio alto en N produjo más tubérculos/planta y de mayor talla, aunque requirió más del doble de tiempo que el medio G, en el cual a los tres días se empezaron a producir los tubérculos. El porcentaje de tuberización y el peso fresco, fueron menores en el medio G que en el MS, pero modificando las condiciones de cultivo (Tabla 6), pueden ser casi iguales.

Al parecer el contenido de Nitrógeno en el medio de cultivo sí puede alterar la respuesta de la microtuberización, aunque las diferentes condiciones de los experimentos, la composición total de los medios y el estado, características y variedad del explante utilizado, pueden ser la causa de la variabilidad en los resultados.

Fósforo

El Fósforo contribuye al desarrollo temprano de la planta de papa y a una tuberización más pronta, además de que se incrementa el número de tubérculos por planta (Beukema y van der Zaag, 1979) aunque la información a este respecto es muy escasa.

Tabla 6

Tuberización en el medio MS y G. Además de observarse el efecto del N, también se aprecian los efectos de diferentes ciclos de fotoperíodos y temoperíodos aplicados a los cultivos

Tratamiento DL+DC+obsc. (días)	% de explantos tuberizados	p.f. promedio por explante tuberizado	Número de tubérculos por explante tuberizado
Medio MS			
14 + 7 + 130	91	258	1.4
14 + 7 + 130	100	350	1.1
35 + 7 + 100	100	775	2.3
35 + 145 + 0	100	1426	2.2
Medio G			
35 + 14 + 21	78	1223	1.0
35 + 14 + 21	96	1282	1.1

(*) Días con temoperíodo (20 °C día/14 °C noche). Datos de Charles *et al.* (1993).

El P, además de formar parte de algunas biomoléculas como fosfolípidos y ácidos nucleicos, tiene funciones en el control de la síntesis de carbohidratos (Marschner, 1986). Herold *et al.* (1976)⁵ observaron que las hojas de varias especies de plantas mantenidas en medio deficiente en P acumularon grandes cantidades de almidón, a diferencia de cuando crecían en medio con concentraciones normales de P. De manera similar, Held *et al.* (1977)⁶ determinaron que la fijación de carbono y su incorporación en almidón disminuyó cuando la concentración de P se aumentó en la solución nutritiva de 0.15 a 3.5 mM.

Se ha observado un mecanismo regulador en el cloroplasto, en el cual la salida de triosas fosfato (TF) hacia el citoplasma es controlado por el traslocador de fosfato. Las altas concentraciones de Pi disminuyen las TF del cloroplasto y se inhibe o disminuye la síntesis de almidón, también se reduce la fijación de carbono debido a que el aceptor de CO₂, la ribulosa bifosfato, no se regenera (Flügge *et al.*, 1980). Las TF en el citoplasma pueden servir como sustrato para la síntesis de sacarosa y para la traslocación de ésta hacia los órganos de almacenaje o en crecimiento. La actividad de la sacarosa fosfato sintasa (SFS) depende del Pi para regular su actividad diurna (Jones y Ort, 1997) ya que se requiere su desfosforilación para activarla en la luz y la fosforilación para desactivarla en la obscuridad. En los tubérculos de papa la actividad de la SFS es estimulada por Glucosa-6-fosfato e inhibida por Pi así como por el estado fosforilado de la enzima de manera similar a la SFS de hojas (Reimholt *et al.*, 1994).

La ADP-Glucosa pirofosforilasa es la enzima clave en la regulación de la síntesis de almidón en tubérculos de papa. El activador más fuerte de ésta enzima fue el Gliceraldehído-3-fosfato (una TF), y el inhibidor más potente el Pi (Soworkinos, 1981) al igual que ocurre en hojas (Preiss, 1982), al parecer pequeños cambios en la concentración del Pi intracelular pueden ser de gran importancia fisiológica en la regulación de la síntesis de almidón durante la tuberización y la maduración del tubérculo (Soworkinos, 1981).

⁵ Herold, et al (1976). *New Phytol.* 76:397-407. Cit. en Preiss, 1982.

⁶ Held, et al. (1977). *Plant physiol.* 59:1146-1155. Cit. en Marschner, 1986.

No es una casualidad que el mecanismo en tubérculos y en hojas para la síntesis de almidón sea similar. En muchos tejidos de almacén el almidón se acumula en los amiloplastos, que son considerados organelos similares a los cloroplastos, ambos se desarrollan a partir de proplastidios, y es posible que el mecanismo de transferencia de metabolitos sea el mismo, y que la sacarosa que entra a las células de reserva sea metabolizada a Gliceraldehído-3-fosfato y luego éste entre al amiloplasto; la síntesis de ADP-Glucosa y de almidón podría entonces depender de la sacarosa que entre a la célula (Preiss, 1982) y tal vez de la disponibilidad de Pi para fosforilar los metabolitos que se requieren. Jener (1976)⁷ ya había notado las similitudes entre amiloplastos y cloroplastos y sugirió que la Dihidroxiacetona-P y el Gliceraldehído-3-P pueden transportarse dentro de los amiloplastos en intercambio por Pi vía el traslocador de fosfato. En la mayoría de los casos se cree que la principal fuente de carbono para la síntesis de almidón es la sacarosa, que es hidrolizada por la invertasa o que directamente produce ADP-Glucosa o UDP-Glucosa por la sacarosa sintasa (Preiss, 1982).

Cuando se inicia la tuberización la actividad de la sacarosa sintasa se incrementa rápidamente en la punta del estolón, al igual que la fructocinasa, mientras que la de la invertasa ácida disminuye (Ross *et al.*, 1994), algo similar ocurre en la caña de azúcar, en la que la actividad de la invertasa ácida resultó alta en las partes jóvenes que demandan hexosas para energía, y fue baja en las partes maduras, en las que se almacena sacarosa (Zhu, *et al.*, 1997).

Tal vez durante las primeras fases de la tuberización, en el estolón se acumule sacarosa, para después ser metabolizada hasta TF que serán transportadas al amiloplasto y ahí convertidas en almidón. La síntesis de almidón, el mayor carbohidrato de reserva en el tubérculo, forma una demanda de hexosas, pero como la capacidad para fosforilarlas no cambia sustancialmente éste podría ser un mecanismo de regulación (Ross, *et al.*, 1994).

⁷ Jener, (1976). En: *Transport and Transfer Processes in Plants*. Passioura, J.B. (editor). Academic. Cit. en Preiss,

Como se ve, el papel del P en la tuberización no es claro, aunque es un hecho que interviene de manera importante en la transformación de azúcares, lo que podría influir en el desarrollo y calidad del tubérculo. Por otro lado, se ha visto que la actividad de la SFS se ve afectada por la forma en que se suministra el N (NO_3 o N_2 atmosférico) pero no por la concentración de N en la hoja (Kerr *et al.*, 1984).

Este ha sido el papel más estudiado del P en las plantas, aunque en microorganismos, la producción de etileno se ve fuertemente inhibida por la adición de P_i al medio, se piensa que tal vez tenga que ver con las reacciones de fosforilación/desfosforilación de las enzimas en la vía de síntesis del etileno (Matoo *et al.*, 1979), si lo mismo ocurre en plantas, la adición de P_i podría causar una inhibición de la síntesis de etileno, el cual inhibe la tuberización. Recientemente se observó que el estado fosforilado de la ACC oxidasa, que finalmente convierte el ACC en etileno es esencial para su activación (Kuak y Lee, 1997).

En cultivo de tejidos, o por lo menos en cultivos de células en suspensión, las células parecen no tener un mecanismo que controle la entrada de P_i , lo cual las lleva a sufrir cierta toxicidad (Sakano *et al.*, 1995b) e incluso el P_i ha sido considerado como un factor limitante en el crecimiento celular (Sakano *et al.*, 1995a).

Potasio

El Potasio no parece tener un efecto en la producción de tubérculos de papa, sino en la calidad de los mismos, contenido de materia seca, presencia de puntos negros, daño y decoloración en la cocción (Beukema y van der Zaag, 1979), pero se ha visto que puede influir en el metabolismo de carbohidratos, así como en su transporte.

En hojas de soya el descenso en la concentración de K en el medio aumenta la actividad de la invertasa ácida y disminuye la actividad de la SFS, lo cual lleva a la acumulación de azúcares solubles que podrían estar involucradas en mantener el potencial osmótico de la hoja. También se reduce el material traslocado, lo que

puede estar asociado con el descenso en la actividad de la SFS (Huber, 1984). Algo similar se ha observado en tubérculos de papa (Marschner, 1986) ya que cuando se incrementa el K el contenido de agua y de ácido cítrico se incrementan también, debido a la osmorregulación y al balance catión/anión respectivamente, mientras que los azúcares reductores disminuyen, también debido a la osmorregulación.

Una alta osmolaridad puede ser necesaria para la síntesis de almidón, Oparka y Wright (1988) utilizando discos de tubérculos sumergidos en una solución 300 mM de Manitol, que proporciona una molaridad similar a la del tejido, observaron que la síntesis de almidón aumentaba, mientras que por arriba o por debajo de ésta concentración, la síntesis declinaba, aunque Ehret y Ho (1986)⁸ sugieren que las altas concentraciones de K en la solución nutritiva pueden estimular la síntesis de almidón, Oparka y Wright (*op cit.*) concluyen que al estar en sus experimentos ausente el K, el efecto solo se puede atribuir al estado osmótico.

No se podría descartar que al tratarse de experimentos distintos, el mecanismo para estimular la síntesis haya sido diferente, ya que unos trabajan con discos de tubérculos y otros con los frutos de la planta completa. Además las plantas en general permiten una mayor entrada de K a las células cuando las concentraciones del medio circundante son bajas, ya que los canales de K se activan de 0-10 mmoles K·L⁻¹, mientras que de 10-100 mmoles K·L⁻¹ no sufren alteraciones (Maathuis *et al.*, 1997).

El potasio puede ser importante tanto para la traslocación de sacarosa como la de aminoácidos hacia el tubérculo en desarrollo, parece ser que las concentraciones bajas de K en el apoplasto facilitan la carga de sacarosa y aminoácidos al floema (Fig. 2), mientras que las concentraciones altas la inhibirían debido a que se despolariza la membrana y se reduce el gradiente de H⁺ (Marschner, 1986). Existe evidencia de que un gradiente de H⁺ y/o K⁺ conducen el transporte de sacarosa en plantas superiores, y que funciona de manera opuesta en las células fuente y en las demandantes. En células de reserva de caña de azúcar, el K⁺ estimula la acumulación de sacarosa, que al parecer entra acoplada al K⁺ en un

⁸ Ehret y Ho, (1986). J. Hort. Sci. 61:361-367. Cit en Oparka y Wright, 1988.

transporte antiport con el H^+ . Este mecanismo tiene características en común con el que opera en la carga del floema (Saftner y Wyse, 1980).

Al parecer la deficiencia en K causa un aumento en la síntesis de AAB y un descenso en el peso de los granos de trigo (Haeder y Beringer, 1981)⁹. El AAB inhibe la carga de sacarosa al floema, aunque los resultados con varios granos son contradictorios ya que el AAB puede ser inhibidor o promotor

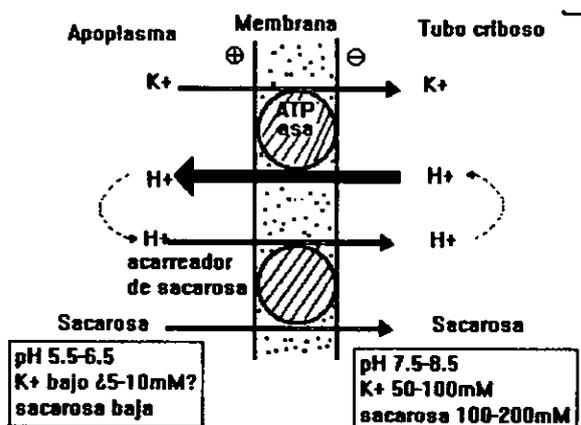


Fig. 2 Esquema del modelo de transporte de sacarosa al floema en el que la participación del K^+ es importante. (Basado en Marschner, 1986).

dependiendo del estado de desarrollo de los granos, además de que las auxinas, citocininas y giberelinas también ejercen efectos en la repartición de asimilados (Vreugdenhil, 1983).

En comparación con otros cultivos la papa requiere cantidades relativamente altas de K. En un estudio en el que se combinaron diferentes proporciones de K y N, Westermann, *et al.* (1994a) observaron que la mejor producción de papa se obtuvo con el doble de K respecto al N (448 Kg K/ha * 224 Kg N/ha). Un análisis de los tubérculos mostró que el aumento en las cantidades de N y K disminuye el contenido

⁹ Haeder y Beringer, (1981). J. Sci. Food Agric. 32. Cit. en Marschner, 1986.

de almidón, lo que atribuyen a que la acumulación de compuestos nitrogenados solubles (Westermann, et al., 1994b).

Otros minerales podrían estar involucrados en el proceso de tuberización, aunque han sido poco estudiados, en particular el Ca^{++} y el Mg^{++} pueden recuperar el proceso de tuberización cuando ha sido inhibido. Al parecer el Ca^{++} intracelular tiene un papel de mediador entre un estímulo hormonal y la calmodulina (Balamani, et al., 1986); también es posible que el Ca^{++} participe como segundo mensajero en la transducción de la señal inducida por el etileno, así como en la regulación de la síntesis del propio etileno (Kwak y Lee, 1997).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

Establecimiento del cultivo *in vitro*

Se utilizaron plantas de papa del cultivar Tollocan, obtenidas a partir de tubérculos donados por el Programa Nacional de la Papa del INIFAP.

A continuación se describen los pasos para el establecimiento del cultivo:

- a) los tubérculos se dejaron a la luz del sol y a temperatura ambiente aproximadamente durante un mes, con el objeto de provocar el crecimiento de las yemas;
- b) una vez brotadas las yemas se cortaron de los tubérculos y se lavaron con detergente durante 10 min;
- c) después de enjuagarse con agua destilada, se lavaron con etanol 80% durante 1 min;
- d) se enjuagaron con agua destilada estéril y se dejaron durante 20 min en una solución de hipoclorito de sodio 15%;
- e) se lavaron varias veces con agua destilada estéril y se dejaron sobre papel filtro estéril para quitar el exceso de agua.

A cada yema se le quitó la mayor parte de las hojas que cubrían al meristemo y finalmente se sembró cada una en tubos de ensayo de 22 x 150 mm con 10 ml de medio de cultivo compuesto por las sales del MS enriquecido con tiamina-HCl 0.5 mg/L, mio-Inositol 100 mg/L y sacarosa 4%; además se añadieron los siguientes reguladores del crecimiento para que se desarrollaran brotes: 2iP 5 mg/L, AIA 0.3 mg/L y cinetina 1.5 mg/L; el pH se ajustó a 5.8 con NaOH y se añadió agar 0.8% para gelificar.

Una vez sembrados, los tubos se colocaron en un cuarto de incubación con las siguientes condiciones: luz fluorescente blanca con una densidad de flujo fotónico (DFF) de aproximadamente $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 16 h luz/8 h oscuridad; y una temperatura que fluctuó entre 25-27 °C (en oscuridad y luz respectivamente).

Propagación

Los brotes obtenidos en el medio anterior se propagaron cada cuatro semanas, seccionándolos en fragmentos de dos a tres entrenudos, desechando la raíz y el meristemo apical y subcultivándolos en tubos de ensayo de 22 x 150 mm con 10 mL de un medio que difería del anterior en los componentes orgánicos: tiamina HCl 0.3 μM , mio-Inositol 0.49 mM, piridoxina HCl 2.4 μM , glicina 30 μM , ácido nicotínico 4.66 μM , sacarosa 3% y agar 0.7%, pH 5.8 y no que no contenía reguladores del crecimiento.

Las condiciones de crecimiento en un inicio fueron las mismas que en el caso anterior, posteriormente, tanto estas condiciones como el medio se modificaron ya que se observó que el crecimiento era lento. La DFF se aumentó a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, reduciendo la distancia entre los tubos de luz y los cultivos, esto también alteró la temperatura que fue de 25-30 °C.

El medio se modificó añadiendo el doble de EDTANa₂ (Tabla 7), es decir que aumentó de 0.1 a 0.2 mM; ésto se hizo debido a que el hierro queda insuficientemente quelado con una relación equimolar de EDTA/Fe, y el hierro que queda libre como Fe⁺⁺ se oxida rápidamente a Fe⁺⁺⁺, formando un compuesto insoluble con el fósforo (fosfato férrico) al ajustar el pH a 5.8 o más; posteriormente dicha precipitación se acentúa al esterilizar. Este inconveniente se reduce en gran parte al aumentar la relación EDTA/Fe al 2:1 (Vyskot y Bezdek, 1984) o al reducir el FeSO₄ (Dalton *et al.*, 1983). En éste trabajo se optó por lo primero.

En un trabajo de microtuberización se reportaron modificaciones similares, Garner y Blake (1989) utilizaron una mezcla de sales del MS preparada por los laboratorios Flow, a la que le adicionaron 37.6 mg/L de Na-Fe-EDTA, porque observaron que había un aumento en el desarrollo y color de las hojas, aunque no mencionan las posibles causas.

También se hicieron las siguientes modificaciones de acuerdo con Haberlach *et al.* (1985), quienes observaron un mayor desarrollo de los brotes de papa: el CaCl₂

Tabla 7

Composición de los medios utilizados para el desarrollo del presente trabajo. Se pueden apreciar las diferencias entre los testigos, los controles y los medios experimentales.

Ingredientes	MS	MS-H	Medios Experimentales	Cont +	Cont -	Testigo 1	Testigo 2	Testigo 3
Macronutrientes								
NH ₄ NO ₃	2.06 x 10 ⁻²	*	0 - 5.0 x 10 ⁻³	2.06 x 10 ⁻²	*	*	*	3.0 x 10 ⁻²
KNO ₃	1.88 x 10 ⁻²	*	-	1.88 x 10 ⁻²	*	*	*	-
KCl	-	-	0 - 1.5 x 10 ⁻²	-	-	-	-	2.0 x 10 ⁻²
CaCl ₂	3.00 x 10 ⁻³	6.00 x 10 ⁻³	3.00 x 10 ⁻³	*	*	*	*	*
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.50 x 10 ⁻³	*	*	*	*	*	*	*
KH ₂ PO ₄	1.25 x 10 ⁻³	2.5 x 10 ⁻³	-	1.25 x 10 ⁻³	*	*	*	-
H ₃ PO ₄	-	-	0-5.0 x 10 ⁻³	-	-	-	-	1.25 x 10 ⁻³
Micronutrientes								
KI	5.00 x 10 ⁻⁶	*	*	*	*	*	*	*
H ₃ BO ₃	1.00 x 10 ⁻⁶	*	*	*	*	*	*	*
MnSO ₄ ·4H ₂ O	9.99 x 10 ⁻⁵	*	*	*	*	*	*	*
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.99 x 10 ⁻⁶	*	*	*	*	*	*	*
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1.00 x 10 ⁻⁶	*	*	*	*	*	*	*
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.00 x 10 ⁻⁷	*	*	*	*	*	*	*
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.00 x 10 ⁻⁷	*	*	*	*	*	*	*
Fuente de Hierro								
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.00 x 10 ⁻⁴	*	*	*	*	*	*	*
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1.00 x 10 ⁻⁴	2.00 x 10 ⁻⁴	*	*	*	*	*	*
Citrato de Na	-	-	1.25 x 10 ⁻²	-	-	-	1.25 x 10 ⁻²	-
Ingredientes orgánicos								
Myo-inositol	4.90 x 10 ⁻⁴	*	*	*	*	*	*	*
Acido nicotínico	4.66 x 10 ⁻⁶	8.10 x 10 ⁻⁷	*	*	*	*	*	*
Piridoxina-HCl	2.40 x 10 ⁻⁶	5.00 x 10 ⁻⁷	*	*	*	*	*	*
Tiamina-HCl	3.00 x 10 ⁻⁷	2.70 x 10 ⁻⁶	*	*	*	*	*	*
Glicina	3.00 x 10 ⁻⁵	5.30 x 10 ⁻⁶	*	*	*	*	*	*
Cinetina mg/L	-	-	-	3.50	-	-	-	-
Sacarosa g/L	30	*	80	*	20	80	*	*
Agar g/L	7	*	*	*	*	*	*	*

(*) La concentración de este ingrediente es igual a la de la columna anterior.

(-) Este ingrediente no se utiliza en este medio

Las concentraciones son molares a menos que se indique otra.

piridoxina HCl 0.5 μM , ácido nicotínico 0.81 μM y glicina 5.3 μM , (Tabla 7), a éste medio se le llamó MS-H.

Aplicación de los tratamientos

Medios inductores

Se realizó un experimento factorial en un diseño completamente al azar, se probaron tres factores con tres niveles cada uno (Tabla 8). Los 27 tratamientos resultantes son referidos como medios experimentales a lo largo del trabajo. Se realizaron dos experimentos independientes con 12 repeticiones en el primero y 10 en el segundo.

Tabla 8.

Las concentraciones de los elementos manejados fueron escogidas aproximadamente de acuerdo a las que presentan diversos medios de cultivo, ya que las concentraciones que se utilizan en campo no se pueden transformar de manera exacta a las que se manejan *in vitro*. La combinación de los tres niveles de cada factor dieron como resultado 27 tratamientos.

N mM									K mM
0			2.5			5.0			
0-0-0 I	0-2.5-0 II	0-5-0 III	2.5-0-0 IV	2.5-2.5-0 V	2.5-5-0 VI	5-0-0 VII	5-2.5-0 VIII	5-5-0 IX	0
0-0-15 X	0-2.5-15 XI	0-5-15 XII	2.5-0-15 XIII	2.5-2.5-15 XIV	2.5-5-15 XV	5-0-15 XVI	5-2.5-15 XVII	5-5-15 XVIII	15.0
0-0-30 XIX	0-2.5-30 XX	0-5-30 XXI	2.5-0-30 XXII	2.5-2.5-30 XXIII	2.5-5-30 XXIV	5-0-30 XXV	5-2.5-30 XXVI	5-5-30 XXVII	30.0
0.0	2.5	5.0	0.0	2.5	5.0	0.0	2.5	5.0	
P mM			P mM			P mM			

Los números romanos indican el número con el que se designó cada tratamiento.

Debido a los objetivos perseguidos los medios experimentales presentaron las siguientes modificaciones con respecto al MS:

a) Las fuentes originales de NPK se sustituyeron por otras, con el fin de cambiar sólo la concentración del elemento en cuestión, en lugar de KNO_3 y KH_2PO_4 .

se utilizó KCl y H_3PO_4 como fuente de Potasio y de Fósforo respectivamente; como fuente de Nitrógeno se utilizó NH_3NO_4 únicamente (Tabla 7).

b) Al aumentar la cantidad de fósforo se presentaba un precipitado bastante evidente, aún con la relación EDTA/Fe mencionada anteriormente, por lo que se siguieron las recomendaciones de Vyskot y Bezdek (1984) añadiendo citrato de sodio 1.25 mM para evitar tal efecto, sin embargo ésa concentración de citrato no fue suficiente, por lo que se aumentó a 12.5 mM de citrato de sodio, eliminándose con esto por completo la precipitación. Lo anterior se consideró necesario ya que un análisis de la composición del medio precipitado revela una pérdida del 50.39% de Fe, seguido por: Zn 20.2%, PO_4 13.13%, SO_4 18%, K 11%, Ca 8.3%, Mn 5.4 % y otros elementos en cantidades menores (Daiton, *et al.*, 1983). Experimentos preliminares no mostraron ningún efecto negativo del citrato de sodio en el crecimiento de brotes de papa.

Controles

Además de los medios experimentales se probaron dos medios como control y tres como testigos (Tabla 7):

- a) Control positivo (CONT+): este medio contuvo Kin y se utilizó para comparar los resultados de las modificaciones en NPK con un fuerte inductor de la tuberización.
- b) Control negativo (CONT-): se utilizó para comparar la microtuberización en dos concentraciones de sacarosa: 2 y 8%.
- c) Testigos 1 y 2: se realizaron para ver si el citrato de sodio tenía algún efecto sobre la microtuberización.
- d) Testigo 3: se realizó también para observar si había algún efecto debido a las modificaciones en las fuentes de NPK.

Estos medios estuvieron compuestos por las sales del MS sin modificar, para que los resultados fueran comparables con la bibliografía.

Inducción de la tuberización

Una vez que los brotes se desarrollaron hasta alcanzar 6 o más nudos se trasplantaron a los medios inductores, en éstos permanecieron durante ocho semanas bajo condiciones de obscuridad total y una temperatura mínima promedio de 20 ± 2.6 °C y una máxima de 22.7 ± 2.1 °C. El trasplante se hizo eliminando la raíz y la región del ápice, sembrando fragmentos de entre 3-5 nudos en tubos de ensayo de 22 x 150 mm con 10 mL de medio cada uno.

Evaluaciones

Para evaluar la tuberización *in vitro* obtenida con cada medio se consideraron los siguientes parámetros:

Porcentaje de tuberización

Se consideró como el número de brotes que tuberizaron en relación al número de unidades experimentales para cada medio:

$$\% \text{ de tuberización} = \frac{\text{No. de brotes que tuberizaron}}{\text{No. de U. experimentales}}$$

Número de tubérculos por brote

Esta fue la relación del número total de microtubérculos producidos y el número de unidades experimentales, pues en cada unidad se sembró un solo brote:

$$\text{Microtubérculos/brote} = \frac{\text{No. total de microtubérculos}}{\text{No. de U. experimentales}}$$

Talla de los microtubérculos

Para la talla se tomaron tres parámetros:

- a) Diámetro: esta medida se tomó al momento de cosechar los microtubérculos, se utilizó un vernier y se tomó en cuenta el punto de unión a la plántula para saber cuál era el eje longitudinal y cuál el transversal
- b) Peso fresco: el cual se tomó inmediatamente después de haberlos cosechado.

- c) **Peso seco:** después de haber sido pesados y medidos se secaron a 80 ± 5 °C durante 48 hrs y se registro nuevamente el peso.

Tuberización en medio líquido

Se realizó un experimento adicional utilizando el método de Estrada *et al.* (1986), que esta reportado como muy productivo. Se escogieron cuatro de los medios experimentales que dieron porcentajes de tuberización altos y se compararon con el CONT+.

Los cultivos crecieron en matraces de 250 ml en agitación orbital constante de 100 r.p.m. bajo las mismas condiciones de crecimiento que los cultivos en tubo; permanecieron así por cuatro semanas. Posteriormente el medio que contenían los matraces se sustituyó por el medio de inducción correspondiente, y los cultivos se trasladaron a obscuridad en las mismas condiciones de tuberización ya mencionadas donde permanecieron tres semanas.

Al final del periodo de tuberización se cosecharon los microtubérculos y se midió: peso fresco, diámetro, número de tubérculos por matraz, peso fresco y número de brotes.

Análisis de datos

Se realizó un análisis de varianza trifactorial (ANDEVA), para cada variable de respuesta y las medias se separaron por la prueba de LSD, esto se hizo mediante el paquete estadístico STATISTICA.

ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Porcentaje de tuberización

En todos los medios se registró la formación de tubérculos, excepto en el CONT-, que contenía sacarosa al 2%. Estos resultados confirman lo observado por varios autores en cuanto a que es necesario que la sacarosa se encuentre en concentraciones elevadas para que haya tuberización *in vitro* (Khuri y Mooby, 1995).

En los medios experimentales el porcentaje de tuberización varió con las diferentes proporciones de NPK. Los medios con el porcentaje más alto corresponden a los que no contuvieron fósforo ni potasio (Fig. 3A).

En la figura 3B se graficaron éstos mismos datos dando prioridad al nitrógeno, de ésta manera, se aprecia que el porcentaje tiende a disminuir conforme aumentan P y K, y no parece que esto se acentúe con el aumento de N, de hecho, 5 mmoles-L⁻¹ de N parecen revertir parcialmente el efecto inhibitor del P y el K. El análisis de varianza (Anexo I) muestra que en efecto hay diferencias significativas para éstos dos elementos ($p < 0.0002$ para K y $p < 0.0017$ para P).

Al analizar el efecto de cada elemento por separado (Fig. 4) se ve que el porcentaje de tuberización disminuye conforme aumenta la concentración, principalmente de K y P; el comportamiento del N fue irregular, tal vez por esto no se encontraron diferencias estadísticas. Al parecer, existe una interacción entre potasio y fósforo, aunque no hay diferencias significativas ($p = 0.24087$), se observa una tendencia de disminución de la tuberización conforme aumenta la concentración de ambos elementos; sin potasio el porcentaje se mantiene casi igual aunque aumente el P (Fig. 5). Los resultados son contrarios a lo que se esperaba, ya que se ha reportado que en cultivos hidropónicos una concentración de 3-5 mmoles de N-L⁻¹ es suficiente para inhibir la tuberización, aún cuando ésta ya se haya iniciado (Sattelmacher y Marschner, 1978a, Krauss, 1985).

Trabajando con cultivos *in vitro*, von Meltzer (1992) reportó que había un aumento de la tuberización con la reducción del N del medio, mientras que

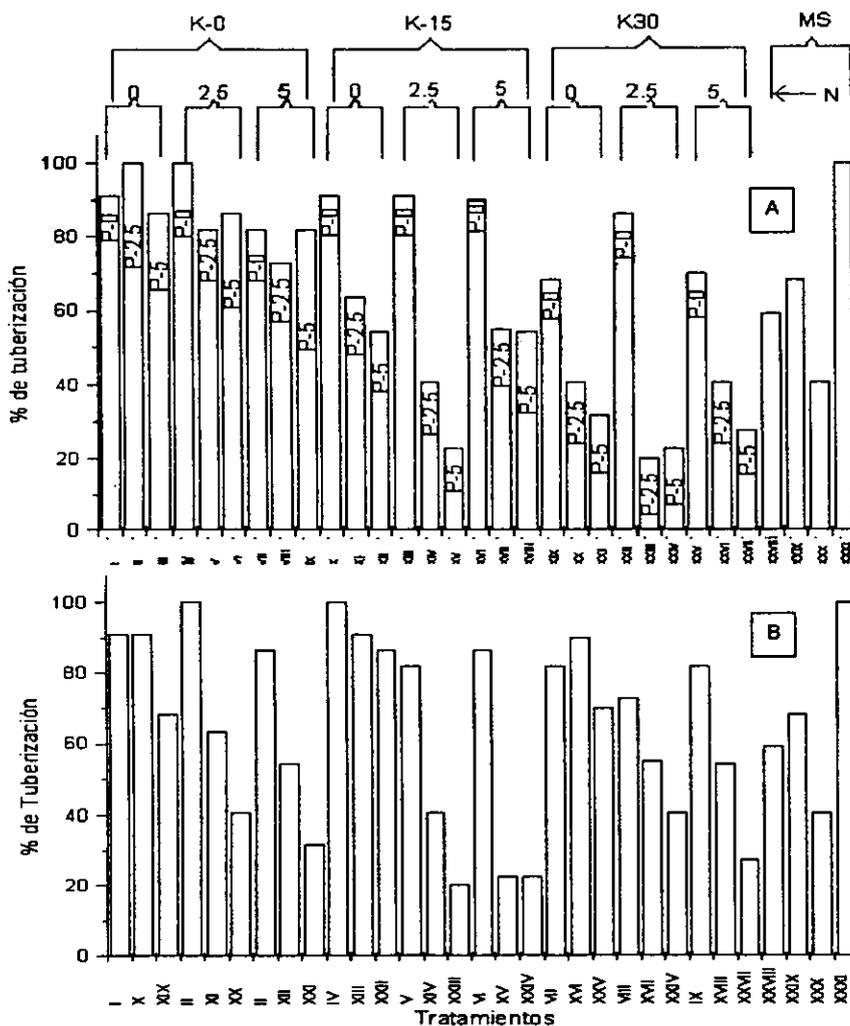


Fig. 3. Porcentaje de tuberización en 31 medios probados, el CONT- no se muestra porque no hubo tuberización. En la figura A los medios están graficados dando prioridad al K, seguido del N y luego del P; se aprecia que los medios con un mayor porcentaje son los que no contienen K; mientras que cuando el K esta presente, son los que no contienen P los del porcentaje más alto; también en éstos disminuye el porcentaje conforme aumenta la concentración de P. Los tratamientos están numerados del 1-31 en forma consecutiva, mientras que en B, la numeración no es consecutiva porque los tratamientos ahora se han distribuido dando prioridad al N seguido del P y del K; de ésta manera se puede apreciar que el N no tiene un efecto negativo en la tuberización. Los últimos cuatro medios fueron los controles. Los porcentajes son la media de dos experimentos independientes.

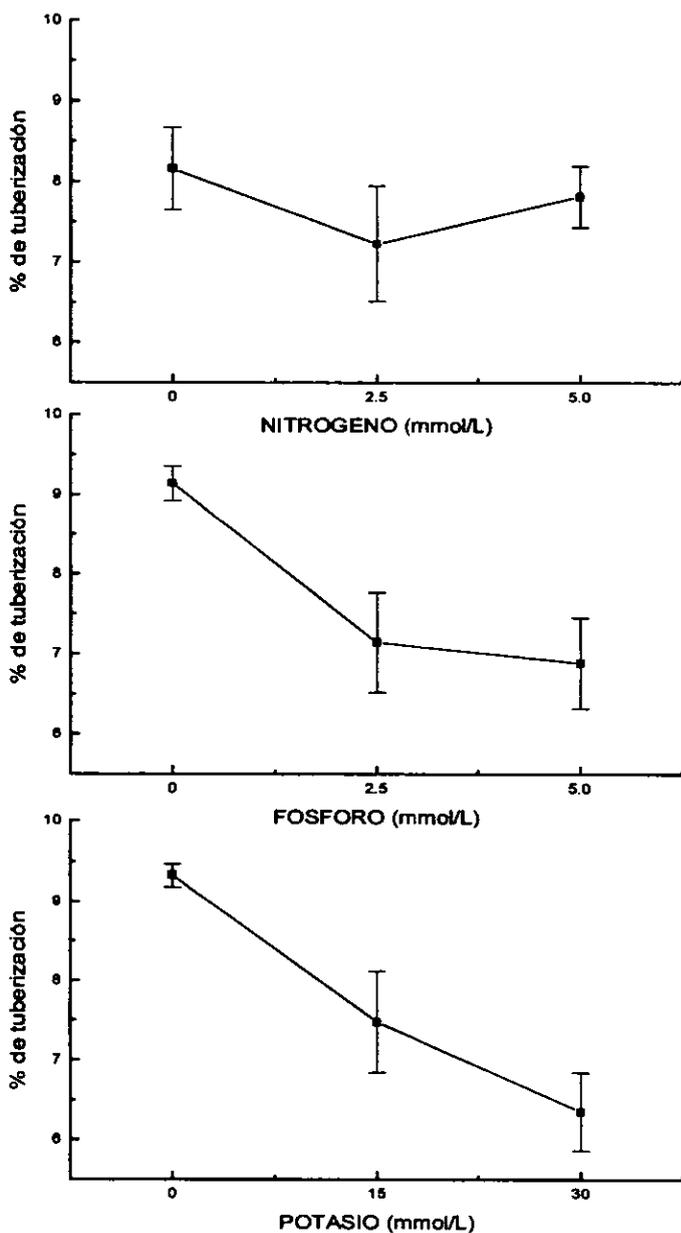


Fig. 4 Efecto principal de N, P y K en el porcentaje de tuberización. Los datos mostrados son los valores transformados del porcentaje, debido a que éstos fueron los que se analizaron estadísticamente. Media \pm Err.Std.

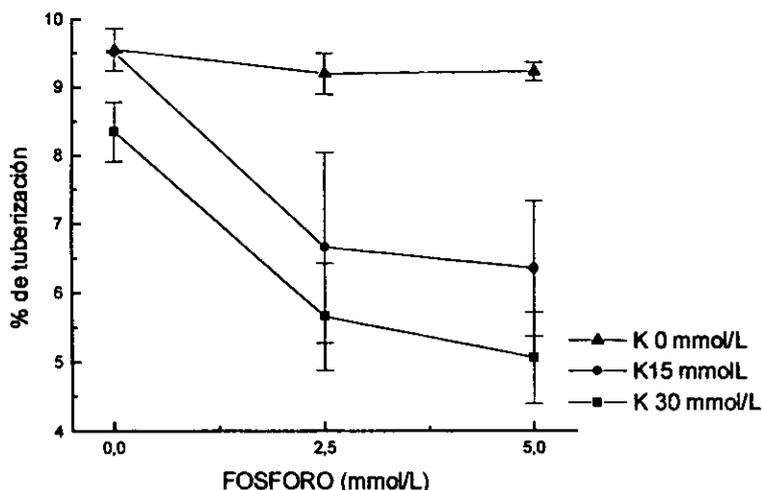


Fig. 5 Efecto principal de la interacción P x K. No se encontraron diferencias significativas pero se observa la tendencia a la disminución de la tuberización cuando aumentan las concentraciones de estos dos elementos. Media \pm Err.Std.

Garner y Blake (1989) y Charles *et al.* (1993) observaron que la reducción del N no aumentó el porcentaje de tuberización, por el contrario fue menor. En los trabajos citados el N se redujo a 6.3 y 18.6 $\text{mmoles}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente; en el presente trabajo las concentraciones de N fueron menores, incluso nueve de los medios no contenían N, a pesar de esto no parece haber algún efecto del N en la microtuberización.

Los resultados muestran un mayor efecto causado por el P y el K. Actualmente no existen informes de tuberización *in vitro* que hayan evaluado el efecto de éstos elementos. En Corea, se realizaron trabajos para tratar de aumentar la microtuberización de tres variedades locales, para lo que se probaron los efectos de varios factores, incluyendo la adición de KMnO_4 , con lo cual, se incrementó el número de tubérculos (Choi *et al.*, 1994), pero seguramente éste efecto no se debió al aumento de K, sino a la disminución de etileno, ya que el KMnO_4 es un absorbente de etileno, hormona que puede inhibir la tuberización *in vitro* (Mingo-Castel *et al.*, 1976).

El efecto del N sobre la tuberización, en planta completa, se ha relacionado con cambios en el patrón de fitohormonas (Sattelmacher y Marschner, 1978a y b;

Krauss, 1985; Vreugdenhil y Struik, 1989). Tal vez el P y el K, tengan algún efecto en el estado hormonal de la planta, la síntesis de etileno por ejemplo, se encuentra regulada por la fosforilación de la ACC oxidasa (Kwak y Lee 1997)

En los medios en los que los brotes tuvieron un bajo porcentaje de tuberización, se observó un mayor desarrollo de raíces y de nuevos brotes, mientras que cuando el porcentaje de tuberización fue alto, el desarrollo vegetativo fue menor, o incluso, nulo (Fig. 6). Esto podría ser una evidencia de actividad hormonal distinta que tal vez determine una competencia entre brotes y microtubérculos, como respuesta a los diferentes medios.

Se ha observado que el desarrollo vegetativo de las plantas que tuberizan es menor al de las plantas que no lo hacen (Ewing y Wareing, 1978); éstas diferencias en el desarrollo podrían deberse a un cambio en el patrón de fitohormonas, principalmente un descenso de GAs (Railton y Wareing, 1973) o una mayor actividad de citocininas (Pelacho y Mingo-Castel, 1991a). También se ha visto que *in vitro*, las sustancias retardadoras del crecimiento, que son antagonistas de GAs, inducen la tuberización (Harvey *et al.*, 1991, Levy *et al.*, 1993, Simko, 1994).

Al respecto no se pueden sacar conclusiones, pues sería necesario medir la actividad y/o concentración hormonal de los brotes en cada medio.

Otra posibilidad es que las concentraciones de P, hayan resultado tóxicas. Se ha observado en cultivos de células en suspensión, que el P en concentraciones mayores a las del MS son tóxicas e inhiben el crecimiento y la acumulación de almidón, porque al parecer provoca un disturbio en el metabolismo de los ácidos orgánicos (Sakano *et al.*, 1995a y b).

En cuanto a los medios utilizados como testigo y control, los porcentajes de tuberización observados fueron similares a los de otros reportes (Fig. 8). Forsline y Langille (1976) obtuvieron 68.9% aplicando citocininas; Hussey y Stacey (1984) 93% usando BAP y CCC; Banfalvi *et al.* (1997) 100 y 50% con y sin BAP respectivamente. En el presente trabajo se observó un 100% de tuberización en el MS+Kin, y de 40-70% en el MS sin Kin; éstos últimos fueron menores que los obtenidos por Charles *et al.* (1993) para el medio MS sin reguladores del crecimiento; las diferencias podrían

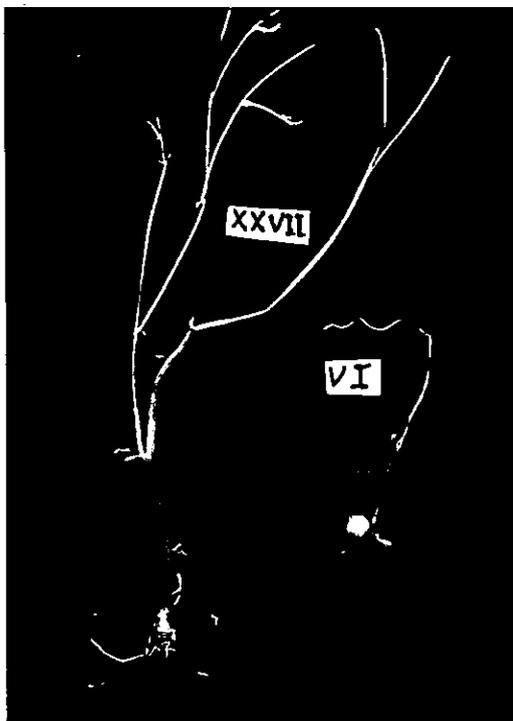


Fig. 6 El desarrollo de las plantas que tuberizaron fue menor comparado con las plantas que no lo hicieron, tanto en número y longitud de raíces como de nuevos brotes. La actividad hormonal podría estar involucrada en que se destinen los recursos al tubérculo en desarrollo y no al crecimiento del brote.

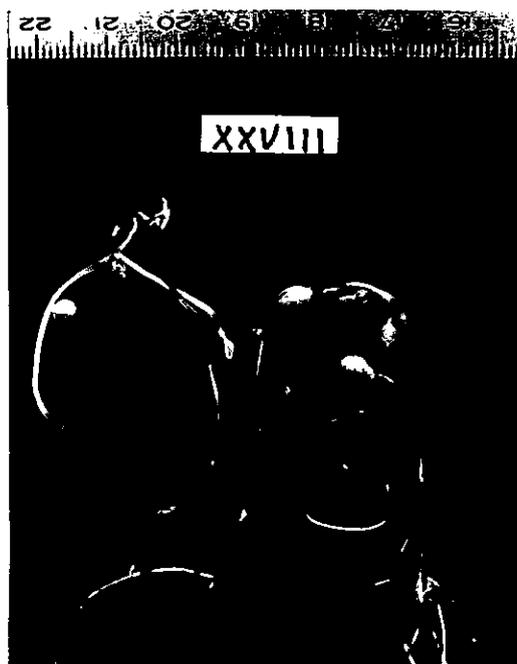


Fig. 7 Brotes en los que se desarrolló más de un tubérculo. La talla de cada uno, fue menor que cuando se desarrollaba uno solo, pero esto revela que el número de tubérculos puede ser mayor de lo que hasta ahora se ha reportado.

deberse a que ellos aplicaron tratamientos para inducir la tuberización antes de la estancia de las plantas en obscuridad (ver tabla 6).

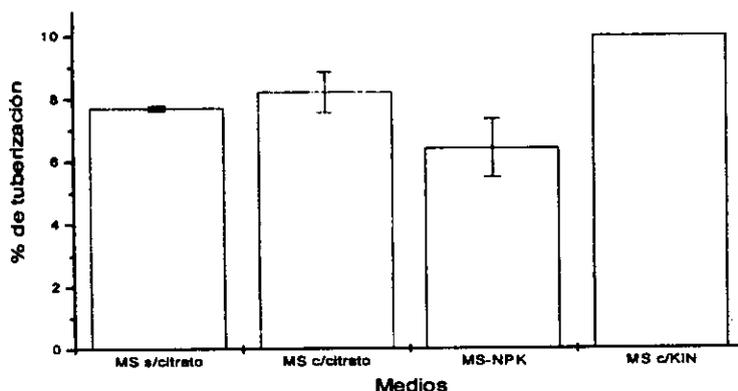


Fig. 8 Porcentaje de tuberización de los medios control. Estos medios se utilizaron para ver si existía algún efecto del citrato de sodio, o las fuentes de NPK utilizadas en los medios experimentales. La Kin se utilizó como control positivo ya que es un fuerte inductor de la tuberización. Datos transformados; Media \pm Desv. Est.

Según Levy *et al.* (1993) un nudo sencillo cortado de una planta no inducida no puede generar las suficientes hormonas como para inducir la tuberización, aún en obscuridad continua. Las plantas utilizadas en el presente trabajo no estaban inducidas, ya que crecieron con fotoperíodo de 16h y alta temperatura, antes de aplicar los tratamientos, y aún así, en varios medios experimentales se alcanzó el 100%, esto podría indicar que la sola modificación de NPK, en especial la ausencia de P y K, induce lo suficiente a las plantas como para desencadenar la tuberización, tanto como la Kin y tal vez más que otros reguladores del crecimiento.

Las fuentes de P y K utilizadas en los medios experimentales (ver tabla 7) tal vez tuvieron un efecto negativo sobre la tuberización, ya que de los testigos, el medio que tuvo el porcentaje de tuberización más bajo fue el que se preparó con las mismas fuentes de NPK que los medios experimentales (Fig. 8). También se muestra que el medio con citrato de sodio tuvo un porcentaje un poco más alto que el que no contenía citrato. Pelacho *et al.* (1994) observaron que la adición de algunos ácidos

orgánicos aumenta la tuberización *in vitro*, incluso más que la Kin y otros reguladores.

En los medios del presente trabajo, parte del citrato de sodio se encontraba como ácido cítrico, debido al pH del medio, pero éste no tuvo un efecto tan marcado dado que no hay diferencias estadísticas con el medio sin citrato. Se puede considerar entonces que el efecto observado en los medios experimentales, se debe únicamente a las modificaciones en el contenido de NPK, ya que el resto de las condiciones, fueron iguales para todos los cultivos.

Número de tubérculos por brote

El número de tubérculos fue muy variable, las medias fluctuaron entre 0.3 y 1.4 tubérculos-brote⁻¹. Se observaron algunos casos en los que había varios tubérculos en un mismo brote, aunque muy pequeños (Figura 8). La tendencia para cada medio fue similar a la observada en el porcentaje de tuberización; con el ANDEVA (Anexo I) se encontraron diferencias significativas para el P, el K y la interacción P x K ($p < 0.0024$, K; $p < 0.0026$, P y $p < 0.0432$, K x P).

El número de tubérculos producidos por brote disminuyó casi un 50% en los medios de mayor concentración con respecto a la menor de P y K y se mantuvo casi igual en las tres concentraciones de N (Fig. 9). Al analizar la interacción P x K, parece que tal disminución es más acentuada con el aumento de P (Fig. 10).

Stallknecht y Farnsworth (1982a) observaron que la microtuberización inducida por cumarina era inhibida por la alta concentración de N (2.5 vs 62.5 mM N), pero Garner y Blake (1989) en medio sin reguladores del crecimiento vieron que altas concentraciones de N aumentaron el número de tubérculos *in vitro*. Charles *et al.* (1993) obtuvieron promedios de 1.1 y 2.2 microtubérculos-brote⁻¹ en la comparación de dos medios: el G y el MS (18.6 y 62.5 mmol N·L⁻¹ respectivamente), por lo que concluyeron que el nitrógeno aumentó el número de microtubérculos.

Nosotros no encontramos que el número de tubérculos aumentara notablemente con el nitrógeno, tal vez las concentraciones usadas fueron muy bajas, sin embargo aún en los testigos la media fue menor a la reportada por otros autores,

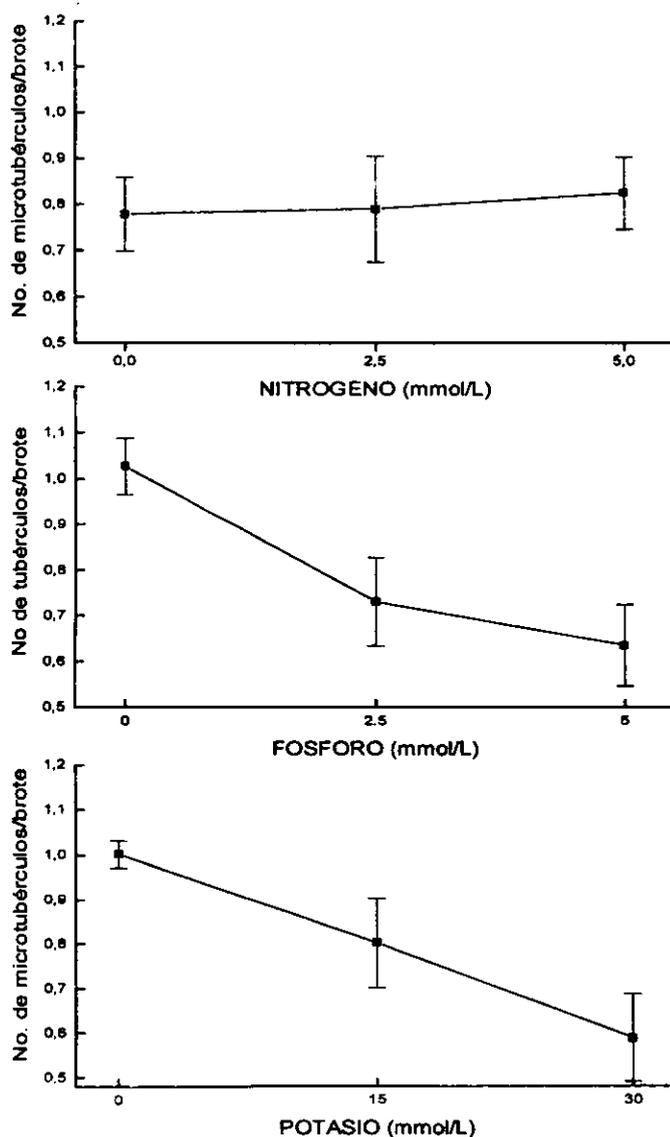


Fig. 9 Efecto principal de N, P y K sobre el número de microtubérculos/brote. En los encabezados de cada gráfica se encuentran los datos del ANDEVA. Media \pm Err.Std.

de éstos medios, el promedio más alto fue el del MS+Kin (1.1 tubérculos/brote), siendo igual que el de algunos medios experimentales (VIII, X y XVI), e inclusive menor al de otros, encontrándose el promedio más alto en el medio XXII.

En campo se le atribuye al fósforo el incremento del número de tubérculos (Beukema y van der Zaag, 1979), pero no hay suficiente información para sustentar esta afirmación. En este trabajo, se observó el efecto contrario (Fig. 9B) por lo menos para la tuberización *in vitro* con el sistema empleado aquí.

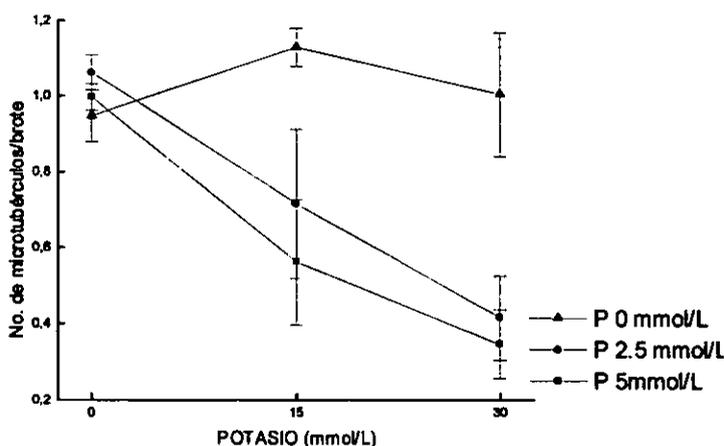


Fig. 10 Efecto de la interacción entre P y K en el número de tubérculos/brote. Media \pm Err.Std.

El número de tubérculos que pueden formarse *in vitro* depende del número de yemas axilares que tenga cada brote, ya que son estas las que van a formar el tubérculo. En algunos casos los brotes sembrados en los diferentes tratamientos no se desarrollaron más por lo tanto quedaron sólo con 3-5 yemas, pero en la mayoría se desarrollaron nuevos brotes y con esto aumentó el número de yemas. Muchos de los tubérculos se formaron en los nuevos brotes. Cada yema es un tubérculo en

potencia; las plantas que se pueden apreciar en la figura 7 son una prueba de que el número de tubérculos puede incrementarse mucho más de lo que hasta ahora se ha logrado, por lo que es necesario seguir buscando las condiciones adecuadas.

Tal vez la formación de un tubérculo ejerza una inhibición sobre el resto de las yemas, impidiendo la formación de más tubérculos (Levy *et al.*, 1993), aquí se observó que cuando se formaba más de un tubérculo-brote⁻¹, uno se desarrollaba más que los otros, o todos permanecían pequeños (Fig. 11), puede ser que exista una competencia entre los tubérculos por los recursos de la planta, a favor de que solo uno o dos se desarrollen bien, permaneciendo el resto de las yemas en su mismo estado.

Desarrollo de los microtubérculos

En el desarrollo de los tubérculos, observado como peso fresco (PF), peso seco (PS), y diámetro (Diam.) se registraron datos muy variables. Dentro de un mismo tratamiento se encontraban algunos tubérculos grandes y otros pequeños, sobre todo cuando se formó más de uno por brote (Fig. 12).

Los datos de PF variaron entre 10 mg y 150 mg-tubérculo⁻¹. Con el ANDEVA (Anexo I) se encontró que la interacción entre K y N ejerce un efecto significativo en el aumento del peso ($p < 0.0123$); en ausencia de K el PF disminuye conforme aumenta el nitrógeno, pero cuando hay K el PF aumenta con el N (Fig. 13A). Estos pesos son menores a los registrados por otros autores, Harvey *et al.* (1991) reportaron pesos de 18.9-234 mg; y Simko (1994) de 55-260 mg de PF.

El PS, por su parte, fue de alrededor del 10% del PF, y tuvo un patrón similar (Fig. 13B); también se encontró diferencia significativa en la interacción K x N ($p < 0.0133$). Parece que el aumento de N en el medio facilita una mayor acumulación de materia seca en los tubérculos. Gamer y Blake (1989) observaron que la disminución de N del medio provoca también una disminución del peso de los microtubérculos, mientras que Charles *et al.* (1993) reportaron lo contrario; las diferencias en estos trabajos pueden deberse a las condiciones en que se desarrollaron los experimentos y a los cultivares empleados, ya que en ambos

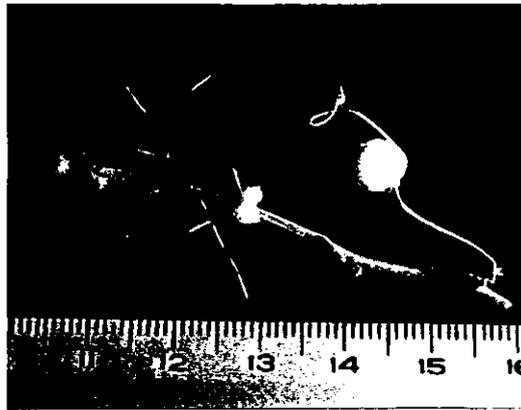


Fig. 11 Cuando un en un brote se formaba más de un tubérculo, generalmente uno se desarrollaba más que los otros, o todos permanecían pequeños, comparándolos cuando solo se formaba uno. Al parecer la presencia de un tubérculo inhibe el crecimiento de otros.

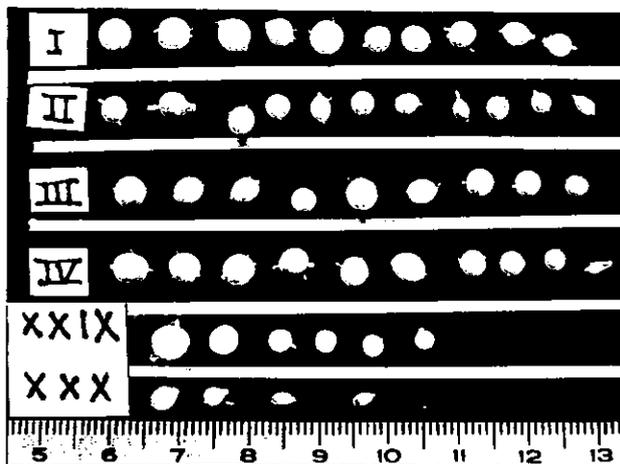


Fig. 12 El crecimiento de los microtubérculos fue muy variable dentro de un mismo tratamiento, aquí se muestran los tubérculos formados por cuatro de los medios experimentales que mostraron un mayor porcentaje de tuberización, comparados con dos controles.

trabajos se probaron diferentes factores antes, y durante la inducción, además de diferentes sistemas de cultivo

La tuberización en el presente trabajo se desarrolló en oscuridad la cual puede disminuir el potencial de crecimiento de los tubérculos (Garner y Blake, 1989). Se ha visto que el peso del microtubérculo puede depender del cultivar y del fotoperíodo aplicado antes y durante la tuberización (Seabrook *et al.*, 1993). A excepción de un trabajo, Tollocan no se encontró reportada en estudios de microtuberización, Estrada *et al.* (1986) obtuvieron la tuberización *in vitro* de éste y otros 54 genotipos, pero solo muestran los resultados de 10 de ellos, sin incluir a Tollocan; además el sistema de crecimiento e inducción en medio líquido que emplearon, es mucho más productivo que el que se usó para el presente trabajo como se verá más adelante.

Por otra parte, en ninguno de los trabajos consultados sobre microtuberización se menciona que el P o K tengan algún efecto en el desarrollo de los tubérculos, pero en los resultados aquí expuestos se ve que al menos el K sí influye. La ausencia de K en el medio, podría provocar un descenso en la síntesis de almidón, que es el principal carbohidrato de reserva en el tubérculo (Ross *et al.*, 1994), aproximadamente 80% de la materia seca (Valadez-López, 1990).

La síntesis de almidón en los microtubérculos, cuando el K es bajo, podría verse inhibida porque los azúcares solubles no se utilizan debido a que son requeridos para mantener la tonicidad o porque no son transportados al tubérculo en crecimiento. Huber (1984) reportó que en hojas de soya la actividad de la sacarosa fosfato sintasa (SFS) y la traslocación de material disminuyen cuando la concentración de K en el medio se reduce, esto lleva a la acumulación de azúcares solubles, que ayudan a mantener el potencial osmótico de las hojas. Cuando el K está presente a concentraciones mayores, sí podrían ser utilizadas debido a que no se requiere mantener el potencial osmótico utilizando azúcares, pues la concentración de K puede ser suficiente para ello, en consecuencia, la síntesis de almidón, y el peso de los tubérculos aumentaría (Fig. 13A y B). En tubérculos de papa se ha observado que el contenido de azúcares reductores disminuye cuando

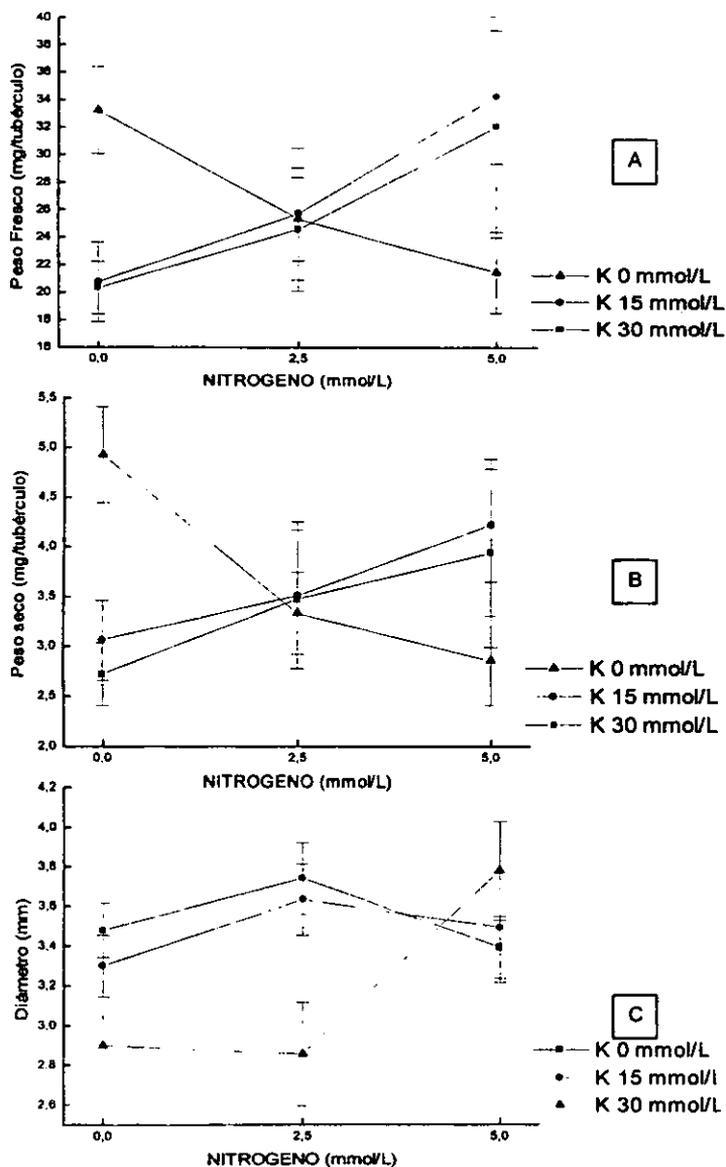


Fig. 13 Efecto principal de la interacción N x K sobre el crecimiento de los microtubérculos, expresado como PF (A), PS (B) y Diámetro (C). Media \pm Err. Std.

Las bajas concentraciones de K en el apoplasto facilitan la carga de sacarosa y aminoácidos al floema. El modelo planteado por algunos autores sugiere que un acarreador de sacarosa realiza un cotransporte de ésta junto con H^+ hacia el floema, posteriormente el H^+ regresa al apoplasto a través de una ATPasa, en intercambio por K^+ (Marschner, 1986, ver Fig. 2). En trigo, la deficiencia en K provocó el descenso del peso de los granos, mientras que la síntesis de AAB aumentó (Haeder y Beringer, 1981^b); el AAB puede inhibir la carga de sacarosa al floema, aunque también puede promoverla, ya que ésta respuesta depende del estado de desarrollo de los granos y otras hormonas también ejercen un papel en éste proceso (Vreugdenhil, 1983).

En las raíces de caña de azúcar se ha visto que las células de reserva acumulan sacarosa estimuladas por el K^+ , ya que al parecer entra acoplada a este ion (Saftner y Wyse, 1980).

Cuando discos de tubérculos de papa se incuban en una solución con alta osmolaridad, se estimula la síntesis de almidón (Oparka y Wright, 1988). Podría ser que los medios que contienen más N y K estimulen también la síntesis de almidón porque aumentan la osmolaridad del medio. Sería necesario realizar experimentos en los que N, P y K estén ausentes y se use manitol u otro osmolito, para elevar la osmolaridad; de ésta manera se podría ver si en los medios empleados aquí el efecto observado en el aumento del peso de los tubérculos se debe al N y K, o a la osmolaridad del medio.

Los resultados encontrados en este trabajo señalan que el aumento de K y N en el medio favorece el incremento en el peso de los tubérculos *in vitro*. Aunque no es posible decir cuales son los mecanismos que operan, podría ser la influencia del K en la síntesis del almidón la más importante; cabe mencionar que el tubérculo almacena también gran cantidad de proteínas de reserva, principalmente patatina, y que para esto podría requerirse del nitrógeno.

Por su parte el P juega un papel importante en la síntesis de carbohidratos en plantas (Marschner, 1986). Plantas que crecen con deficiencia en P pueden acumular más almidón que las plantas sin deficiencia (Herold *et al.*, 1976⁵; Held *et al.*, 1977⁶). En este trabajo no se observó un efecto significativo del P en el peso de los tubérculos, aunque cuando hay una deficiencia de él, aumenta el porcentaje de tuberización y el número de tubérculos, esto podría ser un reflejo de su influencia en la síntesis de carbohidratos. Tal influencia se ha observado tanto en el transporte de TF dentro de la célula (Flüge *et al.*, 1980) como en la actividad de enzimas involucradas en la síntesis de almidón (Soworkinos, 1981) y sacarosa (Reimholtz *et al.*, 1997, Jones y Ort, 1997).

El desarrollo de los tubérculos también se evaluó en función de su diámetro. Los datos obtenidos muestran una tendencia similar a la del PF y PS (Fig. 13C), esto indica que el aumento en tamaño también depende de la concentración de N y K, principalmente y podría estar relacionado a la acumulación de materia seca.

Microtuberización en medio líquido

Al término de los experimentos anteriores se realizó uno adicional utilizando la metodología de Estrada *et al.* (1986). La finalidad fue ver si usando éste método de cultivo y los medios descritos en el presente trabajo, se obtenía una mejor tuberización que la reportada por Estrada *et al.* (1986) y Wang y Hu (1982); los primeros autores utilizaron BAP y CCC para la inducción y los segundos, solo BAP. Los cultivos en medio líquido son mucho más productivos que en tubo de ensayos, ya que a partir de un brote de alrededor de 6 nudos, se pueden obtener varios tubérculos. Estrada *et al.* (1986), reportaron medias de 8.2-20.8 microtubérculos-matriz⁻¹, la diferencia dependió del genotipo.

De acuerdo con los resultados de los primeros experimentos se seleccionaron cuatro de los medios que habían mostrado un mayor porcentaje de tuberización y se compararon con el MS + KIN. Los Resultados se muestran en la tabla 9.

El número de microtubérculos-matriz⁻¹ resulta similar a lo reportado por Estrada *et al.* (1986) y la producción obtenida fue mayor con los medios experimentales que utilizando KIN como inductor.

Los PF registrados fueron muy variables pues se encontraron valores entre 10 y 250 mg/microtubérculo (Fig. 14), aunque las medias resultan comparables a las reportadas por Estrada *et al.* (1986). Utilizando un sistema similar Wang y Hu (1982) lograron producir entre 30 y 50 microtubérculos-matriz⁻¹ que en total sumaron 10 g de PF, es decir, un promedio de 200-330 mg-microtubérculo⁻¹. Estos autores mantuvieron sus cultivos durante cuatro meses, Estrada *et al.* (1986) los mantuvieron 40 días y en este trabajo, se mantuvieron 28 días. Tal vez si se mantienen por más tiempo el rendimiento sea mayor; además, se mantuvieron en oscuridad lo cual limita el crecimiento de los microtubérculos (Garner y Blake, 1989; Seabrook *et al.*, 1993).

Tabla 9. Resultados de la inducción de tuberización en medio líquido. Los datos son la media y la desviación estándar de dos repeticiones. En cada matraz se sembró un brote de 6 nudos que se mantuvo en crecimiento con luz durante 4 semanas en medio MS, luego se cambió el medio por el de inducción y se trasladaron los cultivos a oscuridad por 4 semanas.

	N-P-K				
	MS+Kin	0-0-0	2.5-0-0	2.5-5-0	5-0-15 ^a
No. tubérc. matraz ⁻¹	1.5 ± 2.12	15.0 ± 7.07	11.0 ± 1.41	12.0 ± 9.90	5.0
PF-tubérc. ⁻¹ (mg)	230 ± 70	59.5 ± 8.56	140.4 ± 40.42	151.2 ± 74.65	52.8
Diam. tubér ⁻¹ (mm)	2.7 ± 1.66	3.6 ± 0.08	5.3 ± 0.07	4.7 ± 0.65	3.8
PF de brotes matraz ⁻¹ (g)	9.3 ± 1.84	6.2 ± 0.54	5.2 ± 0.09	7.1 ± 4.53	3.90
No. de brotes matraz ⁻¹	16.5 ± 0.71	8.5 ± 0.71	8.0 ± 0	8.5 ± 6.37	4.0

(^a) No se presentan Desv. Est. Porque se perdió una unidad experimental por contaminación.

Leclerc *et al.* (1994) observaron que la adición de BAP-CCC y cumarina redujo el PF y el número de tubérculos y concluyen que utilizar el medio MS con sacarosa 8% y las condiciones adecuadas de luz y temperatura, da mejores resultados y puede reducir los costos de producción.

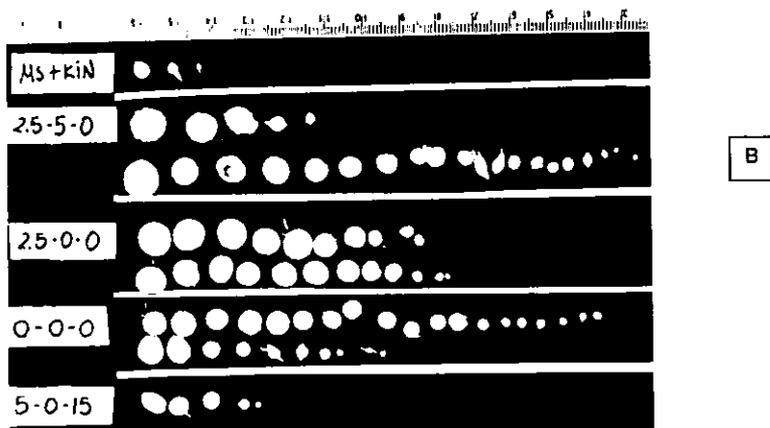


Fig. 14. En cada matraz se sembró un brote con seis nudos; después de 4 semanas de crecimiento se cambió el medio y se trasladaron a obscuridad para tuberizar. En A se observa la formación de los microtubérculos cuatro semanas después del cambio de medio. En la fig. B se muestra que la producción en los medios experimentales fue mayor que en el medio con KIN; también se puede observar que se alcanzaron tallas mayores que en los cultivos en tubo.

Es evidente que la producción de microtubérculos *in vitro* puede aumentarse combinando diferentes factores. Si además se utiliza un medio sin reguladores del crecimiento, podemos eliminar los efectos indeseables de éstos, como el aumento en la dormancia de los tubérculos, cambios en su morfología y reducción de la germinación (Garner y Blake 1989) y podemos acercarnos más a la meta de lograr medios de cultivo cada vez menos complejos y con mejores resultados (Leclerc *et al.*, 1994).

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados expuestos, se pueden dar las siguientes conclusiones:

- a) Se requiere de sacarosa a concentraciones mayores de 2% para que se lleve a cabo la tuberización *in vitro*.
- b) La concentración de N, P y K, tiene efecto sobre la tuberización. En las condiciones de los experimentos descritos el porcentaje de tuberización estuvo influenciado de manera negativa por la presencia de P y K más que por el nitrógeno.
- c) El peso y talla de los microtubérculos aumentaron con el incremento de potasio y nitrógeno del medio.
- d) Utilizando algunos de los medios descritos aquí, en combinación con un sistema de cultivo en medio líquido, se pudo obtener una producción mayor de microtubérculos que utilizando cinetina y cultivos en tubo con medio sólido.
- e) La adición de citrato de sodio no tuvo ningún efecto en la microtuberización. Por su parte las fuentes de NPK si parecen tener un efecto negativo.

SUGERENCIAS

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren algunas líneas de trabajo para futuras investigaciones en las que se desee conocer más acerca de la tuberización *in vitro* y su posible aplicación:

- a) Es necesario establecer concentraciones precisas de NPK en el medio de cultivo, así como diferentes fuentes de estos elementos, a fin de poder proponer un medio con una formulación exacta que pudiera ser utilizado únicamente como inductor de la tuberización.
- b) Debe evaluarse el papel que tienen otros elementos en la tuberización, principalmente el Ca y Mg, que se ha visto, pueden estar involucrados en dicho proceso.
- c) Tomando como base algunos de los medios con un alto porcentaje de tuberización utilizados aquí, se puede evaluar el papel de las condiciones ambientales, principalmente luz y temperatura, antes y durante de la tuberización. También se puede determinar el tiempo necesario para obtener una mejor producción, tanto en número como en talla.
- d) Dado que las respuestas a los factores anteriores dependen del genotipo usado, es de interés establecer condiciones y medios óptimos para diferentes variedades.

BIBLIOGRAFIA

- Akita, M. y Takayama, S. (1994a). Induction and development of potato tubers in a jar fermentor. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 36(2):177-182.
- Akita, M. y Takayama, S. (1994b). Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Reports.* 13:184-187.
- Alchanatis, V., Peleg, K. y Siv, M. (1994). Morphological control and mensuration of potato plantlets from tissue cultures for automated micropropagation. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 36:331-338.
- Balamani, V., Veluthambi, K y Poovalah, B.W. (1986). Effect of calcium on tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiol.* 80:856-858.
- Bánfalvi, Z., Molnar, A., Kostyál S., Lakatos, L. y Molnar, G. (1997). Comparative studies on potato tuber development using an *in vitro* tuber induction system. *Acta Biologica Hungarica* 48(1):77-86.
- Beukema, H.P. y Vander Zaag, D.E. (1979). Potato improvement. Some factor and Facts. *Internacional Agricultural Centre, Wageningen, Holanda*, 230p.
- Biemond, H y Vos, J. (1992). Effects of nitrogen on the development and growth of the potato plant. 2. The partitioning of dry matter, nitrogen and nitrate. *Ann. of Bot.* 70:37-45.
- Bryan, J. E. (1988). Implementacion of rapid multiplication and tissue culture methods in third world countries. *Am. Potato J.* 65:199-207.
- Buitron, F., Espinoza, N., Sigüefias, C., Panta, A. y Golmirzaie, A. (1995). Cultivo de tejidos: micropropagación conservación y exportación de gemoplasma de papa. *Guías de Investigación CIP 1. Centro Internacional de la papa. Lima Perú.* 19p.
- Cao, W. y Tibbitts, T. W. (1992). Temperature cycling periods effect growth and tuberization in potatoes under continuous irradiation. *Hort. Science* 27(4):344-345.
- Chandra, R. y Naik, P.S. (1993). Potato tissue and cell culture En: *Advances in Horticulture Vol 7.-Potato.* Eds. K. L. Chandra y Grewal Mathotra Publishing House Nueva Delhi India.
- Charles, G. L. y Rossignol, M. (1992). Environmental Effects on Potato Plants *in vitro*. *J. Plant Physiol* 139(6):708-713.
- Charles, G., Rossignol, L. y Rossignol, M. (1993). A synchronous model perfecting for fundamental studies on the tuberization process. *J. Plant Physiol.* 142(4):474-479.
- Choi, Y.W., Jeoung, L. C. y Seong, M. K. (1994). Studies on the rapid multiplication of microtubers from potatoes (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* and their practical use. *J. of the Korean Society for Hort. Sci.* 35(2):111-125 (Resumen).

- Dalton, C.C., Iqbal, K. y Turner, D. A. (1983). Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. *Physiol. Plant.* 57:472-476.
- Dermastia, M., Ravnkar, M., Vilhar, B. y Kovac, M. (1994). Increased level of cytokinin ribosides in jasmonic acid-treated potato (*Solanum tuberosum*), stem node cultures. *Physiol. Plant.* 92:241-246.
- Dinar, M. y Rudich, J. (1985). Effect of heat stress on assimilate partitioning in tomato. *Ann. of Bot.* 56:239-248.
- Dixon, R.A. (1985). Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. En: *Plant cell cultures, a practical approach* (R.A. Dixon, editor). IRL Press. Oxford, Washington.
- Dodds, J. H., Huaman, Z. y Lizarraga, R. (1991). Potato germoplasm conservation. En: *In vitro* methods for conservation of plant genetic resources. (Dodds, J. H., editor). Chapman & Hall, Londres, Inglaterra.
- Duwening, E., Steup, M. y Kossmann, J. (1997). Induction of genes encoding plastidic phosphorilase from spinach (*Spinacia oleracea* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.) by exogenously supplied carbohydrates in excised leaf discs. *Planta* 203:111-120.
- Engvild, K. C. (1989). The death hormone hypothesis. *Physiol. Plant.* 77:282-285.
- Estrada, R. Tovar, P. Dodds, J.H. (1986). Induction of *in vitro* tubers in a broad range of potato genotypes. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 7:3-10.
- Ewing, E. E. y Wareing, P. F. (1978). Shoot, stolon and tuber formation on potato (*Solanum Tuberosum* L.) cutting in response to photoperiod. *Plant Physiol.* 61:348-353.
- Ewing, E. E. (1990). Induction of tuberization in potato. En: *The molecular and cellular biology of the potato.* (Michael E. Vaydr y William Parla, eds.) C.A.B. International, Wallingford.
- Flügge, U. I., Freisl, M. y Heldt, H. W. (1980). Balance between metabolite accumulation and transport in relation to photosynthesis by isolated spinach chloroplast. *Plant Physiol.* 65:574-577.
- Forsline, P. L. y Langille, A. R. (1975). Endogenous cytokinins in *Solanum tuberosum* as influenced by photoperiod and temperature. *Physiol Plant.* 34:75-77.
- Forsline, P. L. y Langille, A. R. (1976). An assessment of the modifying effect of kinetin on *in vitro* tuberization of induced and non-induced tissues of *Solanum tuberosum*. *Can. J. Bot.* 54(22):2513-16.
- Frommer, W. B y Sonnewald, U. (1995). Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. *J. Experimental Botany* 46(287):587-607
- Fujino K., Koda, Y. y Kikuta, Y. (1995). Reorientation of cortical microtubules in the sub-apical region during tuberization in single-nod stem segmen of potato in culture. *Plant Cell Physiol* 35(5):891-895

- García-Torres, L. y Gómez-Campo, C. (1973). *In vitro* tuberization of potato sprouts as affected by ethrel and gibberellic acid. *Potato Res.* 16:73-79.
- Gamer, N. y Blake, J. (1989). The induction and development of potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. *Ann. of Bot.* 63:663-674.
- Gawronska, H. y Dwelle, R. B. (1989). Partitioning of photoassimilates by potato plants (*Solanum tuberosum* L.) as influenced by irradiance I. Partitioning patterns in cultivar Russet Burbank grown under high and low irradiance. *Am. Potato J.* 66:201-213.
- Geigenberger, P., Reimholz, R., Geiger, M., Merlo L., Canale, V. y Stiff, M. (1997). Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in responses to short-term water deficit. *Planta* 201:502-518.
- Gregory, L. E. (1956). Some factors for tuberization in the potato plant. *Am. J. Botany* 43:281-288.
- Harvey, B.M.R., Crothers, S. H., Evans, N. E. y Selby, C. (1991). The use of growth retardants to improve microtuber formation by potato (*Solanum Tuberosum*), *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 27:59-64.
- Hay, R.K.M. y Walker, A. J. (1989). An introduction to the physiology of crop. Yield. Ed. Longman scientific and technical, USA pp 188-209.
- Helder, H., Miersch, O., Vreugdenhil, D. y Sembdner, G. (1993). Occurrence of hydroxylated jasmonic acids in leaflets of *Solanum demissum* plant grown under long- and short-day conditions. *Physiol. Plant.* 88:647-653.
- Huber, S. C. (1984). Biochemical basis for effects of K-deficiency on Assimilate export rate and accumulation of soluble sugars in soybean leaves. *Plant Physiol.* 76:424-430.
- Hussey, G. y Stacey, N. J. (1984). Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) *Annals of Botany.* 53:565-578.
- Jackson, S. D. y Willmitzer, L. (1994). Jasmonic acid spraying does not induce tuberization in short-day-requiring potato species kept in non-inducing conditions. *Planta* 194:155-159.
- Jackson, S. D. y Prat, S. (1996). Control of tuberization in potato by Giberellins and phytochrome B. *Physiol Plant.* 98:407-412
- Jardin, P. du, Harvengt, L., Kirsch, F. Le, VQ., Nguyen-Quoc, B. y Yelle, S. (1997). Sink-cell-specific activity of a potato ADP-glucosa pyrophosphorylase B-subunit promoter in transgenic potato and tomato plants. *Planta* 203:133-139.
- Jones, E. D. (1988). A current assessment of *in vitro* culture and other rapid multiplication methods in North America and Europe. *Am. Potato J.* 65:209-220.
- Jones, T. L. y Ort, D R. (1997). Circadian regulation of sucrose phosphate synthase activity in tomato by protein phosphatase activity. *Plant Physiol.* 113(4):1167-1175.

- Kahu, B. A. y Ewing, E. E. (1983). Factors controlling the basipetal pattern of tuberization in induced potato (*Solanum Tuberosum* L.) cuttings. *Annals of Botany* 52:861-871.
- Kerr, P. S. , Huber, S. C., Israel, D. W. (1984). Effect of N-Source on soybean leaf sucrose phosphate synthase, starch formation, and whole plant growth. *Plant Physiol.* 75:483-488.
- Khuri, S. y Moorby, J. (1995). Investigations into the role of sucrose in potato cv. Estima microtuber production *in vitro*. *Annals of Botany* 75:295-303.
- Kiatkowsky, S., Martin, M. W., Brown, C. R., y Sluis, C. J. (1988). Serial microtuber formation as a long-term conservation method for *in vitro* potato germplasm. *Am. Potato J.* 65:369-375.
- Koda, Y., Kikuta, Y., Tazaki, H., Tsujino, Y., Sakamura, S. y Yoshihara, T. (1991). Potato tuber-inducing activities of jasmonic acid and related compounds. *Phytochemistry.* 30(5):1435-1438.
- Koda, Y. (1997). Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events. *Physiologia plant.* 100:639-646.
- Kordyum, E., Baraneuko, V., Nedukha, E. y Samoilov, V. (1997). Development of potato minitubers in microgravity. *Plant Cell Physiol.* 38(19):1111-1117.
- Krauss, A. (1985). Interaction of nitrogen nutrition, phytohormones and tuberization. En: *Potato Physiology*. (Li, Paul H., editor), Academic Press Orlando, Florida.
- Krauss, A. y Sattelmacher, B. (1979). The effect of high temperature on tuberization in the potato (*S. tuberosum*) *Plant Physiol. Suplemento* 63:81.
- Kwak, S. H. y Lee, S. H. (1997). The requirements for Ca²⁺, protein phosphorylation, and dephosphorylation for ethylene signal transduction in *Pisum sativum* L. *Plant Cell Physiol.* 38(10):1142-1149.
- Leclerc, Y., Donnelly, D. J., y Seabrook, J. E. A. (1994). Microtuberization of layered shoots and nodal cuttings of potato: the influence of growth regulators and incubation periods. *Plant Cell Tiss. And Org. Culture.* 37:113-120.
- Levy, D., Seabrook, J. E. A. y Coleman, S. (1993). Enhancement of tuberization of axillary shoot buds of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars cultured *in vitro*. *Journal of Exp. Bot.* 44(259):381-386.
- Lommen, W. J. M. y Struik, P.C. (1992a) Influence of single non-destructive harvest on potato plantlets grown for minituber production. *Netherlands J. of Agricultural Sci.* 40:21-41.
- Lommen, W. J. M. y Struik, P.C. (1992b). Production of potato minitubers by repeated harvesting: plant productivity and initiation, growth and resorption of tubers. *Netherlands J. of Agricultural Sci.* 40:341-358.
- Lorenzen, J. H. y Ewing, E.E. (1990). Changes in tuberization and assimilate partitioning in potato (*Solanum tuberosum*) during the first 18 days of photoperiod treatment. *Ann. Of Bot* 66:457-456.

- Lorenzen, J. H. y Ewing, E.E. (1992). Starch accumulation in leaves of potato (*Solanum tuberosum* L.) during the first 18 days of photoperiod treatment Ann. Of Bot. 69:481-485.
- Maathuis, F. J. M., Ichida, A. M., Sanders, D. y Schroeder, J. I. (1997). Roles of higher plant K⁺ channels. Plant Physiol. 114(4):1141-1149.
- Marani, F. Y Pisi, A. (1977). Meristem-tip culture and vegetative propagation in potato. Acta Horticulturae 78:415-424.
- Marschner, H., Sattelmacher, B. y Bangerth, F. (1984). Growth rate of potato tubers and endogenous contents of indolylacetic acid and abscisic acid. Physiol. Plant. 60:16-20.
- Marschner, H. (1986). Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. Londres. pp 167-170, 131-132.
- Marshall, B. y Vos, J. (1991). The relation between the nitrogen concentration and photosynthetic capacity of potato (*Solanum tuberosum* L.) leaves. Ann. Bot. 68:33-39.
- Matoo, A. K., Chalutz, E., Anderson, J. D. y Lieberman, M (1979). Characterization of the phosphate control of ethylene production by *Penicillium digitatum*. Plant Physiol. 64(1):55-60.
- Mauk, C. S. y Langille, A. R. (1978). Physiology of tuberization in *Solanum tuberosum* L. Ciszestatin riboside in the potato plant: its identification and changes in endogenous levels as influenced by temperature and photoperiod. Plant Physiol. 62:438-442.
- von Meltzer, H. (1992). The effect of nitrogen and saccharose on tuberization *in vitro*. Biologia Plantarum 34(3-4):219-222.
- Menzel, C. M. (1983a). Tuberization in potato at high temperatures from buds. Ann of Bot. 52:697-702.
- Menzel, C. M. (1983b). Tuberization in potato at high temperatures: interaction between shoot and root temperatures. Ann of Bot. 52:65-69.
- Menzel, C. M. (1985). Tuberization in potato at high temperatures: interactions between temperature and irradiance. Ann of Bot. 55:35-39.
- Mingo-Castel, A. M., Negm, F. B. y Smith, O. E. (1974). Effect of carbon dioxide and ethylene on tuberization of isolated potato stolons cultured *in vitro*. Plant Physiol. 53:798-801.
- Mingo-Castel, A. M., Smith, O. E. y Kumamoto, J. (1976). Studies on the carbon dioxide and ethylene inhibition of tuberization in potato explants cultured *in vitro* Plant Physiol. 57:480-485.
- Miller, S. A. y Lipschutz, I. (1984). Potato. En: Handbook of plant cell culture vol. 3. (Ammirato, P. V., Evans, D.A., Sharp, W.R. Y Yamada, Y., editores). Macmillan Press, Nueva York.

- Millard, P. Robinson, D. y Mackie-Dawson, L. A. (1989). Nitrogen partitioning within the potato (*Solanum tuberosum* L.) plant in relation to nitrogen supply. *Ann. of Bot.* 63:289-296.
- Moorby, J. y Milthorp, F. L. (1975). Potato. En: *Crop physiology* (Evans, L.T. editor). Cambridge Univ. Press, Londres.
- Morozova, S. E. y Melik-Sarkisov (1977). Propagation of virus-free potato plants by means of tuber obtained *in vitro*. *Fiziologiya Rastenii* 25(2):373-378.
- Nakamori, K., Matsuura, H., Yoshihara, T., Ichihara, A. y Koda, Y. (1994). Potato micro-tuber inducing substances from *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytochemistry* 35(4):835-839.
- Nowak, J. y Colborne, D. (1989) *In vitro* tuberization and tuber proteins as indicators of heat stress tolerance in potato. *Am Pot. J.* 66:35-45.
- Obata-Sasamoto, H. y Suzuki, H. (1979). Activities of enzymes relating to starch synthesis and endogenous levels of growth regulators in potato stolons tips during tuberization. *Physiol. Plant.* 45:320-324.
- Oparka, K. J., Davies, H. V. y Prior, D. A. M. (1987). The influence of applied nitrogen on export and partitioning of current assimilate by field-grown potato plants. *Ann. Bot.* 59:311-323.
- Oparka, K. J., Davies, H. V. (1988). Osmotic regulation of starch synthesis in potato tubers? *Planta* 174:123-126.
- Palmer, C. E. y Smith, O. E. (1970). Effect of Kinetin on tuber formation on isolated stolons of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*. *Plant and Cell Physiol.* 11:303-314.
- Pelacho, A. M. y Mingo-Castel, A. M. (1991a). Effects of photoperiod on kinetin-induced tuberization of isolated potato stolons cultured *in vitro*. *Am Potato J.* 68:533-541.
- Pelacho, A. M. y Mingo-Castel, A. M. (1991b). Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiol* 97:1253-1255.
- Pelacho, A. M., Martín-Closas, L.I., Campabadal, C., Torres, A., Farran, I. y Mingo-Castel, A. M. (1994). *In vitro* tuberization of potato: effects of several morphogenic regulators in light and darkness. *J. Plant Physiol.* 144:705-709.
- Peri, A. Aviv, D., Willmitzer, L. y Galum, E. (1991). *In vitro* tuberization in transgenic potatoes harboring β -glucuronidase linked to a patatin promoter: effects of sucrose levels and photoperiods. *Plant Science* 73:87-95.
- Peterson, R. L. y Barker, W. G. (1979). Early tuber development from explanted stolons nodes of *Solanum tuberosum* var Kennebec. *Bot. Gaz.* 140(4):389-406.
- Preiss, J. (1982). Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Ann Rev. Plant Physiol* 33:431-454

- Pujos, A. y Morard, P. (1997). Effects of potassium deficiency on tomato growth and mineral nutrition at the early production stage. *Plant and Soil* 189:189-196.
- Raiton, I. D. y Wareing, P. F. (1973). Effects of daylength on endogenous gibberellins in leaves of *Solanum andigena*. I. Changes in leaves of free acidic gibberellin-like substances. *Physiol. Plant.* 28:88-94.
- Reimholtz, R., Geigenberger, P. y Stitt, M. (1994). Sucrose-phosphate synthase is regulated via metabolites and protein phosphorylation in potato tubers, in a manner analogous to the enzyme in leaves. *Planta* 192(4):480-488.
- Reynolds, M. P. y Ewing, E. E. (1989). Effects of high air and soil temperature stress on growth and tuberization in *Solanum tuberosum*. *Ann. Of Bot.* 64:241-247.
- Roberts, S., Weaver, W. H., Ohelps, J. P. (1982). Effect of rate and time of fertilization on nitrogen and yield of Russet Burbank potatoes under center pivot irrigation. *Am Potato J.* 59:77-86.
- Ross, H. A., Davies, H. V., Burch, L. R., Viola, R. Y McRae, D. (1994). Developmental changes in carbohydrate content and sucrose degradin enzymes in tuberising stolons of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.* 90:748-756.
- Saftner, R. A. y Wyse, R. E. (1980). Alkali cation/sucrose co-transport in the root sink of sugar beet. *Plant Physiol.* 66:884-889.
- Sakano, K., Matsumoto, M., Yazaki, Y., Kiyota, S. y Okihara, K. (1995a). Inorganic phosphate as a negative conditioning factor in plant cell culture. *Plant Science* 107:117-124.
- Sakano, K., Matsumoto, M., Yazaki, Y., Kiyota, S. y Okihara, K. (1995a). Lack of control in inorganic phosphate uptake by *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cells. *Plant Physiol.* 108:295-302.
- Santeliz, G. y Ewing, E. E. (1981). Effects of nitrogen on growth and development of potatoes. *Am Potato J.* 58:517-518.
- Sattelmacher, B. y Marschner, H. (1978a). Nitrogen nutrition and cytokinin activity in *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* 42:185-189.
- Sattelmacher, B. y Marschner, H. (1978b). Relation between nitrogen nutrition, cytokinin activity and tuberization in *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* 44:65-68.
- Sattelmacher, B., Marschner, H. y Küne, R. (1990). Effects of the temperature of the rooting zone on the growth and development of roots of potato (*Solanum tuberosum*). *Ann of Bot.* 65:27-36.
- Seabrook, J. E. A., Coleman, S. y Levy, D. (1993). Effect of photoperiod on *in vitro* tuberization of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Cell, Tiss. And Org. Cult.* 34:43-51.
- Simko, I. (1994). Effect of paclobutrazol on *in vitro* formation of potato microtubers and their sprouting after storage. *Biol. Plant.* 36(1).15-20.

- Smalle, J. y Van Der Straeten, D. (1997). Ethylene and vegetative development. *Physiol. Plant.* 100:593-605.
- Smith, O. E. y Palmer, C. E. (1970). Cytokinin-induced tuber formation on stolons of *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* 23:599-606.
- Sosa-Chavez, R. Y Villarreal, M. G. (1978). Papa. En: Análisis de los recursos genéticos disponibles a México. Sesiones de trabajo organizadas por la Sociedad Mexicana de Fitogenética. Cervantes Santana, T. (editor). SMF Chapingo, México.
- Soworkinos, J. R. (1981). Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum*. II Catalitic properties and regulation of ADP-glocose and UDP-glocose pyrophosphorylase activities in potato. *Plant Physiol.* 68:924-929.
- Stalknecht, G. F. Y Farnsworth, S. (1982a). General characteristics of coumarin-induced tuberization of axillary shoots of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*. *Am Potato J.* 59:17-31.
- Stalknecht, G. F. Y Farnsworth, S. (1982b). The effect of the inhibitors of protein and nucleic acid synthesis on the coumarin-induced tuberization and growth of exised axillary shoots of potato sprouts (*Solanum tuberosum* L.) cultured *in vitro*. *Am. Potato J.* 59:69-75.
- Stalknecht, G. F. (1983). Applications of plant growth regulators to potatoes, production, and research. En: Plant growth regulating chemicals. Vol. 2 (louis G. Nickell, editor). CRC, Boca Raton, Florida.
- Stalknecht, G. F. (1985). Tuber initiation in *Solanum tuberosum*: effect of phytohormones and induced changes in nucleic acid and protein metabolism. En: Potato Physiology (Paul H. Li, editor). Academic Press, Orlando, Florida.
- Struik, P. C., Boon, E. J. y Vreugdenhil, D. (1987). Effects of extracellular extracts from leaves on the tuberization of cuttings of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiol.* 84:214-217.
- Takahashi, K. Fujino, K., Kikuta, Y. y Koda, Y. (1994). Expansion of potato cells in response to jasmonic acid. *Plant Sci.* 100:3-8.
- Takahashi, K. Fujino, K., Kikuta, Y. y Koda, Y. (1995). Involvement of the accumulation of sucrose and the synthesis of cell wall polysaccharides in the expansion of potato cells in response to jasmonic acid. *Plant Sci.* 111:11-18.
- Vick, B. y Zimmerman, D. C. (1984). Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol.* 75:458-461.
- Valadez-López, A. (1990). Producción de hortalizas. Limusa, México, D.F. pp: 212-222.
- Vos, J. y Biemond, H. (1992). Effects of nitrogen on the development and growth of the potato plant I. Leaf appearance, expansion growth, life spans of leaves and stem branching. *Ann. of Bot.* 70:27-35.

- Vreugdenhil, D. (1983). Abscisic acid inhibits phloem loading of sucrose. *Physiol. Plant.* 57:453-467.
- Vreugdenhil, D. y Struik, P. C. (1989). An integrated view of the hormonal regulation of tubers formation in potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.* 75:525-531.
- Vyskot, B. y Bezdek, M. (1984). Stabilization of the synthetic media for plant tissue and cell cultures. *Biol. Plant.* 26(2):132-143.
- Wang, P. y Hu, C. (1982). *In vitro* Tuberization and virus-free seed-potato production in Taiwan. *Am. Potato J.* 59:33-37.
- Wattimena, G., McCown, B. y Weis, G. (1983). Comparative field performance of potatoes from microculture. *Am Potato J.* 60:27-33.
- Westcott, R. J., Henshaw, G. G., Grout, B. W. W. y Roca, M. M. (1977). Tissue culture methods and germplasm storage. *Acta Horticulturae* 78:45-49.
- Westermann, D. T., Tindall, T. A., James, D. W. y Hurst, R. L. (1994a). Nitrogen and potassium fertilization of potatoes: yield and specific gravity. *Am. Potato J.* 71:417-431.
- Westermann, D. T., Tindall, T. A., James, D. W. y Hurst, R. L. (1994b). Nitrogen and potassium fertilization of potatoes: tuber sugars and starch. *Am. Potato J.* 71:439-453.
- Wheeler, R. M. y Tibbitts, T. W. (1986). Growth and tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) under continuous light. *Plant Physiol.* 80:801-804.
- Yoshihara, T., Ohmori, F. Y Ichihara, A. (1996). Metabolism and transpor of [2-¹⁴C](±)jasmonic acid under the different photoperiod. *Plant Cell Physiol.* 37(suplemento):9.
- Zhu, Y. J., Komor, E. y Moore, P. H. (1997). Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. *Plant Physiol.* 115(2):609-616.

ANEXO I

Cuadros del análisis de varianza.

Porcentaje de tuberización

Resumen de todos los efectos en el porcentaje de tuberización							
Factor	G. L. del(os) factor(es)	C. M. del(os) factor(es)	G. L. del error	C. M. del error	F ₀	F _{tablas/α, os}	Nivel de p.
K	2	40.54279	27	3.78529	12.00013	3.35	0.000187
N	2	3.90408	27	3.78529	1.15556	3.35	0.329970
P	2	27.40773	27	3.78529	8.11233	3.35	0.001742
K-N	4	2.92133	27	3.78529	0.86467	2.73	0.497667
K-P	4	4.95131	27	3.78529	1.46552	2.73	0.240187
N-P	4	3.59010	27	3.78529	1.06262	2.73	0.394074
K-N-P	8	0.60541	27	3.78529	0.17919	2.31	0.991900

Número de microtubérculos/brote

Resumen de todos los efectos en el número de microtubérculos/brote							
Factor	G. L. del(os) factor(es)	C. M. del(os) factor(es)	G. L. del error	C. M. del error	F ₀	F _{tablas/α, os}	Nivel de p.
K	2	0.767024	27	0.100428	7.637569	3.35	0.002351
N	2	0.010348	27	0.100428	0.103022	3.35	0.902460
P	2	0.752941	27	0.100428	7.497335	3.35	0.002572
K-N	4	0.040724	27	0.100428	0.405506	2.73	0.802996
K-P	4	0.285960	27	0.100428	2.847421	2.73	0.043246
N-P	4	0.138357	27	0.100428	1.377681	2.73	0.267932
K-N-P	8	0.033056	27	0.100428	0.329152	2.31	0.947294

Peso fresco

Resumen de todos los efectos en el peso fresco							
Factor	G. L. del(os) factor(es)	C. M. del(os) factor(es)	G. L. del error	C. M. del error	F ₀	F _{tablas/α, os}	Nivel de p.
K	2	29.776	218	470.1606	0.063332	3.00	0.938649
N	2	650.164	218	470.1606	1.382854	3.00	0.253053
P	2	254.747	218	470.1606	0.541829	3.00	0.582465
K-N	4	1540.537	218	470.1606	3.276619	2.37	0.012373
K-P	4	522.611	218	470.1606	1.111557	2.37	0.351945
N-P	4	811.505	218	470.1606	1.726017	2.37	0.145260
K-N-P	8	234.306	218	470.1606	0.498353	1.94	0.856682

Peso seco

Resumen de todos los efectos en el peso seco							
Factor	G. L. del(os) factor(es)	C. M. del(os) factor(es)	G. L. del error	C. M. del error	F ₀	F _{tablas/0.05}	Nivel de p.
K	2	1.74375	218	8.624438	0.202187	3.00	0.817095
N	2	2.11897	218	8.624438	0.245694	3.00	0.782378
P	2	2.75931	218	8.624438	0.319941	3.00	0.726532
K-N	4	27.86005	218	8.624438	3.230361	2.37	0.013346
K-P	4	11.06255	218	8.624438	1.282698	2.37	0.277737
N-P	4	14.39970	218	8.624438	1.669639	2.37	0.158091
K-N-P	8	5.54675	218	8.624438	0.643143	1.94	0.740894

Diámetro

Resumen de todos los efectos en el diámetro							
Factor	G. L. del(os) factor(es)	C. M. del(os) factor(es)	G. L. del error	C. M. del error	F ₀	F _{tablas/0.05}	Nivel de p.
K	2	2.835331	218	1.014941	2.793593	3.00	0.063394
N	2	2.737542	218	1.014941	2.697243	3.00	0.069640
P	2	2.987681	218	1.014941	2.943700	3.00	0.054768
K-N	4	3.548731	218	1.014941	3.496491	2.37	0.008622
K-P	4	0.746038	218	1.014941	0.735056	2.37	0.568943
N-P	4	1.990398	218	1.014941	1.961098	2.37	0.101511
K-N-P	8	0.911052	218	1.014941	0.897640	1.94	0.519261

ANEXO II**ABREVIATURAS**

2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	6-(γ -dimetil-amino) purina
AAB	Acido absclísico
ACC	Acido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
AIA	Acido indol acético
ANA	Acido naftalen acético
CCC	2-cloroetil trimetil amonio
CIP	Centro Internacional de la Papa
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
Cv..	Cultivar
DC	Día corto
Diam.	Diámetro
DL	Día largo
Kin	Cinetina
PF	Peso fresco
PS	Peso seco
TF	Triosas fosfato
ZR	Zeatin-ribósido